MARCO AURÉLIO VIEIRA DE PAULA

**PARTICIPAÇÃO DA ENDOTELINA-1 NA SINOVITE
INDUZIDA POR CARRAGENINA NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2012

MARCO AURÉLIO VIEIRA DE PAULA

**PARTICIPAÇÃO DA ENDOTELINA-1 NA SINOVITE
INDUZIDA POR CARRAGENINA NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão original.

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Paula, Marco Aurélio Vieira de.

Participação da endotelina-1 na sinovite induzida por carragenina na articulação temporomandibular de ratos / Marco Aurélio Vieira de Paula. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof Dr. Marcelo Nicolás Muscará.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação.

Versão do título para o inglês: Endothelin-1 participation on the rats temporomandibular joint synovitis induced by carrageenan.

1. Endotelina 2. Articulação temporomandibular 3. Dor 4. Ratos
I. Muscará, Prof Dr. Marcelo Nicolás II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB034/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marco Aurélio Vieira de Paula.

Título da Dissertação: Participação da endotelina-1 na sinovite induzida por carragenina na articulação temporomandibular de ratos.

Orientador(a): Prof Dr. Marcelo Nicolás Muscará.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **46** nas fls. **85** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Marcelo Nicolas Muscará, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Indução de artrite na articulação temporomandibular (ATM) de ratos pela carragenin** do qual participou(aram) o(s) **Aline Maia Dantas, Alex Gaspari Pires, Eduardo Ekundi Valentin, Juliana Florenzano, Karen Tiago dos Santos, Leandro Rodrigues, Marco Aurélio Vieira de Paula, Paula Campi, Rodrigo Martins Porto e a pesquisadora Soraia Kátia Pereira Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **10.06.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 10 de junho de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedico esse trabalho a todos que estiveram ao meu lado, me auxiliando, apoiando e incentivando.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a pessoa que me trouxe a este mundo, e que sempre lutou por mim quando eu não podia, passando por todas as dificuldades com dignidade e a força que só Deus pode dar a quem tem fé verdadeira. Mãe, as lições que você me ensinou não se encontram em livros, mas são as mais importantes para a vida, muito obrigado pelo seu amor incondicional.

À minha amada Juliana Panissa Minchillo, por sempre estar ao meu lado nas horas boas e ruins, por ser meu chão e meu teto, minha cúmplice. Muito obrigado por me apoiar e incentivar em todas as minhas decisões.

As minhas maninhas queridas “Gal, Maria Alice e Carminho” e a querida “Tia Alice” por abrirem meus olhos ao mundo ajudando na minha formação como pessoa. Por tudo que fizeram por mim quando mais jovem serei sempre grato a vocês.

Ao Prof. Dr Marcelo Nicolás Muscará e a Prfª. Dra Soraia Costa por terem aberto as portas de seu laboratório e me recebido com tanta hospitalidade fazendo a mim parte de seu grupo. E em especial ao Prof. Dr Marcelo Nicolás Muscará por toda a ajuda e suporte dado como orientador. Agradeço a ambos por toda a confiança empregada, pelos momentos de esclarecimento e por terem me guiado até o presente momento.

À Dra Simone Teixeira por toda a paciência e dedicação ao dividir o seu conhecimento e tempo ao longo destes anos, mas acima de por sua amizade e companhia, cujo qual preso muito.

Ao Dr Alexandre Denadai-Souza cujo o qual sem sua ajuda esse trabalho não seria possível. Agradeço pelo tempo dedicado a me ensinar e pela paciência para com minhas dificuldades.

À Viviani S. Almeida por seu companheirismo e dedicação ao longo de todos esses anos de trabalho, sua ajuda com certeza foi fundamental para a conclusão deste. Muito obrigado por tudo, você com certeza tem minha profunda e eterna gratidão.

À Karen Tiago por sua contribuição neste trabalho, mas mais do que a isto a sua amizade e as risadas proporcionadas nos momentos mais difíceis, muito obrigado.

À Maria Alice e Irene Gouveia por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelo treinamento no manuseio dos animais e pelo carinho que sempre demonstraram. Muito obrigado por tudo, a ajuda de vocês foi fundamental.

Aos companheiros de laboratório Aline, Cristiane, Eduardo, Filiphe, Flavia e Juliana por todos os bons momentos que passamos juntos, por suas amizades e por todo o apoio e ajuda que vocês me ofereceram, me recebendo e aceitando como companheiro nesta jornada de aprendizado.

Aos companheiros de república Leandro, Kelli e Rodrigo que estiveram comigo nestes dois anos e meio e mais do que amigos foram e são como membros de minha família. Por todo o apoio, conselhos e puxões de orelha sou e serei sempre grato a vocês. E em especial ao Leandro Rodrigues por ser sempre esse “irmãozão” chato que pega no meu pé e sempre está do meu lado para estender sua mão e me ajudar a levantar, nossa amizade é velha e espero q seja eterna, muito obrigado.

Às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP pelo auxílio financeiro prestado ao projeto.

Por ultimo e acima de tudo agradeço a Deus por tudo que ele preparou para mim até hoje e além.

“Ante Deus somos todos igualmente sábios - e igualmente tolos.”
Albert Einstein

RESUMO

Paula, MAV. Participação da Endotelina-1 na Sinovite induzida por Carragenina na Articulação Temporomandibular de Ratos Dissertação [dissertação (Mestrado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

As disfunções temporomandibulares envolvendo a articulação temporomandibular (ATM) são frequentemente secundárias à inflamação e associadas a hiperalgesia, a alodinia ou dor referida. Baseado em estudos anteriores, mostrando a participação da ET em alguns modelos de nocicepção, decidimos investigar o papel da ET₁ na inflamação induzida pela injeção de carragenina (CGN) na ATM de ratos. Injeções intra-articulares (10 µl) de CGN (500 µg), ET₁ ou do agonista seletivo para receptor ET_B (BQ3020) em doses variadas (0,3-30 pmols) foram realizadas na cavidade da ATM esquerda utilizando solução salina estéril como veículo (V). Após 4 h, a alodinia mecânica foi avaliada através da medição do limiar de força para retirada da cabeça, usando um analgesímetro eletrônico baseado no princípio dos filamentos de Von Frey. A seguir os animais foram eutanaseados e as cavidades articulares das ATMs lavadas com solução salina estéril, a fim de determinar o número total e diferencial de leucócitos nos líquidos de lavado. Antagonistas seletivos dos receptores ET_A (BQ123; 10 pmols) e ET_B (BQ788; 10 pmols) também foram co-injetados com CGN e ET₁ a fim de caracterizar a participação da ET₁ endógena e exógena no processo nociceptivo induzido pelos mesmos. Também foram avaliados os efeitos do antagonista seletivo para TRPV1, Capsazepina (600 µg/cavidade) nos efeitos da ET₁. Tanto a ET₁ como o agonista BQ3020 (em doses de 0,3-10 pmols/cavidade) evocaram alodinia mecânica (isto é, diminuição significativa do limiar de força para retirada da cabeça). A CGN induziu significativa alodinia (CGN: $-29,0 \pm 4,1$ vs V: $6,5 \pm 1,6$ g, $P < 0,001$) e nenhum dos antagonistas da ET afetaram significativamente essa resposta quando administrados por separado. No entanto, a injeção simultânea de ambos os antagonistas com a CGN aboliu a resposta nociceptiva ($P < 0,001$). De forma semelhante, separadamente os antagonistas da ET não aboliram por completo o efeito nociceptivo da ET₁, mas foram capazes de reduzi-lo, em especial o antagonista seletivo para ET_B (ET_A $P < 0,05$; ET_B $P < 0,01$). Em todas as doses utilizadas, tanto a ET₁ como o agonista ET_B não afetaram o recrutamento de células inflamatórias para a cavidade da ATM, e nenhum dos antagonistas de ET empregados afetaram a migração celular induzida pela CGN. O antagonista seletivo para TRPV1 não foi capaz de afetar o efeito nociceptivo da ET₁ (Capsazepina $P > 0,05$). As análises da alteração das expressões gênicas tanto para a região da ATM como para o gânglio Trigeminal não apresentaram aumento significativo da expressão de nenhum dos genes analisados (PPET₁, ET_A, ET_B, ECE₁ e TRPV1), porém em ambas as regiões foram encontradas diminuições nas expressões gênicas para os receptores ET_A e ET_B (ET_A $P < 0,01$ e ET_B $P < 0,001$) para análises na ATM e ET_A e TRPV1 (ET_A e TRPV1 $P < 0,001$) para análises no gânglio. Estes resultados indicam que a ET₁ não só é capaz de evocar alodinia mecânica em doses baixas (até 10 pmols / cavidade da ATM), mas também parece estar envolvida na nocicepção induzida por CGN através de receptores ET_A e ET_B, com nenhum efeito aparente sobre a migração de leucócitos.

Palavras-chave: ET₁. Nocicepção. Dor. ATM. Receptor ET_A. Receptor ET_B. Ratos

ABSTRACT

Paula, MAV. Endothelin-1 Participation on the Rats TMJ Synovitis induced by Carrageenan [Master thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.

Temporomandibular disorders involving the temporomandibular joint (TMJ) are often associated with inflammation and secondary hyperalgesia, allodynia or referred pain. Based on previous studies showing the involvement of ET in some models of nociception, we decided to investigate the role of ET₁ in inflammation induced by the carrageenan (CGN) injection in rats TMJ. Intra-articular injections (10 µl) of CGN (500 mg), ET₁ or selective ET_B receptor agonist (BQ3020) in several different doses (0,3 to 30 pmols) were performed in the cavity of the left TMJ using sterile saline as a vehicle (V). 4 h after, the mechanical allodynia was evaluated by measuring the necessary force threshold to evocate the head withdrawal, using an electronic analgesimeter based on the Von Frey filaments principles. Then the animals were euthanized and the TMJ joint cavities washed with sterile saline in order to determine the total and differential leukocytes in the lavage fluid. Selective ET_A (BQ123, 10 pmols) and ET_B (BQ78, 10 pmols) receptors antagonists were co-injected with CGN and ET₁ in order to characterize the participation of endogenous and exogenous ET₁ in nociceptive process induced by both of them. It was also evaluated the effects of the TRPV1 selective antagonist, Capsazepin (600 µg/cavity), on the ET₁ evoked nociception. Both ET and the agonist BQ3020 (at doses of 0,3 to 10 pmols/ cavity) evoked hyperalgesia (ie, significant decrease of the necessary force threshold to evocate the head withdrawal). CGN induced significant hypernociception (CGN: vs. -29,0 ± 4,1 V: 6,5 ± 1,6 g, P<0,001) and none of the ET antagonists significantly affected this response when administered separately. However, the simultaneous injection of both antagonists with CGN abolished the nociceptive response (P<0,001). In a similar way, separately both the ET antagonists didn't abolish completely the nociceptive effect from ET₁, but they were able to reduce it, especially the selective ET_B antagonist (ET_A P<0,05; ET_B P<0,01). At all used doses, both ET₁ and ET_B agonist did not affect the recruitment of inflammatory cells into the TMJ cavity, and none of the ET antagonists affected the cell migration induced by CGN. The selective TRPV1 antagonist didn't affect the nociceptive affect of ET₁ (Capsazepin: P>0,05). The analysis of gene expression alteration for both the TMJ and the trigeminal ganglia region showed no significant increase in the expression from any of the analyzed genes (PPET₁, ET_A, ET_B, ECE₁ and TRPV1), but in both region it has been found a decrease in the genic expressions for ET_A and ET_B (ET_A P<0,01 and ET_B P<0,001) for the TMJ analysis, and for ET_A and TRPV1 (ET_A and TRPV1 P<0,001) for the ganglion analysis. These results indicate that ET₁ is not only able to evoke hyperalgesia at low doses (up to 10 pmols/ TMJ cavity), but it also appears to be involved in nociception-induced by CGN via ET_A and ET_B receptors, with no apparent effect on leukocytes migration.

Keywords: ET₁. Nociception. Pain. TMJ. ET_A receptor. ET_B receptor. Rats.

LISTA DE ABREVIACES

gua DEPC	- gua tratada com dietilpirocarbonato
AR	- Artrite reumatoide
ATM	- Articulação temporomandibular
Ca ²⁺	- Clcio
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	- Comissão de ética no Uso de Animais
CGN	- Carragenina
CGRP	- Peptdeo relacionado ao gene da calcitonina
Cp	- Crossing point
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
DTMs	- Distúrbios temporomandibulares
DTT	- Ditionitrito
ECE	- Enzima conversora de endotelina
EPM	- $\pm$ erro padrão da média
ET	- Endotelina
ET ₁	- Endotelina 1
ET ₂	- Endotelina 2
ET ₃	- Endotelina 3
ET _A	- Receptor Tipo A de endotelina
ET _B	- Receptor Tipo B de endotelina
HPRT	- Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
ICB	- Instituto de Ciências Biomédicas
IL-1 β	- Interleucina 1 β
KO	- " <i>Knock out</i> " (Deleção gênica)
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTB ₄	- Leucotrieno B ₄
MPO	- Atividade da mieloperoxidase

NK1	- Receptor Neuroquinina 1
Oligo dT	- Oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli-T)
PKC	- Proteína quinase do tipo C
PKC ϵ	- Proteína quinase do tipo C ϵ
PPET ₁	- Pre-pro-endotelina 1
proMMP-9	- Pro metaloproteinase da matiz tipo 9
q-PCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	- Ácido ribonucleico
SAL	- Solução salina
SP	- Substância P
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
TRPV1	- Receptor vaniloide sub-tipo 1
USP	- Universidade de São Paulo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Síntese das Endotelinas (ETs)	18
Figura 2 - Efeitos da injeção intra-articular de carragenina (CGN; 500 µg) na ATM de ratos sobre o limiar de força para retirada da cabeça (Painel A), e migração de leucócitos totais para a cavidade articular (Painel B).....	32
Figura 3 - Avaliação dos efeitos hipernociceptivos da Endotelina 1 na ATM de ratos.....	33
Figura 4 - Avaliação dos efeitos hipernociceptivos do agonista seletivo ET _B (BQ3020) na ATM de ratos	34
Figura 5 - Avaliação dos antagonistas de receptores de endotelinas ET _A (BQ123) e ET _B (BQ788) sobre os efeitos hipernociceptivos da carragenina na ATM de ratos.....	35
Figura 6 - Avaliação dos antagonistas de receptores de endotelinas ET _A (BQ123) e ET _B (BQ788) co-injetados com CGN na ATM de ratos, sobre infiltração de leucócitos, análise de células totais (i: ipsilateral, c: contralateral; Painel A) e diferenciais (Painel B).....	36
Figura 7 - Avaliação dos antagonistas de receptores de endotelinas ET _A (BQ123) e ET _B (BQ788) sobre os efeitos hipernociceptivos da ET ₁ na ATM de ratos	37
Figura 8 - Análise por qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) das ATMs ipsilaterais de ratos tratados com CGN.....	38
Figura 9 - Análise por qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) do Ganglio Trigeminal ipsilateral de ratos tratados com CGN.....	39
Figura 10 - Avaliação do antagonista de receptores TRPV1 (Capsazepina) sobre os efeitos hipernociceptivos da ET ₁ na ATM de ratos.....	40
Quadro 1 – Sequências dos primers utilizados para análise de q-PCR.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A articulação temporomandibular e Desordens	16
1.2 Endotelinas e seus receptores	17
1.3 Papel das endotelinas na dor e inflamação	19
1.4 Endotelinas e TRPV1 na inflamação e dor	21
1.5 Objetivos	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Animais	25
2.2 Administração de substâncias na ATM do rato	25
2.3 Avaliação da hipernocicepção	26
2.4 Lavado da ATM e contagem celular	27
2.5 Estudo da expressão gênica de PPET ₁ , ECE ₁ , ET _A , ET _B e TRPV1	28
2.5.1 Obtenção das amostras de ATM e Gânglio Trigeminal	28
2.5.2 Extração do RNA e preparação do cDNA (transcrição reversa)	28
2.5.3 Purificação e transcrição reversa (RT) do RNA total	29
2.5.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	29
2.6 Análise estatística	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Validação da Técnica	32
3.2 Avaliação dos efeitos da Endotelina 1 (ET ₁) e seu agonista seletivo ET _B (BQ3020) sobre a nocicepção e infiltração de Leucócitos	32
3.3 Avaliação dos efeitos dos Antagonistas dos receptores de Endotelina (ET) sobre a nocicepção e infiltração de Leucócitos	34
3.3.1 Avaliação sobre a inflamação induzida pela injeção intra-articular de Carragenina na ATM	34
3.3.2 Avaliação sobre os efeitos da indução na ATM com Endotelina 1 (ET ₁)	36

3.4 Análise de expressão gênica por qPCR para os genes Prepro Endotelina 1 (PPET₁), receptores ET_A e ET_B, Enzima conversora de Endotelina 1 (ECE₁) e receptor TRPV1	37
<i>3.4.1 Análise sobre a ATM de animais tratados com Carragenina (CGN)</i>	<i>37</i>
<i>3.4.2 Análise sobre o gânglio Trigeminal de animais tratados com Endotelina 1 (ET₁) na ATM</i>	<i>38</i>
3.5 Avaliação dos efeitos do Antagonista do receptor TRPV1 sobre a nocicepção induzida pela Endotelina 1 (ET₁)	39
4 DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 A articulação temporomandibular e Desordens

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial revestida externamente pela cápsula articular e delimitada internamente nos espaços supra e infradisciais, graças à presença do disco articular. Esta articulação bilateral é responsável pelos amplos movimentos da mandíbula em relação à base do crânio (Steenks e Wijer, 2005).

As desordens temporomandibulares (DTMs), são distúrbios que afetam a articulação temporomandibular (ATM), músculos da mastigação e outras estruturas faciais. Tais desordens atingem uma grande parcela da população; estudos demonstram que cerca de 50% da população apresenta algum tipo de DTM em menor ou maior grau (Okeson, 1992). Um estudo brasileiro com 28 pacientes portadores de DTMs comprovou a diminuição na qualidade de vida desses indivíduos, neste estudo ficou claro uma diminuição considerável (maior que 50%) na qualidade de atividades tais como trabalho, estudo, sono e alimentação desses pacientes (Oliveira et al. 2003), o que vem reforçar a gravidade do impacto causado por esses distúrbios. Uma das formas mais severas de DTMs é a artrite, que é caracterizada como a inflamação das estruturas articulares, e é considerada dessa maneira devido à degeneração articular provocada por ela (Atsü e Ayhan-Ardic, 2006; Nozawa-Inoue et al., 2003;; Tanaka et al., 2008), por esse motivo quadros severos desta doença ocasionam uma grande perda na qualidade de vida dos indivíduos afetados (Voog et al., 2003).

A membrana sinovial da ATM, que cobre a cápsula articular (com exceção da região em volta do disco articular e da região da cartilagem do côndilo), é formada por uma única camada de células de revestimento, conhecidas como íntima sinovial, e pela camada conjuntiva do sub-revestimento. As células do revestimento sinovial podem ser divididas em dois tipos específicos: As células do tipo A semelhantes a macrófagos, e as células do tipo B semelhantes a fibroblastos (Nozawa-Inoue et al., 2003). As células do tipo A geralmente são observadas próximas à cavidade articular e são consideradas como uma linhagem com atividade fagocítica ativa (motivo pelo qual são chamadas de macrófagos sinoviais). Nozawa-Inoue et al. (1998) demonstraram que na reação inflamatória ocorre espaçamento da camada de

revestimento sinovial e aumento do número de células do tipo A, o qual foi revertido com o desaparecimento do processo inflamatório. Em relação às células do tipo B, estudos baseados em experimentos de histoquímica e imunohistoquímica revelam que estas células secretam diversos tipos de substâncias no fluido sinovial, tais como colágenos do tipo 1 e 2, fibronectina e glicosaminoglicanas, incluindo o ácido hialurônico, o qual tem um importante papel na manutenção da viscosidade do fluido sinovial, possibilitando os movimentos suaves da mandíbula.

1.2 Endotelinas e seus receptores

As ETs são conhecidas por seu grande poder vasoconstritor, sendo seus efeitos até 10 vezes maiores que os da Angiotensina II. A família destes peptídeos de 21 aminoácidos foi inicialmente descrita por Yanagisawa e colaboradores em 1988 e é composta por três sub-tipos, ET₁, ET₂ e ET₃, sendo até hoje a ET₁ reconhecida como a mais importante em relação aos humanos, devido a sua importante atuação no sistema cardiovascular (Motte S et al., 2006; Schneider et al., 2007; Yanagisawa et al., 1988). A ET₁ é codificada pelo cromossomo 6 (Inoue et al., 1989) e está abundantemente expressa no endotélio (donde originou-se seu nome), mas também é expressa em outras células, tais como células tubulares renais, neurônios do sistema nervoso central, neurônios simpáticos pós-ganglionares, monócitos e macrófagos, e sob condições pró-inflamatórias também é produzida por células da musculatura lisa vascular (Schneider et al., 2006).

Esse peptídeo é inicialmente expresso como Pré-pró- ET₁, -ET₂ ou -ET₃ e então sofre a ação de proteases semelhantes à furina que as convertem em BIG ET₁, ET₂ ou ET₃, as quais são transformadas em ET₁, ET₂ ou ET₃ pela ação das Enzimas Conversoras de Endotelina (ECE). Estas enzimas apresentam-se como duas isoformas, ECE₁ e ECE₂, agindo tanto sobre os seus respectivos substratos (Big ET₁ e ET₂), como sobre a Big ET₃ também (Figura 1).

Figura 1 - Síntese das Endotelinas (ETs). Síntese das ET-1, 2 e 3 através da ação das enzimas conversoras 1 e 2 (ECE-1 e -2)

Fonte: Paula (2012)

Até os dias de hoje foram encontrados dois subtipos de receptores para as ETs, sendo eles os receptores de Endotelina A e B (ET_A e ET_B , respectivamente), que são receptores acoplados a proteína G, o que lhes proporciona uma grande variedade de efeitos. Destes receptores, o ET_A possui maior afinidade para ET_1 e ET_2 do que para ET_3 , enquanto o ET_B possui igual afinidade para todas as ETs (Kedzierski and Yanagisawa, 2001).

Para os receptores ET_A trabalhos da literatura vem tentando sugerir um modelo que explique a ligação quase irreversível encontrada entre esse receptor e seu agonista, como comprovado por De Mey et al. (2009) usando ensaios de dissociação com ET_1 marcada radioativamente, onde demonstrou-se uma taxa de dissociação 100 vezes menor que sua taxa de associação, o que evidenciou uma forte ligação entre o receptor ET_A e seu agonista. Um modelo proposto para explicar essas observações indica que o receptor ET_A possua em seu sítio de ligação mais de um domínio funcional, o que permite supor que o complexo receptor-agonista (ET_1 - ET_A) possua uma ou mais conformações antecessoras (Hilal-Dandan et al., 1997), assim sendo esta forma antecessora seria necessária para a subsequente formação do complexo quase irreversível ET_1 - ET_A (De Mey et al., 2011).

De Mey et al. (2011) ainda propõem que o agonista ET seria composto por duas regiões funcionais, uma delas responsável pela associação da molécula ao receptor em um de seus domínios enquanto a segunda ficaria concentrada a se ligar ao outro domínio de forma forte e quase irreversível e esta então ativaria o receptor. A viabilidade deste modelo pode ser baseada na flexibilidade da molécula agonista de ET, que é essencial para a interação das duas regiões do agonista com a molécula receptora ET_A, e que se dá pelas duas regiões ativas estarem separadas por uma haste flexível semelhante a uma articulação (Lattig et al., 2009).

Essas características de forte ligação somadas a lenta dissociação do agonista com o receptor são responsáveis pelos efeitos de grande duração observado pela ET (De Mey et al., 2011).

1.3 Papel das endotelinas na dor e inflamação

Considerando que a artrite na ATM é caracterizada por uma inflamação, como já descrito acima, é importante ressaltar que em condições inflamatórias há a liberação de substâncias que sensibilizam fibras nervosas e, como consequência, levam a dor. As ETs encontram-se dentre as substâncias que compõem a família dos mediadores inflamatórios.

A participação das ETs como mediadores inflamatórios foi primariamente demonstrada por Bertelli et al. (1992). Reforçando esse achado, Miyasaka et al. (1992) observaram a secreção aumentada de ET₁ em condição inflamatória em pacientes com artrite reumatóide (AR), osteoartrite ou artrite gotosa. Os autores ainda encontraram no fluido sinovial desses pacientes, níveis mais elevados de ET₁ do que aqueles encontrados normalmente no plasma. Além disso, o nível plasmático de ET₁ apresentava-se aumentado durante as crises de AR quando comparados com os níveis encontrados no período de ausência de crises (Miyasaka et al., 1992).

Na revisão de Hans, et al. (2009) é relatado que a injeção intra-plantar de doses variadas de ET₁ na pata de ratos, os leva a experimentar sensações dolorosas que variam de acordo com as doses aplicadas. Desta forma, a administração intraplantar de doses altas de ET₁ (entre 2 a 20 nmols) foram capazes de evocar comportamento de dor evidente (Gokin et al., 2001; Houck et al., 2004; Khodorova et al., 2002;). Por outro lado, concentrações menores (entre 10 pmols à 600 pmols) apenas foram capazes de causar uma sensibilização primária da pata

alodinia mecânica (Balonov et al., 2006; Menendez et al., 2003; Piovezan et al., 1998). Aparentemente, ambos os receptores da ET (ET_A e ET_B) tem participação na dor evocada por esse peptídeo. Estudos de Khodorova et al. (2006) apresentam dados que mostram que o pré-tratamento com agonistas ET_A e ET_B separadamente teve um efeito limitado ao inibir a alodinia causada pela ET_1 , mas que de forma conjunta foram capazes de abolir completamente os efeitos. Corroborando esse achado, vemos uma grande diferença entre a sensibilização causada por baixas concentrações de ET_1 quando comparadas a dor evidente causada por altas concentrações da mesma. A diferença nesse ponto é que a sensibilização é suprimida somente pelo bloqueio de ambos os receptores ET_A e ET_B (Baamonde et al., 2004; Balonov et al., 2006), enquanto a dor evidente é inibida apenas pelo bloqueio do receptor ET_A , da mesma forma que ocorre com todas as respostas pró-algésicas envolvendo ET_1 (Baamonde et al., 2004; Davar et al., 1998; De-Melo et al., 1998; ; Gokin et al., 2001; Mckelvy et al., 2007; Mujenda et al., 2007; Raffa et al., 1996).

Existem relatos, como os de Piovezan et al. (2000), Khodorova et al. (2002, 2003), indicando que o bloqueio do receptor ET_B seria capaz de potencializar os efeitos de dor evidente ocasionados por concentrações elevadas de ET_1 injetadas por via intra-plantar. Tal fato é explicado pela ação analgésica gerada pela ativação do receptor ET_B em queratinócitos de pele glabra, que levariam à liberação de β -endorfinas, que agindo em receptores μ -opióides, resultam em um efeito analgésico que amenizaria os efeitos da ativação de ET_A .

De-Mello et al. (1998) utilizaram um modelo de artrite de joelho de ratos, no qual os animais recebem previamente uma injeção de carragenina (CGN) nos joelhos e são desafiados com LPS após 72 h, e os antagonistas ET_A e ET_B (BQ123 e BQ788, respectivamente) são injetados nas cavidades articulares. Diferentemente dos relatos acima citados, estes pesquisadores observaram que os efeitos nociceptivos causados da forma descrita foram bloqueados pelo antagonista ET_B , mas não ET_A . Entretanto, o grupo ainda demonstrou que em joelhos de ratos, os efeitos nociceptivos secundários à injeção de ET_1 eram bloqueados pela co-injeção deste peptídeo com antagonista ET_A (mas não ET_B), enquanto os efeitos nociceptivos secundários à injeção de CGN eram apenas bloqueados pela injeção concomitante de ambos antagonistas, demonstrando as variações de mecanismos de ação das ETs de acordo com o modelo empregado para o seu estudo.

Em relação à inflamação, as ETs não se mostram atuantes somente na nocicepção, mas elas também parecem apresentar papel importante na formação de edema e migração de neutrófilos. Brandli et al. (1995) mostrou que o antagonista seletivo de receptor ET_B (RO 46-8443), mas não o de receptor ET_A (BQ 123), foi capaz de prevenir o extravasamento de proteína plasmática na dura máter. Além disso, em modelo de artrite induzida por zimosa, Conte et al. (2008) concluíram que a participação das ETs na formação de edema e migração de neutrófilos está ligada à modulação da produção de $TNF-\alpha$, LTB_4 e quimiocinas derivadas de queratinócitos. Toffoli et al. (2007) em experimentos realizados em culturas de células endoteliais humanas, utilizando neutrófilos e inibidores da enzima conversora de ET (ECE), detectaram uma importante participação das ETs na regulação das funções de neutrófilos, tais como ativação e liberação de LTB_4 e proMMP-9. Além disso, segundo o mesmo grupo, essa regulação pode estar ligada a ação de ET sobre o receptor ET_A , o que foi demonstrado pelo uso de antagonista seletivo ET_A (BQ123), o qual reduziu significativamente os parâmetros analisados.

1.4 Endotelinas e TRPV1 na inflamação e dor

Os mecanismos detalhados dos efeitos citados acima ainda permanecem obscuros, em especial aqueles envolvendo a participação das ETs na dor; porém, diversos trabalhos vem correlacionando as ações induzidas pelas ETs com a ativação de receptores vanilóides do sub-tipo 1 “transient receptor potential vanilloid type 1” ou TRPV-1 (Chichorro et al., 2010; Kawamata et al., 2008, 2009). Desta forma, Kawamata et al. (2009) observaram que a injeção intra-plantar de ET_1 foi capaz de evocar comportamento de dor via receptor ET_A de forma dependente de TRPV-1.

O TRPV-1 é um canal catiônico não seletivo, que pode ser ativado por ligantes (como a capsaicina), pelo calor (temperatura acima dos 43 °C), pelo aumento de acidez no meio (concentrações aumentada de H^+) e lipídios denominados endovanilóides (Palazzo et al., 2010). O receptor TRPV-1 é expresso em todos os gânglios sensoriais (gânglios da raiz dorsal, gânglio trigeminal e vagal) e em pequenas fibras sensoriais do tipo C e A δ , as quais contêm vários neuropeptídeos, incluindo a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

(CGRP). Essas fibras terminam predominantemente na superfície das lâminas I e II do corno dorsal.

Recentemente Chichorro et al. (2010) observaram a presença de receptores TRPV-1 no gânglio trigeminal através de ensaios de imunohistoquímica, além da presença de receptores ET_A e ET_B e a co-localização desses receptores com 30% dos receptores TRPV-1. Os resultados encontrados por estes pesquisadores vem reforçar a ideia de que haja uma ligação direta entre os efeitos evocados pela ETs na nocicepção e receptores TRPV-1.

Da mesma forma Balonov et al. (2006) indicam a participação do receptor TRPV-1 na manutenção da alodinia local causada pela injeção subdérmica de ET_1 na pata de ratos, já que os antagonistas testados por eles (capsazepina e 5'-iodoresiniferatoxina) foram apenas capazes de amenizar os efeitos tardios causados pela ET_1 , mas não os seus efeitos iniciais. Além disso, a participação do receptor TRPV-1 aparentemente não ocorre no comportamento de dor evidente gerado por doses altas de ET_1 , o que sugere que existam vias diferentes participando desses eventos, o que é sustentado pela falta de ação do antagonista TRPV-1 no teste comportamental de dor evidente realizado pelo grupo.

A contribuição dos receptores TRPV-1 na hipernocicepção térmica causada pela ET_1 foi comprovada por Kawamata et al. (2008) através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, nos quais fica claro a participação ativa de TRPV-1 através do uso de camundongos KO para esses receptores e de células que não expressavam tal receptor. Foi mostrado que a hipernocicepção térmica depende da ativação do receptor ET_A , e que além disso, existe uma íntima relação entre a ativação de ET_A e a fosforilação de TRPV-1 por PKC, caracterizada em ensaios utilizando os antagonistas da PKC, bisindolylmaleimide X (BIM X). Desta forma, neste modelo a hiperalgesia térmica provocada por ET_1 mostrou-se dependente da ativação de ET_A , que por sua vez passa a ativar TRPV-1 via fosforilação deste mediada por PKC. Entretanto, este não foi o mecanismo encontrado nos ensaios realizados por Kawamata et al. (2009), nos quais a indução de dor provocada na pata pela ET_1 foi dependente de receptor ET_A e TRPV1, mas independente de PKC. Esses achados demonstram os possíveis mecanismos envolvidos na ação das ETs sobre a dor, sendo esses aparentemente dependentes do tecido e técnicas utilizadas.

Em trabalho anterior, nosso grupo mostrou a relação existente entre os receptores NK1 e o processo inflamatório induzido pela CGN quando injetada na

ATM de ratos, observando que o bloqueio deste receptor, utilizando o antagonista SR140333 administrado por via sub-cutânea, foi capaz de diminuir o extravasamento plasmático, a atividade da mieloperoxidase (MPO), o influxo de células mononucleares e os níveis de TNF- α e IL-1 β na cavidade, mas não afetou de forma significativa a alodinia mecânica induzida pela injeção de CGN (Denadai-Souza et al., 2009).

1.5 Objetivos

Considerando os conceitos acima sobre as ETs e a ATM, e a falta de estudos prévios sobre a participação das ETs sobre a inflamação e dor secundária na ATM, os objetivos deste trabalho são:

- Caracterizar as ações de ETs endógenas e os receptores envolvidos na inflamação na ATM induzida por carragenina (CGN), avaliando parâmetros como hiperalgesia (alodinia mecânica) e recrutamento de leucócitos na cavidade articular, empregando antagonistas específicos de receptores ET_A e ET_B;
- avaliar os efeitos da injeção intra-articular na ATM de ET₁ e seu agonista seletivo ET_B, sobre a hiperalgesia e recrutamento de leucócitos;
- estudar possíveis alterações na expressão gênica de ET₁, enzima conversora de ET₁ (ECE₁) e seus receptores ET_A e ET_B, na artrite de ATM induzida pela administração intra-articular de CGN.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adulto-jovens (180 a 200 g de peso corporal) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) - Universidade de São Paulo (USP). Os animais, durante os procedimentos experimentais, foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, separados em grupos de 5 animais, alimentados com ração sólida e água potável *ad libitum*, respeitando períodos cíclicos de 12/12 horas de claro e escuro e temperatura ambiente de 22 °C. Os procedimentos de manutenção e manipulação dos animais estiveram de acordo com as normas estabelecidas pelo guia de cuidados dos animais estabelecidos no “Canadian Council on Animal Care”. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB - USP previamente à sua execução sob o número de protocolo 46, livro 2 e página 85.

2.2 Administração de substâncias na ATM do rato

Animais previamente anestesiados por via inalatória com halotano (3% v/v em O₂) foram submetidos à tricotomia da pele adjacente à região da ATM esquerda. As substâncias foram injetadas na ATM esquerda com o emprego de uma microseringa Hamilton para cromatografia modelo 702RN (volume de 25 µl) que tinha acoplada uma agulha de anestesia gengival (30G) como previamente descrito (Denadai-Souza et al., 2009). O bisel da agulha foi posicionado sobre a borda posterior do arco zigomático e, através de uma leve pressão, deslizou sobre o arco zigomático e penetrou trans-cutaneamente em direção ao espaço supra-discal da ATM. As substâncias foram injetadas quando a penetração da agulha cessou devido à resistência da fossa glenóide. Em todos os experimentos o volume injetado na articulação foi de 10 µL.

Primeiramente foram avaliadas as respostas à ET₁, e em seguida ao agonista seletivo ET_B (BQ3020), ambos nos mesmos moldes, 10 µl de ET₁ ou BQ3020 retirados de 5 soluções com diferentes concentrações, 0,03; 0,1; 0,3; 1 e 3 µM, todas as soluções preparadas em solução salina (SAL) estéril, gerando assim doses

de 0,3; 1; 3; 10 e 30 pmols por cavidade. O grupo controle recebeu o veículo SAL (10 µl). Além disso foram avaliadas também o papel dos receptores de ET sobre os efeitos da ET₁, para tal foram administrados concomitantemente ET₁ (na dose de 1 pmol/cavidade) somada aos antagonistas ET_A (BQ123) e ET_B (BQ788), ambos na dose de 10 pmols/ cavidade.

A seguir, procurou-se avaliar o papel da ET₁ endógena na resposta à inflamação secundária à carragenina (CGN). Para tanto, realizou-se a co-injeção de CGN (na dose de 500 µg) com os antagonistas específicos para receptor ET_A (BQ123; 10 pmol/cavidade) e ET_B (BQ788; 10 pmol/cavidade), tanto de forma individual como combinada, sempre mantendo o volume injetado em 10 µl.

Por último foi analisado a possível interação entre a ação da ET₁ e o receptor TRPV1 utilizando-se de uma injeção intra-articular do antagonista Capsazepina (600 µg/cavidade em uma solução de 10 µL contendo 50% Salina e 50% DMSO) 30 minutos antes da indução com ET₁ (dose de 1 pmol/ cavidade).

2.3 Avaliação da hipernocicepção

A alodinia mecânica foi estimada pelo comportamento de retirada da cabeça ou reflexos dolorosos do animal em resposta à aplicação superficial de uma força de intensidade crescente na ATM. Em nosso estudo, utilizamos um analgesímetro digital desenvolvido pela empresa Insight (Ribeirão Preto, SP, Brasil), o qual é baseado em um sistema de transdução digital que registra a força máxima aplicada ao animal até o momento de sua resposta.

Os animais foram transferidos para gaiolas individuais onde foram mantidos previamente por vinte minutos e, em seguida, condicionados a receber estímulos mecânicos bilaterais nas ATMs durante quatro dias consecutivos. No quinto dia, foi obtido o valor basal (média de três medidas) de cada ATM. Os animais foram então anestesiados com halotano, submetidos à tricotomia da face e posteriormente as substâncias utilizadas no presente estudo foram administradas por via intra-articular (i.art.) na ATM esquerda (ipsilateral).

Após 4 horas, foram realizadas novas medidas e, assim como na obtenção dos valores basais, para cada animal foi registrado o limiar da resposta de retirada da cabeça ou reflexo doloroso (em g) resultante da média de três medidas

consecutivas. A diferença entre a média basal e a média registrada 4 h após a injeção do estímulo (Δ) foi utilizada como medida da alodinia mecânica.

2.4 Lavado da ATM e contagem celular

Após o intervalo de 4 h seguintes à injeção do estímulo, os animais dos diferentes grupos experimentais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical. A pele sobre a região da ATM, assim como a musculatura da região, foram removidas afim de expor a cápsula articular da ATM, e com o auxílio de uma agulha ultrafina (30G) acoplada a uma seringa de 0,7 ml (Becton Dickinson®, Franklin Jersey, NJ, EUA), 50 μ l de solução salina estéril foram injetados lentamente na cavidade articular da ATM. O volume da solução injetada foi subsequentemente aspirado e o processo foi repetido, perfazendo um volume de lavado de aproximadamente 100 μ l.

As amostras de lavado articular foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm (1.000 g) a 4 °C (centrífuga Cientec, modelo CT-1500R). Os sobrenadantes foram separados e armazenados a -80 °C para possíveis futuros ensaios. Ao *pellet* de leucócitos foram adicionados 200 μ l de SAL estéril e as células foram cuidadosamente ressuspensas. Para a contagem total de células, 10 μ l das suspensões foram adicionadas ao volume de 190 μ l da solução de Turk (cristal violeta 0,2% em solução aquosa de ácido acético 30%) e o número total de células foi determinado usando uma câmara de Neubauer; os valores foram expressos como número de células $\times 10^4$ / cavidade. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se uma citocentrífuga (Mod 2400; Fanem; São Paulo, SP) e as lâminas foram posteriormente coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa. As células presentes no lavado foram diferenciadas de acordo com a morfologia de seus núcleos em mononucleares e polimorfonucleares, com auxílio de microscópio de luz comum. Os resultados foram expressos em número de células de cada tipo celular $\times 10^4$ / cavidade.

2.5 Estudo da expressão gênica de PPET-1, ECE-1, ETA, ETB e TRPV1 na ATM

2.5.1 Obtenção das amostras de ATM e Gânglio Trigeminal

As amostras de ATM foram obtidas conforme previamente relatado por Denadai-Souza (2009), além disso foram obtidas também amostras dos gânglios do Trigeminal de animais previamente tratados com CGN (5%). Os animais foram mortos por uma super dosagem de hidrato de cloral a 10% (i.p.) seguido de deslocamento cervical. Em seguida, a ATM e os gânglios do Trigeminal ipsilateral (lado correspondente à ATM tratada) e contralateral (lado oposto), foram removidas, congeladas imediatamente em gelo seco e armazenadas em tubos contendo 1 mL e 500 µL, respectivamente, de reagente para extração de RNA (TRIzol™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em freezer a -80 °C.

2.5.2 Extração do RNA e preparação do cDNA (transcrição reversa)

O RNA total das ATMs e dos gânglios do Trigeminal foi extraído com TRIzol™ (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. De forma sucinta, as amostras foram homogeneizadas em Trizol (1 mL/100 mg de tecido) através de 20 ciclos de homogeneização empregando-se homogeneizador com haste revestida de politetrafluoroetileno (cat# 11-850-59, Fisher Scientific). Após 5 minutos, adicionou-se 200 µl de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1 v/v). Após agitação vigorosa para a extração dos lipídios, os tubos foram deixados em repouso por 10 min e posteriormente centrifugados a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Dessa forma, obtiveram-se três fases: a fase aquosa que contém os RNAs (superior), uma fase turva que contém os DNAs (intermediária) e uma fase sólida inferior (precipitado) que contém proteínas e lipídios. A fase aquosa sobrenadante (300 µl) foi separada e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 min a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (12.000 g, durante 10 min a 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado de RNA foi lavado com 500 µl de etanol 95%. Após centrifugação (7.000 g, durante 5 min a 4 °C), os sobrenadantes foram desprezados, e os precipitados lavados novamente com etanol a 75%, centrifugados (7.000 g, durante 5 min a 4 °C) e os tubos foram invertidos e apoiados sobre papel de filtro para eliminar os restos de etanol. Finalmente, o precipitado foi

dissolvido com 30 µl de água tratada com DEPC.

Para a quantificação do RNA total, as amostras foram diluídas 1:500 em água Milli-Q autoclavada e suas absorbâncias medidas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience, Inglaterra). As concentrações de RNA total foram calculadas em µg/µl.

Amostras contendo 1 µg de RNA foram submetidas à eletroforese (voltagem fixada em 70 V) em gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA extraído, o qual foi relacionado à qualidade das bandas de RNA correspondentes às subunidades ribossomais 18S e 28S.

2.5.3 Purificação e transcrição reversa (RT) do RNA total

Primeiramente, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase e para tanto, 3 µg de RNA total foram diluídos com água tratada com DEPC (q.s.p. 9 µL), aquecidas a 37 °C por 10 min e em seguida a 75 °C por 5 min com uma mistura contendo: 1 µL de inibidor de RNases (RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor, Fermentas Life Science Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), 1 µL de DNase (Dnase I, Fermentas Life Science Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de oligo dT (100 µM, Fermentas Life Science Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), 2 µL de DTT (0,1M) e 1 µL de dNTPs (10 mM, Fermentas Life Science Inc, Glen Burnie, Maryland, USA). Em seguida, as amostras foram deixadas à 37 °C por 10 min.

A transcrição reversa foi realizada incubando-se o RNA tratado com DNase com 1 µL da enzima transcriptase reversa (RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas Life Science Inc, Glen Burnie, Maryland, USA) a 37 °C durante 1 h, seguido de 5 min a 75 °C e 2 min a 37 °C. Os produtos de cDNA obtidos foram mantidos a –20 °C até serem utilizados.

2.5.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Os primers para Prepro ET₁, ET_A, ET_B, ECE₁, TRPV1 e HPRT (hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, utilizado como gene normalizador) foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (desenvolvido por Steve Rozen e Helen J. Skaletsky) e disponível online em <http://frodo.wi.mit.edu>. Os primers foram

selecionados de acordo com as seguintes características: composição entre 18 e 24 bases (ótimo entre 20-22), temperatura de fusão (melting; $-T_m$) entre 59,5 e 60,5 °C (ótima T_m 60 °C), conteúdo de G+C entre 40 e 60% (ótimo 50%) e produtos de amplificação entre 80-150 pares de bases (pb). As sequências selecionadas foram analisadas com relação à especificidade do gene utilizando o programa BLAT (<http://genome.ucsc.edu>).

As seqüências dos primers utilizados são mostradas no quadro abaixo:

Quadro 1 – Sequências dos primers utilizados para análise de q-PCR

Gene	Sequências	Tamanho do Produto (pb)
HPRT	AAG CTT GCT GGT GAA AAG GA TGA TTC AAA TCC CTG AAG TGC	123
PPET₁	GTT TGT GGC TTT CCA AGG AG GGC TCT GCA CTT CCT TCT CA	82
ECE₁	AGC CCT AGG CAT CCA GTA CC GGA GTT TAG GAT GGA GCT GGT	88
TRPV1	TAT ACC CGA GGA TTC CAG CA AAC ATA AAC CGG CAC AGG TC	83
ET_A	CCC TTT TTG CAG AAG TCG TC GGA AGC CAC TGC TCT GTA CC	84
ET_B	GCA GGA TTC TGA AGC TCA CC GCG ATT GGA TTA ATG CAG GA	130

Fonte: criado por Muscará (2010) com permissão

Como controle negativo, reações foram realizadas na ausência de cDNA cada reação foi realizada em duplicata e continha 3 µL de cDNA diluído 10 vezes, 6 µL de SyBr Green Master mix (SYBR Green ROX Mix, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 300 nM (concentração final) de primers. O protocolo consistiu de uma etapa de 10 min de desnaturação a 95 °C e 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 30 s e 60 °C por 1 min. O “crossing point” (Cp) em que é a eficiência dos pares de primers de cada reação foram estabelecidos automaticamente de acordo com algoritmos do sistema do termociclador utilizado (Mx3005P® qPCR System, Stratagene, São Paulo, SP, Brasil). A expressão gênica relativa do gene de interesse foi normalizado em relação ao HPRT, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ através da equação $2^{-[\Delta Ct (\text{teste}) - \Delta Ct (\text{HPRT})]}$ de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Considerando o valor do grupo veículo como 1 os dados foram expressos como a média $\pm$ E.P.M.

2.6 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) obtidos de n valores (onde n representa o número de animais usados em cada grupo experimental). Usando o programa GraphPad 4.0 (GraphPad Software Corporation, San Diego, CA, EUA) os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações, ou Dunnett, quando apropriado. Diferenças entre pares de grupos foram analisados pelo teste t de Student. Diferenças entre grupos com valores de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3 RESULTADOS

3.1 Validação da Técnica

A injeção intra-articular de CGN na ATM (esquerda) dos animais resultou em significativa sensibilização da região conforme demonstrado pela avaliação do limiar de força necessária para desencadear a reação de esquiva (retirada da cabeça) após intervalo de 4 horas, e como mostrado na Figura 2 A ($P < 0,001$ vs grupo controle, veículo solução salina).

A contagem de células totais no lavado articular retirado da ATM dos animais 4 h após a injeção de CGN foi significativamente maior ($P < 0,05$) da obtida no lavado articular da ATM contralateral (a qual não recebeu qualquer tratamento ou injeção; Figura 2B).

Figura 2 - Efeitos da injeção intra-articular de carragenina (CGN; 500 μ g) na ATM de ratos sobre o limiar de força para retirada da cabeça (Painel A), e migração de leucócitos totais para a cavidade articular (Painel B).

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student e estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M). *** $P < 0,001$ vs Veículo (SAL); * $P < 0,05$ vs lado Contralateral (CONTRA).

Fonte: Paula (2012)

3.2 Avaliação dos efeitos da Endotelina 1 (ET_1) e seu agonista seletivo ET_B (BQ3020) sobre a nocicepção e infiltração de Leucócitos

A injeção intra-articular de ET_1 em diferentes doses (entre 0,3 e 30 pmols) foi capaz de sensibilizar a região da ATM dos animais, o que foi comprovado pela

avaliação do limiar de força necessária para provocar a reação de retirada da cabeça dos animais, como ilustrado na Figura 3. As doses de 1 e 3 pmols apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em relação ao grupo tratado com veículo (solução salina), enquanto que as doses maiores, apesar da diminuição do limiar, não tiveram efeito estatisticamente significativo sobre esta medida.

Figura 3 - Avaliação dos efeitos hipernociceptivos da Endotelina 1 na ATM de ratos.

Dados analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguido do teste Student Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os dados estão expressos com média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). ** $P < 0,01$ vs Veículo (SAL).

Fonte: Paula (2012)

Quanto à infiltração de leucócitos na cavidade (avaliada através da contagem do número total destas células totais no lavado sinovial), a injeção de ET_1 na cavidade articular nas diferentes doses não induziu recrutamento de leucócitos tanto nas articulações ipsilaterais (tratadas) quanto nas contralaterais (não tratadas).

Semelhantemente à ET_1 , o agonista seletivo ET_B (BQ3020) foi capaz de produzir uma diminuição do limiar de força necessária para levar a reação de retirada da cabeça dos animais tratados com as diferentes doses desses agonistas (entre 0,3 e 30 pmols) como observado na Figura 4. De forma similar ao observado com a ET_1 , a maior dose injetada de BQ3020 não causou hiperalgesia mecânica.

Da mesma forma como observado com a ET₁, a injeção do agonista ET_B (BQ3020) não apresentou qualquer efeito sobre o acúmulo de células inflamatórias na cavidade articular em todas as doses testadas.

Figura 4 - Avaliação dos efeitos hipernociceptivos do agonista seletivo ET-B (BQ3020) na ATM de ratos.

Dados analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguido do teste de Student Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os dados estão expressos com média ± erro padrão da média (E.P.M). ***P<0,001 vs Veículo (SAL).

Fonte: Paula (2012)

3.3 Avaliação dos efeitos dos Antagonistas dos receptores de Endotelina (ET) sobre a nocicepção e infiltração de Leucócitos

3.3.1 Avaliação sobre a inflamação induzida pela injeção intra-articular de Carragenina na ATM

A co-administração intra-articular de cada um dos antagonistas BQ123 e BQ788 com a CGN não afetou significativamente a resposta da CGN em reduzir o limiar de força necessária para evocar o comportamento de retirada da cabeça (Figura 5). Entretanto, quando a CGN foi co-injetada com ambos antagonistas, o efeito da CGN foi abolido (P<0,001 vs grupo CGN).

A injeção intra-articular de CGN promoveu aumento significativo do número de

leucócitos totais que migraram para a cavidade ($P<0,001$); entretanto, nenhum dos antagonistas utilizados teve qualquer efeito significativo sobre este parâmetro quando co-injetado com a CGN, tanto de forma individual como conjunta (Figura 6A).

O número de células polimorfonucleares mostrou-se significativamente aumentado no lavado dos animais que receberam CGN em relação aos tratados com veículo (solução salina; $P<0,05$; Figura 6B); contudo, nenhum dos tratamentos com os antagonistas apresentou qualquer efeito significativo sobre o número de células polimorfonucleares. Quanto ao número de células mononucleares, não houve qualquer diferença significativa entre os grupos (apesar do maior número médio destas células observada em todos os grupos que receberam CGN; Figura 6B).

Figura 5 - Avaliação dos antagonistas de receptores de endotelinas ETA (BQ123) e ETB (BQ788) sobre os efeitos hipernociceptivos da carragenina na ATM de ratos.

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguido do teste Student Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os dados estão expressos com média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). *** $P<0,001$ vs Veículo (SAL); ## $P<0,01$ e ### $P<0,001$ vs BQ123+BQ788.

Fonte: Paula (2012)

Figura 6 - Avaliação dos antagonistas de receptores de endotelinas ETA (BQ123) e ETB (BQ788) co-injetados com CGN na ATM de ratos, sobre infiltração de leucócitos, análise de células totais (i: ipsilateral, c: contralateral; Painei A) e diferenciais (Painei B).

Os dados foram analisados por teste ANOVA de uma via seguido do teste Dunnett para comparação dos diferentes grupos com controle (CGN) e expressos com média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). * $P < 0,05$ vs CGN.
Fonte: Paula (2012)

3.3.2 Avaliação sobre os efeitos da indução na ATM com Endotelina 1 (ET₁)

A co-administração intra-articular de cada um dos antagonistas BQ123 e BQ788 com a ET₁ não afetou significativamente a resposta da mesma em reduzir o limiar de força necessária para induzir a reação de retirada da cabeça dos animais em relação ao grupo controle Salina, porém ambos os grupos tratados com os antagonistas se mostraram diferentes do grupo tratado com ET₁ ($P < 0,05$ para BQ123 vs ET₁ e $P < 0,01$ para BQ788 vs ET₁; Figura 7). Entretanto, quando a ET₁ foi co-injetada com ambos antagonistas, o efeito da mesma foi completamente abolido ($P < 0,001$ vs grupo ET₁).

Figura 7 - Avaliação dos antagonistas de receptores de endotelinas ETA (BQ123) e ETB (BQ788) sobre os efeitos hipernociceptivos da ET-1 na ATM de ratos.

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguido do teste Student Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os dados estão expressos com média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). ###P<0,01 e ####P<0,001 vs Veículo (SAL); *P<0,05 e **P<0,01 vs ET-1.

Fonte: Paula (2012)

3.4 Análise de expressão gênica por qPCR para os genes Pré-pró-Endotelina 1 (PPET₁), receptores ET_A e ET_B, Enzima conversora de Endotelina 1 (ECE₁) e receptor TRPV1

3.4.1 Análise sobre a ATM de animais tratados com Carragenina (CGN)

As análises de expressão gênica por q-PCR mostram que não há diferença estatística na expressão dos genes que codificam PPET₁, ECE₁ e TRPV1, entre os animais tratados com CGN e o grupo controle (P>0,05; Figura 8, painéis A, D e E). Entretanto, a expressão gênica dos receptores ET_A e ET_B mostraram-se reduzidas nas ATMs dos animais que receberam CGN em comparação com os animais controle (P>0,01 para ET_A e P>0,001 para ET_B; Figura 8, painéis B e C).

Figura 8 - Análise por q-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) das ATMs ipsilaterais de ratos tratados com CGN.

Painel A: Pre-pró Endotelina 1 (PPET1), painel B: receptor ET_A, painel C: ET_B, painel D: Enzima Conversora de ET1 (ECE1), painel E: TRPV1. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste do t de Student para dados não pareados. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). ***P<0,001 vs Grupo controle. Fonte: Paula (2012)

3.4.2 Análise sobre o gânglio Trigeminal de animais tratados com Endotelina 1 (ET₁) na ATM

As análises de expressão gênica por q-PCR mostram que não há diferença estatística na expressão dos genes que codificam PPET₁, ET_B e ECE₁, entre os animais tratados com CGN e o grupos controle (P>0,05; Figura 9, painéis A, C e D). Entretanto, a expressão gênica dos receptores ET_A e ET_B mostraram-se reduzidas nas ATMs dos animais que receberam CGN em comparação com os animais controle (P>0,01 para ET_A e P>0,001 para ET_B; Figura 9, painéis B e C).

Figura 9 - Análise por q-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) do Ganglio Trigeminal ipsilateral de ratos tratados com CGN.

Painel A: Pre-pró Endotelina 1 (PPET1), painel B: receptor ETA, painel C: ETB, painel D: Enzima Conversora de ET1 (ECE1), painel E: TRPV1. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste do t de Student para dados não pareados. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). *** $P < 0,001$ vs Grupo controle. Fonte: Paula (2012)

3.5 Avaliação dos efeitos do Antagonista do receptor TRPV1 sobre a nocicepção induzida pela Endotelina 1 (ET₁)

A administração intra-articular prévia do antagonista do receptor TRPV1 (Capsazepina) seguida após 30 minutos da administração também intra-articular de ET₁ não afetou significativamente a resposta da mesma em reduzir o limiar de força necessária para induzir a reação de retirada da cabeça dos animais em relação ao grupo controle SAL ($P < 0,001$ vs Grupo Salina; Figura 10).

Figura 10 - Avaliação do antagonista de receptores TRPV1 (Capsazepina) sobre os efeitos hipernociceptivos da ET-1 na ATM de ratos.

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguido do teste Student Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os dados estão expressos com média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). ^{##}P<0,01 e ***P<0,001 vs Sal. Fonte: Paula (2012)

4 DISCUSSÃO

No presente estudo observamos que a injeção intra-articular de doses baixas de ET_1 (entre 1 e 3 pmols/cavidade) ou do agonista seletivo ET_B (entre 0,3 e 10 pmols/cavidade) na ATM de ratos causa diminuição no limiar de força para retirada da cabeça dos animais, o que indica um comportamento de hipernocicepção, assim como mostrado em diversos trabalhos já publicados em modelos de edema na pata e artrite no joelho, entre outros (para revisão vide Hans et al., 2009).

Das doses de ET_1 testadas, as correspondentes a 1 e 3 pmols foram as que resultaram nos efeitos mais evidentes e, apesar de não ter apresentado significância estatística, a dose de 10 pmols também mostrou atividade nociceptiva. Com relação ao agonista ET_B BQ3020, observamos falta de relação das doses utilizadas com os efeitos observados, com exceção da dose mais alta (30 pmols), a qual não apresentou efeito nociceptivo. Dentro do intervalo de doses testado, a falta de relação entre as doses do agonista BQ3020 e efeito nociceptivo, pode ser um indício de uma maior participação do receptor ET_B nos efeitos nociceptivos da ET_1 , já que este receptor poderia ser ativado com doses ainda menores de 0,3 pmols/cavidade.

Para testar esta hipótese foi analisada a ação de uma dose de ET_1 juntamente com os antagonistas de seus receptores ET_A e ET_B , separadamente e de forma conjunta. Assim, observamos que, separadamente, nenhum dos antagonistas foi capaz de abolir (mas sim de reduzir parcialmente) os efeitos nociceptivos da ET_1 , sendo que o antagonismo do receptor ET_B teve efeito mais intenso do que o do receptor ET_A , o que reforça a hipótese de uma maior participação do receptor ET_B em relação a nocicepção evocada pela ET_1 . Porém, o efeito nociceptivo da ET_1 foi completa completamente inibido pelo uso concomitante de ambos os antagonistas, o que deixa claro a participação destes receptores nos efeitos da ET_1 observados na ATM de ratos.

Nem a ET_1 nem o agonista ET_B BQ3020 foram capazes de sensibilizar os animais na dose mais alta de 30 pmols/cavidade. Alguns trabalhos mostram que, dependendo das características do tecido alvo, as ETs podem ter efeitos analgésicos mediados por receptores ET_A e ET_B (Khodorova et al., 2002, 2003; Piovezan et al., 2000; Shrestha et al., 2009). Em tecido de pele glabra, por exemplo, esse efeito ocorre via ativação de receptor ET_B de queratinócitos, o que leva à liberação de β -endorfinas, as que por sua vez, agem sobre receptores μ opióides

resultando em analgesia (Khodorova et al., 2002, 2003; Piovezan et al., 2000). Em pele com pêlos, esse efeito analgésico é causado via ativação de receptor ET_A ; porém, a natureza exata dos mecanismos envolvidos permanece obscura (Shrestha et al., 2009). Desta forma doses altas de ET_1 na cavidade articular poderiam levar a uma possível ativação de alguma destas vias, de forma semelhante ao ocorrido nos experimentos de Piovezan et al. (2000), onde só na presença de um antagonista seletivo ET_B ficaram evidenciados os efeitos hiperalgésicos da ET_1 (na dose de 30 pmols aplicada na pata de ratos).

Outra possível alternativa para a ausência de efeito nociceptivo observada após a administração das doses mais altas de ET_1 (10 e 30 pmols/cavidade), pode envolver a dessensibilização dos receptores envolvidos, o que levaria à internalização dos receptores e ausência de resposta no tempo observado (após 4 h). A dessensibilização de receptores ET_A e ET_B ocorre através de fosforilação pela proteína quinase de receptores acoplados a proteína G do tipo 2 (GRPK2), a qual leva ao desacoplamento da proteína G dos receptores. Ambos os receptores ET_A e ET_B são internalizados mediante mecanismo dependente de clatrina, porém, os destinos são diferentes: enquanto o receptor ET_A é reciclado, voltando assim para a membrana celular, o receptor ET_B é degradado por lisossomos. De fato a depuração (“clearance”) da ET_1 circulante está diretamente ligada à degradação do receptor ET_B uma vez que tanto o receptor como a ET são degradados enquanto ligados formando o complexo receptor-agonista (Khodorova et al., 2008).

Os estudos sobre os mecanismos de ação da ET_1 sobre a dor baseados na administração de ET (exógena) tem mostrado grande variabilidade. Khodorova et al. (2006) observaram que o uso de antagonistas de receptores ET_A e ET_B eram capazes de impedir, de forma consistente, o efeito nociceptivo decorrente da injeção intraplantar de ET_1 . No entanto, em modelos de dor evidente, diversos autores demonstraram que apenas o bloqueio do receptor ET_A (mas não do ET_B) era capaz de antagonizar o efeito causado pelo agonista ET_1 (Baamonde et al., 2004; Davar et al., 1998; De-Melo et al., 1998; Gokin et al., 2001; Mckelvy et al., 2007; Mujenda et al., 2007; Raffa et al., 1996;).

A região da ATM, assim como toda a mandíbula em si, é inervada pelo nervo mandibular, uma das ramificações do nervo trigêmeo responsável pela sensibilidade exteroceptiva (dor, temperatura, tato e pressão) da maioria das estruturas desta região, mas em especial da ATM (Madeira, 2004). Chichorro et al.

(2010) demonstraram a presença de receptores ET_A e ET_B nestas inervação, assim como a co-localização desses com o receptor TRPV1. Além disso, no mesmo estudo Chichorro et al. (2010) realizaram ensaios de nocicepção em ratos utilizando ETs (ET₁, ET₃) e o agonista seletivo para receptor ET_B - IRL1620 em todas as regiões inervadas pelo nervo trigeminal (olhos, lábio superior e ATM), e constataram que todos os agonistas de ET testados induziram nocicepção nas regiões do lábio superior e da ATM. Entretanto, a ET₃ e o IRL1620 evocaram respostas semelhantes às da ET₁ somente em doses mais elevadas do que as desta última. Estes dados estariam de acordo com as nossas observações no sentido de que os efeitos nociceptivos evocados pela ET estejam mais ligados a estimulação direta do nervo trigeminal do que à indução de uma resposta inflamatória.

Considerando que as ETs estão presentes em alguns eventos inflamatórios (Bertelli et al., 1992; Miyasaka et al., 1992) e que estas tem importante participação na nocicepção (para revisão vide Hans et al., 2009), decidimos utilizar o modelo de inflamação de ATM de ratos pela injeção intra-articular de CGN em ratos e estudar a participação das ETs endógenas mediante o uso de antagonistas seletivos dos receptores ET_A e ET_B (BQ123 e BQ788, respectivamente).

A CGN está bem caracterizada como agente flogístico, assim como seus efeitos sobre a ATM, os quais já foram relatados em estudos anteriores do nosso grupo (Denadai-Souza et al., 2009, 2010; Tesser-Viscaíno et al., 2009). Goulart et al. (2005) e Tesser-Viscaíno et al. (2009) mostraram os efeitos da CGN nesta articulação entre 3 h e 15 dias após a sua injeção, e concluíram que a CGN é capaz de induzir um processo inflamatório local com apenas uma aplicação, com formação de edema e infiltração celular (principalmente neutrófilos). Nossos resultados confirmam a ação da CGN sobre a ATM resultando em diminuição do limiar de força necessária para induzir a retirada da cabeça dos animais (hipernocicepção avaliada como alodinia mecânica), e migração leucocitária para a cavidade, sendo ambos sinais característicos de um processo inflamatório.

Alguns trabalhos mostram que as ETs são capazes de aumentar a expressão de integrinas em neutrófilos humanos (Fernandez-Patron et al., 2001), o que pode aumentar a adesão destas células ao endotélio (Zouki et al., 1999) e favorecer lesões endoteliais mediadas por metaloproteinases localizadas nos grânulos neutrofílicos (Halim et al., 1995; Toffoli et al., 2007). Com base nos resultados mostrados, não parece haver evidências de que no nosso modelo as ETs estejam

envolvidas no processo de interação leucócito-endotélio, já que tanto a ET_1 como o agonista ET_B *per se* foram incapazes de induzir migração leucocitária para a ATM em nenhuma das doses testadas, além da falta de efeito dos antagonistas ET_A e ET_B sobre a migração leucocitária induzida pela CGN, apesar da forte tendência à diminuição do número de células polimorfonucleares observada quando ambos antagonistas são administrados de forma conjunta.

A co-injeção intra-articular da CGN com cada um dos antagonistas dos receptores ET_A e ET_B (BQ123 e BQ788, respectivamente) de forma separada não interferiu na hipernocicepção evocada pela CGN, porém esta resposta foi totalmente abolida na presença de ambos os antagonistas, evidenciando desta forma a participação de ambos os receptores nos eventos que levam a hipernocicepção induzida pela CGN na ATM. De-Mello et al. (1998) observaram resultados semelhantes estudando os efeitos da CGN e dos antagonistas dos receptores das ETs na articulação do joelho de ratos, concluindo que somente o antagonismo simultâneo de ambos tipos de receptores é capaz de abolir a hipernocicepção secundária à injeção intra-articular de CGN. Entretanto, e diferentemente dos nossos achados, estes autores observaram uma discreta diminuição na hipernocicepção causada pela CGN quando esta foi co-injetada com cada um dos antagonistas de individualmente. Diferenças entre os modelos (articulação de joelho vs. ATM) ou das técnicas empregadas para avaliação de efeitos nociceptivos (filamentos de Von Frey vs. analgesímetro digital) podem explicar esta discrepância.

Conte et al. (2008) também apontam para a importante participação de ambos os receptores das ETs no processo inflamatório, com base na redução causada independentemente por cada antagonistas ET_A e ET_B da intensidade do edema e do infiltrado celular resultantes da injeção de zymosan em joelhos de camundongos. Contudo, em relação ao infiltrado leucocitário, os achados destes autores são opostos às nossas observações na ATM de ratos, o que, mais uma vez, reforça a hipótese sobre os efeitos diferenciais exercidos pelas ETs na dependência do modelo de inflamação estudado.

Possivelmente, o envolvimento de dimerização dos receptores ET_A e ET_B seja um mecanismo plausível para nos ajudar a explicar as observações descritas acima. A dimerização dos receptores ET_A e ET_B foi demonstrada por Gregan et al. (2004) e Evans e Walker (2008) quando trabalhando com culturas de células HEK293 que expressão ambos os receptores e podem gerar hetero- e homodímeros. Nestes

trabalhos também foram demonstrados diferentes vias são ativados quando estes receptores estão dimerizados. Em estudos de liberação de Ca^{2+} intracelular, Evans e Walker (2008) evidenciaram que heterodímeros de receptores ET_A - ET_B levam a uma liberação duradora deste íon, ocorrendo o pico da resposta aproximadamente 1 min após a adição de ET_1 e sendo mantido por até 10 min, sendo apenas bloqueado pelo uso concomitante de ambos os antagonistas dos receptores das ETs, enquanto homodímeros ET_A levam a liberação de Ca^{2+} por curto período de tempo, com duração não maior do que 3 min, porém com pico também por volta de 1 min após adição de ET_1 . Desta forma, o fato dos receptores estarem dimerizados poderia impedir que o bloqueio de apenas um destes fosse capaz de reverter o efeito causado pela CGN ou mesmo pela ET_1 no sistema.

A fim de melhor caracterizar e entender a participação das ETs endógenas no processo inflamatório induzido pela CGN na ATM decidimos estudar a expressão de genes relacionados, tais como o do PPET_1 (precursor da ET_1), da ECE_1 , dos receptores ET_A e ET_B , assim como do receptor TRPV1 , visando no caso deste último, elucidar uma possível interação entre as ETs e o receptor TRPV1 na hiperalgesia induzida. É interessante notar que a CGN não promoveu aumento estatisticamente significativo da expressão de nenhum destes genes na ATM, mas somente tendências ao aumento da expressão de PPET_1 e TRPV1 (Figura 5, painéis A e E). Ao contrário, constatou-se uma diminuição considerável na expressão gênica dos receptores ET_A e ET_B , o que demonstra a repressão da expressão destes genes em nível transcripcional, o que talvez possa ser constatado com uma análise dos fatores reguladores de expressão dos genes já analisados, tais como NF κ B e hormônios esteroides, tanto mineralocorticóides como glicocorticóides, no caso da ET_1 (Stow et al., 2011).

Entretanto, a falta de efeitos da CGN sobre a expressão dos genes de PPET_1 , ECE_1 e TRPV1 na ATM não impede que estes possam ocorrer em outras região, como por exemplo o nervo mandibular. Este nervo é uma ramificação do gânglio trigeminal, onde os corpos celulares dessa inervação se encontram (Madeira, 2004). É conhecido que, tanto os receptores ET_A e ET_B como o receptor TRPV1 podem ser encontrados nesta região, sendo que a grande maioria dos receptores ET_A e ET_B são encontradas em neurônios de pequeno porte (menores de 30 μm de diâmetro) na porção do nervo trigeminal que inerva a ATM. Entretanto, é importante ressaltar que receptores ET_A , mas não ET_B , foram também encontrados em neurônios de

médio e grande porte no gânglio trigeminal (Chichorro et al., 2010), e que em estudos prévios, o mesmo grupo relata a presença de receptores ET_B , mas não ET_A , em células satélites da glia nas três porções do nervo trigeminal: mandibular, maxilar e oftálmica (Chichorro et al., 2009). Assim, e a fim de verificar no nosso modelo a hipótese de ocorrência de ações “não locais” das ETs, resolvemos analisar a expressão dos genes mencionados no gânglio trigeminal durante um evento inflamatório induzido pela injeção intra-articular de CGN na ATM, e foi constatado há diminuição da expressão dos genes para os receptor ET_A e TRPV1.

Desta forma, comparando os resultados dos ensaios de q-PCR realizados na ATM e no gânglio trigeminal, observamos alterações de expressão gênica que seguem padrões diferentes, o que pode nos levar a postular que diferentes mecanismos regulatórios estejam ocorrendo nestas regiões. Assim, podemos inferir que na região da ATM ambos os receptores ET_A e ET_B estão atuantes (comprovado pelos testes funcionais empregando antagonistas seletivos) e sujeitos a regulação negativa. No entanto, na região do gânglio é possível que apenas o receptor ET_A esteja envolvido no efeito de hipernocicepção secundária à injeção intra-articular de CGN, uma vez que sua expressão gênica, e não a do ET_B , encontra-se diminuída.

A regulação negativa, tanto dos receptores quanto de mRNA já foi demonstrada, conforme consta na revisão de Goto et al. (1996). Em cultura de células de musculatura lisa, já havia sido constatado que a exposição prolongada a ET_1 levava a uma regulação negativa do receptor ET_B (Hirata et al., 1988), assim como em cultura de linha células de osteosarcoma, onde também ocorre uma rápida regulação negativa do mRNA de receptores ET_B após poucas horas de exposição à ET_1 (Sakurai et al., 1992). Esses dados vão a favor dos nossos achados reforçando a hipótese de uma regulação negativa não somente dos receptores da ET, mas também de seus mRNAs, fato que nós observamos tanto na região da ATM quanto no gânglio trigeminal. Essa regulação negativa pode ser causada por segundos mensageiros ativados pela ligação das ETs a seus receptores, uma vez que a regulação negativa do receptor ET_B em linha celular de células de osteosarcoma de rato foi mimetizada por Asada et al. (1995) usando ésteres do forbol e ionomicina ou dibutilil cAMP adicionados em seu meio de cultura, e sabendo que a ET leva a produção cAMP, assim como ativação de PKC, esse pode ser um dos mecanismos que levariam a regulação negativa do mRNA deste receptor (Goto et al., 1996).

A diminuição da expressão de TRPV1 no gânglio trigeminal pode também indicar a sua participação nos mecanismos de hipernocicepção deflagrados pela injeção intra-articular de CGN na ATM. Porém, nos testes comportamentais dos quais o antagonista de TRPV1 – capsazepina foi co-injetado com a ET₁, não houve interferência por parte do antagonista na resposta hipernociceptiva da ET₁. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados no estudo de Urtado et al. (2007), no qual foi avaliada a resposta nociceptiva à injeção intra-articular de formalina na ATM de ratos em fase de abstinência de etanol, onde os autores tampouco constataram qualquer efeito devido à capsazepina quando esta foi co-injetada com a formalina.

Kawamata et al. (2008) confirmou a sensibilização do receptor TRPV1 através de sua fosforilação na porção intracelular (no resíduo de serina na posição 800) mediada por PKC ϵ (um subtipo de PKC independente de Ca²⁺), a qual, nestes experimentos, foi ativada pela ligação da ET₁ a seu receptor ET_A. Assim, este tipo de mecanismo pode explicar a ineficácia observada da capsazepina para interferir nos efeitos hipernociceptivos da ET₁.

Em resumo, o presente estudo traz algumas contribuições para o entendimento do papel da ET₁ na nocicepção secundária à administração intra-articular de CGN na ATM de ratos. Dentre elas, conta-se a dissociação deste efeito do processo de migração celular para a cavidade articular, um dos primeiros sinais do processo inflamatório. Porém, restam ainda algumas questões a serem compreendidas em relação ao(s) mecanismo(s) completo(s) envolvido(s) nas ações da ET₁ na nocicepção. Há também algumas lacunas a serem preenchidas futuramente, tais como o real significado das alterações nas expressões gênicas estudadas. Desta forma, o papel das ETs na nocicepção ainda não foi totalmente elucidado e, portanto, merece investigações e investimentos futuros visando o estabelecimento de novas alternativas terapêuticas para tratamento das DTMs.

5 CONCLUSÕES

Em conclusão, e com base nos resultados apresentados até o momento, podemos afirmar que:

- a injeção intra-articular de ET₁ na ATM de ratos causa hipernocicepção mediada pelos receptores ET_A e ET_B, porém com uma aparente maior participação deste último;
- no modelo de sinovite da ATM induzida pela injeção intra-articular de CGN na ATM, há participação da ET₁ (mediada pelos receptores ET_A e ET_B) nos sinais de hiperalgesia secundária, considerando que antagonismo concomitante destes receptores inibe este sinal, provavelmente via heterodimerização destes receptores;
- neste modelo de sinovite induzido pela CGN, a ET₁ não participa do processo de recrutamento de leucócitos para a cavidade articular, em vista da incapacidade dos antagonistas seletivos ET_A e ET_B para influenciarem esta resposta. Além disso, a injeção intra-articular de ET₁ na ATM não causou qualquer alteração no conteúdo de leucócitos na cavidade;
- a indução da sinovite pela injeção intra-articular de CGN na ATM leva a diminuição da expressão genica dos receptores ET_A e ET_B na ATM e à diminuição da expressão dos genes ET_A e TRPV1 no gânglio trigeminal, o que sugere a ocorrência de mecanismos de regulação negativa (“down-regulation”) destes genes;
- os efeitos hipernociceptivos gerados pela injeção intra-articular de ET₁ na ATM não são influenciados pelo antagonismo do receptor TRPV1, o que pode significar que:
 - a) não há relação entre estas vias ou;
 - b) a incapacidade de antagonistas TRPV1 para bloquear a resposta nociceptiva desencadeada pela ET₁ deve-se a que a ativação do receptor TRPV1 envolve modificações na porção intracelular deste receptor.

REFERÊNCIAS*

- Asada S, Kasuya Y, Sakurai T, Masaki T, Goto K. Endothelin-1-induced downregulation of ETB receptor mRNA: participation of cAMP. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 Suppl 3:S272-5.
- Atsü SS, Ayhan-Ardic F. Temporomandibular disorders seen in rheumatology practices: a review. *Rheumatol Int.* 2006;26(9):781-7. Review
- Baamonde A, Lastra A, Villazón M, Bordallo J, Hidalgo A, Menéndez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369(2):245-51.
- Balonov K, Khodorova A, Strichartz GR. Tactile allodynia initiated by local subcutaneous endothelin-1 is prolonged by activation of TRPV-1 receptors. *Exp Biol Med.* 2006;231(6):1165-70.
- Bertelli A, Clerico A, Chicca A, Giovannini L, Gorio A, Romano MA. Role of endothelin-1 in carrageenin-induced inflammation. *Int J Tissue React.* 1992;14(5):225-30.
- Brändli P, Löffler BM, Breu V, Osterwalder R, Maire JP, Clozel M. Role of endothelin in mediating neurogenic plasma extravasation in rat dura mater. *Pain.* 1996;64(2):315-22
- Chichorro JG, Fiuza CR, Bressan E, Claudino RF, Leite DF, Rae GA. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: role of ETA and ETB receptors. *Brain Res.* 2010;1345:73-83.
- Chichorro JG, Zampronio AR, Cabrini DA, Franco CR, Rae GA. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides.* 2009;43(2):133-42
- Conte Fde P, Barja-Fidalgo C, Verri WA Jr, Cunha FQ, Rae GA, Penido C, Henriques MG. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. *J Leukoc Biol.* 2008;84(3):652-60.
- Davar G, Hans G, Fareed MU, Sinnott C, Strichartz G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. *Neuroreport.* 1998;9(10):2279-83.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>[2007 May 22].

De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orléans-Juste P, Rae GA. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. *Pain*. 1998;77(3):261-9.

Denadai-Souza A, Camargo Lde L, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscará MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain*. 2009;13(8):812-9.

Denadai-Souza A, Cenac N, Casatti CA, Câmara PR, Yshii LM, Costa SK, Vergnolle N, Muscará MN. PAR(2) and temporomandibular joint inflammation in the rat. *J Dent Res*. 2010;89(10):1123-8.

Evans NJ, Walker JW. Sustained Ca²⁺ signaling and delayed internalization associated with endothelin receptor heterodimers linked through a PDZ finger. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(8):526-35.

Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittall R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. *FASEB J*. 2001;15(12):2230-40.

Gokin AP, Fareed MU, Pan HL, Hans G, Strichartz GR, Davar G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. *J Neurosci*. 2001;21(14):5358-66.

Goulart AC, Correia FA, Sousa SC, Luz JG. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. *Braz Oral Res*. 2005;19(2):99-105.

Goto K, Hama H, Kasuya Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol*. 1996 Dec;72(4):261-90. Review.

Gregan B, Jürgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem*. 2004;279(26):27679-87.

Halim A, Kanayama N, el Maradny E, Maehara K, Terao T. Activated neutrophil by endothelin-1 caused tissue damage in human umbilical cord. *Thromb Res*. 1995;77(4):321-7.

Hans G, Schmidt BL, Strichartz G. Nociceptive sensitization by endothelin-1. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):36-42.

Hirata Y, Yoshimi H, Takaichi S, Yanagisawa M, Masaki T. Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1988;239(1) 13-7.

Houck CS, Khodorova A, Reale AM, Strichartz GR, Davar G. Sensory fibers resistant to the actions of tetrodotoxin mediate nociceptive responses to local administration of endothelin-1 in rats. *Pain*. 2004;110(3):719-26.

Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem*. 1989;264(25):14954-9.

Kawamata T, Ji W, Yamamoto J, Niiyama Y, Furuse S, Namiki A. Contribution of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 to endothelin-1-induced thermal hyperalgesia. *Neuroscience*, 2008;154(3):1067-76.

Kawamata T, Ji W, Yamamoto J, Niiyama Y, Furuse S, Omote K, Namiki A. Involvement of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 in endothelin 1-induced pain-like behavior. *Neuroreport*. 2009;20(3):233-7.

Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:851-76.

Khodorova A, Fareed MU, Gokin A, Strichartz GR, Davar G. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. *J Neurosci*. 2002;22(17):7788-96.

Khodorova A, Navarro B, Jouaville LS, Murphy JE, Rice FL, Mazurkiewicz JE, Long-Woodward D, Stoffel M, Strichartz GR, Yukhananov R, Davar G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nat Med*. 2003;9(8):1055-61.

Khodorova A, Vasko MR, Ritcher JA, Strichartz G. NMDA receptors favor tactile allodynia induced by injection of low concentrations of endothelin-1 into the rat's hindpaw. *Soc for Neurosci Ann Mtg Abstracts*, 2006;245:23.

Khodorova A, Montmayeur JP, Strichartz G. Endothelin receptors and pain. *J Pain*. 2008;10(1):4-28.

Madeira MC. Anatomia da face, bases anatomofuncionais para a prática odontológica. São Paulo: Sarvier; 2004. Articulação Temporomandibular;p. 101-122.

McKelvy AD, Mark TR, Sweitzer SM. Age- and sex-specific nociceptive response to endothelin-1. *J Pain*, 2007;8(8):657-66.

Menéndez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2003;367(1):28-34.

Miyasaka N, Hirata Y, Ando K, Sato K, Morita H, Shichiri M, Kanno K, Tomita K, Marumo F. Increased production of endothelin-1 in patients with inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*. 1992;35(4):397-400.

Motta EM, Chichorro JG, Rae GA. Role of ET(A) and ET(B) endothelin receptors on endothelin-1-induced potentiation of nociceptive and thermal hyperalgesic responses evoked by capsaicin in rats. *Neurosci Lett*. 2009;457(3):146-50.

Mujenda FH, Duarte AM, Reilly EK, Strichartz GR. Cutaneous endothelin-A receptors elevate post-incisional pain. *Pain*. 2007;133(1-3):161-73.

Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Ikeda N, Suzuki A, Kawano Y, Maeda T. Synovial membrane in the temporomandibular joint--its morphology, function and development. *Arch Histol Cytol*. 2003;66(4):289-306.

Nozawa-Inoue K, Takagi R, Kobayashi T, Ohashi Y, Maeda T. Immunocytochemical demonstration of the synovial membrane in experimentally induced arthritis of the rat temporomandibular joint. *Arch Histol Cytol*. 1998;61(5):451-66.

Okeson JP. Management of temporomandibular disorders and occlusion, management of temporomandibular disorders e occlusion. 3rd ed. Mosby-Year Book; 1992. 672 p.

Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Berrino L, Rossi F, Maione S. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol Pain*. 2010;6:66.

Paula, MAV. Participação da Endotelina-1 na Sinovite induzida por Carragenina na Articulação Temporomandibular de Ratos [dissertação (Mestrado)], São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Piovezan AP, D'Orléans-Juste P, Tonussi CR, Rae GA. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. *Eur J Pharmacol*. 1998;351(1):15-22.

Piovezan AP, D'Orléans-Juste P, Souza GE, Rae GA. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2000;129(5):961-8.

Raffa RB, Schupsky JJ, Jacoby HI. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;276(2):647-51.

Sakurai T, Morimoto H, Kasuya Y, Takuwa Y, Nakauchi H, Masaki T, Goto K. Level of ETB receptor mRNA is down-regulated by endothelins through decreasing the intracellular stability of mRNA molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;186(1):342-7.

Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:731-59.

Schneider MP, Inscho EW, Pollock DM. Attenuated vasoconstrictor responses to endothelin in afferent arterioles during a high-salt diet. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(4):F1208-14.

Shrestha S, Gracias NG, Mujenda F, Khodorova A, Vasko MR, Strichartz GR. Local antinociception induced by endothelin-1 in the hairy skin of the rat's back. *J Pain*. 2009;10(7):702-14.

Steenks MH; Wijer A. Disfunções da articulação temporomandibular do ponto de vista da Fisioterapia e Odontologia. São Paulo: Santos; 2005. 266 p.

Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. FASEB J. 2011 Jan;25(1):16-28. Epub 2010 Sep 13. Review.

Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. J Dent Res. 2008;87(4):296-307.

Toffoli MC, Gabra BH, Teixeira CF, Sirois P, Jancar S. Endothelins mediate neutrophil activation, ProMMP-9 release and endothelial cell detachment. Inflammation. 2007;30(1-2):28-37.

Urtado MB, Gameiro GH, Tambeli CH, Fischer L, Urtado CB, de Arruda Veiga MC. Involvement of peripheral TRPV1 in TMJ hyperalgesia induced by ethanol withdrawal. Life Sci. 2007 Nov 30;81(23-24):1622-6.

Voog U, Alstergren P, Leibur E, Kallikorm R, Kopp S. Impact of temporomandibular joint pain on activities of daily living in patients with rheumatoid arthritis. Acta Odontol Scand. 2003;61(5):278-82.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. J Hypertens Suppl. 1988;6(4):S188-91.

Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. Br J Pharmacol. 1999;127(4):969-79.