

**ALEXANDRE DENADAI SOUZA**

**ATIVACÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE 2, UM SINAL PARA  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: **Farmacologia**

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo N. Muscará**

São Paulo  
2009

## RESUMO

Denadai-Souza A. Ativação do Receptor Ativado por Protease 2, um Sinal para Resposta Imunológica Inata na Articulação Temporomandibular [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar o efeito da ativação do receptor ativado por protease 2 (PAR<sub>2</sub>) na articulação temporomandibular (ATM), bem como se a resposta inflamatória induzida pela carragenina ou por agonistas PAR<sub>2</sub> é mediada por mecanismos neurogênicos. As substâncias carragenina, tripsina e SLIGRL-NH<sub>2</sub> (PAR<sub>2</sub>-AP) foram injetadas intra-articularmente (i.art.), enquanto animais controles receberam solução salina, tripsina inativada termicamente ou o peptídeo controle PAR<sub>2</sub>-RP. Os parâmetros inflamatórios analisados foram extravasamento plasmático, influxo de leucócitos, produção de citocinas inflamatórias e alodinia mecânica. A expressão de PAR<sub>2</sub> na ATM e no gânglio trigeminal foi analisada através de RT-PCR em tempo real e imunofluorescência, 4 h após a administração i.art. de carragenina ou veículo. Através de técnicas de neurotraçamento retrógrado e imunofluorescência, analisamos o padrão de imunorreatividade ao PAR<sub>2</sub> em aferentes trigeminais da ATM. A funcionalidade do PAR<sub>2</sub> foi analisada por ensaios de medida de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> em fibroblastos sinoviais da ATM e neurônios ganglionares trigeminais dissociados. O componente neurogênico da inflamação foi avaliado através do bloqueio farmacológico de receptores NK<sub>1</sub> com o antagonista seletivo SR140333. A injeção i.art. de carragenina na ATM causou aumento dependente do tempo no extravasamento plasmático, influxo de leucócitos, produção de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e desenvolvimento de alodinia mecânica, os quais, com exceção do último, foram inibidos pelo SR140333. A ativação de PAR<sub>2</sub> através da injeção i.art. de tripsina ou PAR<sub>2</sub>-AP induziu aumento dependente da dose no extravasamento plasmático, influxo de leucócitos e alodinia mecânica, os quais foram inibidos pelo SR140333. A expressão do PAR<sub>2</sub> foi observada em 84% dos aferentes trigeminais da ATM e em terminações nervosas na ATM em co-localização com o marcador neuronal PGP9.5 e a substância P. O PAR<sub>2</sub> também foi observado na membrana sinovial e cartilagem condilar. A administração i.art. de carragenina induziu um aumento na expressão de PAR<sub>2</sub> na ATM. O estímulo de neurônios ganglionares trigeminais e fibroblastos sinoviais com o PAR<sub>2</sub>-AP induziu um aumento na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Nossos dados sugerem que fibras nervosas sensoriais são um alvo direto para serino-proteases, implicando a ativação do PAR<sub>2</sub> como um sinal para a resposta imunológica inata na articulação temporomandibular, principalmente via mecanismos neurogênicos.

**Palavras-chave:** ATM. PAR<sub>2</sub>. Resposta imunológica inata. Inflamação neurogênica.

## ABSTRACT

Denadai-Souza A. Activation of proteinase-activated receptor 2 activation, a signal to joint innate immune responses [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The Proteinase-activated Receptor 2 (PAR<sub>2</sub>) has been suggested as a putative therapeutic target in arthritis. The objective of the present study was to investigate the effect of PAR<sub>2</sub> activation in the temporomandibular joint (TMJ), along with whether the inflammation induced by carrageenan or PAR<sub>2</sub> agonists is mediated by neurogenic mechanisms. Inflammation was induced following an intra-articular (i.art.) injection of carrageenan or the PAR<sub>2</sub> agonists trypsin or SLIGRL-NH<sub>2</sub> (PAR<sub>2</sub>-AP); while control animals received saline, heat-inactivated trypsin or the control peptide PAR<sub>2</sub>-RP. Inflammatory events analysed were plasma extravasation, leukocyte recruitment, production of inflammatory cytokines and mechanical allodynia. The expression of PAR<sub>2</sub> in the TMJ and trigeminal ganglion was analysed by real time RT-PCR and immunofluorescence, 4 h after an i.art. injection of carrageenan or vehicle. By allying retrograde neurotracer and immunofluorescence techniques, we analysed the pattern of expression of PAR<sub>2</sub> in trigeminal afferents of the TMJ. Functional expression of PAR<sub>2</sub> was assessed by measurements of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in dissociated TMJ synovial fibroblasts and trigeminal ganglion neurons. The neurogenic component of inflammation induced by either carrageenan or PAR<sub>2</sub> agonists was evaluated by the pharmacological blockade of NK<sub>1</sub> receptors with the selective antagonist SR140333. The i.art. injection of carrageenan in the TMJ induced an increase in plasma extravasation, leukocyte recruitment, production of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and the development of mechanical allodynia, which besides the last one, were inhibited by SR140333. The activation of PAR<sub>2</sub> through the i.art. injection of trypsin or PAR<sub>2</sub>-AP induced a dose dependent increase in plasma extravasation, leukocyte recruitment and mechanical allodynia, which were all inhibited by SR140333. PAR<sub>2</sub> expression was observed within 84% of the trigeminal afferents of the TMJ and also in co-localization with the neuronal marker PGP9.5 or the neuropeptide SP in TMJ sensory nerve fibres. PAR<sub>2</sub> expression was also observed in the synovial membrane and condilar cartilage. The i.art. injection of carrageenan induced an increase in expression of PAR<sub>2</sub> in the TMJ. The stimulation of TMJ synovial fibroblasts or trigeminal ganglion neurons with PAR<sub>2</sub>-AP induced an increase in the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in comparison to the control peptide PAR<sub>2</sub>-RP. In conclusion, our data suggest that sensory nerve fibers are a direct target to serine-proteinases, implicating PAR<sub>2</sub> activation as a putative signal to joint innate immune responses, mainly via neurogenic mechanisms.

**Key words:** TMJ. PAR<sub>2</sub>. Innate immune responses. Neurogenic inflammation.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Histofisiologia da Articulação Temporomandibular

#### 1.1.1 A membrana sinovial

A articulação temporomandibular (ATM), única de mamíferos, é a articulação sinovial que permite os movimentos entre a mandíbula e a base do crânio. Essa articulação compreende um complexo musculoesquelético bilateral envolvendo a articulação propriamente dita e músculos da mastigação adjacentes. A ATM é revestida por uma cápsula de natureza fibrosa em sua face exterior, que apresenta continuidade com o disco articular em sua face interna, delimitando duas cavidades, a infra e a supradiscal. O disco articular é um tecido não vascularizado, que apesar de sua natureza fibrocartilágnea, possui capacidade mínima de regeneração ou de remodelação. Esse disco está entreposto entre as superfícies articulares da ATM (temporal e condilar), as quais, diferentemente de outras articulações sinoviais, são revestidas por uma fibrocartilagem, e não por cartilagem hialina, apresentando capacidade de remodelação (Nozawa-Inoue *et al.*, 2003; Madeira, 2004; Nanci, 2007).

A superfície interna da cápsula articular, assim como a superfície do coxim retrodiscal, são revestidas pela membrana sinovial, a qual é composta de duas camadas, denominadas subíntima e íntima. De maneira geral, a subíntima consiste de um tecido conjuntivo frouxo densamente inervado e vascularizado, entretanto, áreas com maior densidade de fibras colágenas, ou grande presença de adipócitos são também observadas. A partir de capilares fenestrados da subíntima, é originado um dialisado plasmático responsável pela lubrificação e possivelmente nutrição articular, o líquido sinovial. Este ainda é processado pela íntima, que consiste de uma camada uni- ou bi-celular composta de células sinoviais semelhantes a macrófagos (células M) ou fibroblastos (células F), as quais revestem a membrana sinovial (Nozawa-Inoue *et al.*, 2003; Madeira, 2004; Nanci, 2007).

As células M são positivas para marcadores da linhagem monocítica/macrofágica como complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), *cluster of differentiation* 68 (CD68; Nozawa-Inoue *et al.*, 1998) e *cluster of differentiation* 14 (CD14; Grabowski *et al.*, 1997), o que sugere que essas células se originam a partir da medula óssea. Ultra-estruturalmente, essas células apresentam heterocromatina densa e citoplasma rico em vesículas, lisossomos e vacúolos, evidenciando o papel fagocítico dessas células. Acredita-se que essas células são responsáveis pelo processamento de proteínas e debris celulares presentes no líquido sinovial (Kakudo *et al.*, 1977; Okada *et al.*, 1981; Graabaek, 1985). Sabe-se que durante a fase crônica da artrite na ATM, ocorre espessamento da íntima devido ao acúmulo de macrófagos (Nozawa-Inoue *et al.*, 1998; Goulart *et al.*, 2005; Tesser-Viscaíno *et al.*, *in press*). É possível que essas células recrutadas *de novo* estejam mais envolvidas na patofisiologia da artrite, pois atualmente sabe-se que embora macrófagos residentes apresentem alta atividade fagocítica, as mesmas possuem baixa atividade imunológica (Jennings *et al.*, 2005; Hamerman e Aderem, 2009).

As células F, denominadas fibroblastos sinoviais, também apresentam origem mesodérmica, mas não apresentam desmossomos como as células M, a eucromatina prevalece e o citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso e grânulos secretórios elétron-densos, evidenciando o papel de síntese dessas células. Na verdade, as células F sintetizam vários componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I e II (Mizoguchi *et al.*, 1996; Visnapuu *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2003), fibronectina (Matsubara *et al.*, 1983; Mapp e Revell, 1985) e laminina (Nozawa-Inoue *et al.*, 1999), sendo que em algumas áreas, a camada íntima apresenta áreas descontínuas de uma estrutura similar à lâmina basal do epitélio, evidenciando algumas similaridades ultraestruturais a esse tecido ectodérmico. As células F também sintetizam e secretam glicosaminoglicanos como o ácido hialurônico (Roy e Ghadially, 1967), o qual confere viscosidade ao líquido sinovial e é essencial para reduzir o atrito entre as superfícies articulares. Além das células F estarem diretamente envolvidas na síntese de macromoléculas da matriz extracelular e do líquido sinovial, elas são importantes para o revestimento da membrana sinovial, onde emitem prolongamentos em contato direto com a cavidade articular, sugerindo uma função sensorial (Nozawa-Inoue *et al.*, 2003).

### 1.1.2 A inervação sensorial da ATM e o componente neurogênico da inflamação

O monitoramento sensorial propriamente dito da ATM e estruturas associadas é realizado por uma densa inervação sensorial (Dubner *et al.*, 1978). Em humanos, são observados quatro tipos de receptores sensoriais, sendo três encapsulados, como os corpúsculos de Ruffini, os corpúsculos de Pacini e os órgãos tendinosos de Golgi, e um não encapsulado, as terminações nervosas livres (Wink *et al.*, 1992). Por outro lado, na ATM de roedores, há exclusivamente terminações nervosas livres, e estas estão densamente presentes na membrana sinovial, cápsula e periferia do disco articular (Kido *et al.*, 1995). As terminações nervosas sensoriais da ATM possuem perfil neuroquímico complexo, apresentando vários neuropeptídeos como substância P (SP), neurocinina A (NKA) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), tanto em ratos (Uddman *et al.*, 1998) quanto em humanos (Haeuchi *et al.*, 1999).

As desordens temporomandibulares (DTMs) são as condições não odontogênicas mais comumente associadas a dor orofacial crônica, sendo que a artrite é provavelmente a mais relevante, devido à degeneração articular provocada. Essas doenças podem ser locais, como a osteoartrite, ou sistêmica, como a artrite reumatóide, para revisão vide (Atsü e Ayhan-Ardic, 2006; Tanaka *et al.*, 2008). Dessa maneira, quadros severos de artrite na articulação temporomandibular (ATM) estão associados a uma queda significativa na qualidade de vida dos pacientes afetados (Voog *et al.*, 2003). Além dos aspectos citados acima, a ATM é uma articulação sinovial de interesse particular devido à sua localização vizinha de outras estruturas faciais essenciais à homeostasia; por exemplo, a inflamação nessa articulação altera a atividade eletromiográfica dos músculos da mastigação (Yu *et al.*, 1996; Bakke *et al.*, 1998; Tambeli *et al.*, 2001).

Uma importante característica da artrite reumatóide, incluindo na ATM, é sua frequente simetria bilateral. Esse processo parece ser mediado por mecanismos neurogênicos através da liberação bilateral de neuropeptídeos, principalmente taquicininas como SP, NKA e o CGRP (Schaible e Grubb, 1993; Levine *et al.*, 2006). O CGRP é o vasodilatador mais potente conhecido, agindo principalmente em

arteríolas, enquanto a SP apresenta importante papel na regulação da permeabilidade vascular de vênulas pós-capilares (Lembeck e Holzer, 1979; Brain *et al.*, 1985; Brain e Williams, 1985). Paralelamente ao alto potencial vasoativo desses neuropeptídeos, a concentração dos mesmos está bilateralmente aumentada no fluido sinovial após a indução de uma artrite unilateral no rato (Lundeberg *et al.*, 1996; Carleson *et al.*, 1996). Em humanos, foi descrita uma correlação positiva entre a concentração de SP no fluido sinovial de pacientes com artrite e a temperatura intra-articular e níveis de dor na ATM (Appelgren *et al.*, 1991). Contudo, outros estudos não estabeleceram uma clara relação entre o aumento bilateral da concentração da SP e outros neuropeptídeos, e a severidade de diferentes DTMs (Marshall *et al.*, 1990; Holmlund *et al.*, 1991; Kaneyama *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2007).

Em 2005 foi demonstrado que, embora em animais normais a injeção intra-articular de SP induzia a formação de edema, mas não o influxo de leucócitos, a ativação do receptor para taquicinina NK<sub>1</sub> era um sinal importante para a indução de extravasamento plasmático e influxo de neutrófilos na articulação do joelho do camundongo sob artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA), sugerindo que esse neuropeptídeo interage com outros mediadores (Keeble *et al.*, 2005). Interessantemente, a SP regula a transcrição e a liberação *in vitro* do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) através da ativação seletiva de receptores NK<sub>1</sub> em células inflamatórias de roedores e humanos (Lotz *et al.*, 1988; Ansel *et al.*, 1993; Cocchiara *et al.*, 1997; Dickerson *et al.*, 1998). Entretanto, se essa interação também ocorre *in vivo*, principalmente em tecidos articulares, ainda não foi estabelecido. Mas o fato de estudos clínicos não terem concluído sobre uma correlação direta entre a concentração de neuropeptídeos e a severidade da artrite, sugere que esta seja um processo multi-mediado (Kaneyama *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2007).

O processo de migração de neutrófilos para tecidos perivasculares é mediado pela interação com células endoteliais através de moléculas de adesão. A fase inicial desse processo é caracterizado pela rolagem do neutrófilo sobre o leito vascular. Neutrófilos expressam a L-selectina, a qual é translocada para a superfície extra-celular na presença de mediadores inflamatórios. A célula endotelial, quando estimulada por mediadores como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o

TNF $\alpha$ , sintetiza rapidamente a E-selectina, que é translocada para o lúmen de vênulas pós-capilares. As selectinas promovem a adesão inicial entre neutrófilo e endotélio através de sua interação com carboidratos presentes na superfície celular. Em seguida, ocorre um processo conhecido como ativação e adesão firme, mediado pela interação entre integrinas  $\beta 2$  (CD11/CD18) de neutrófilos e uma proteína da superfamília das imunoglobulinas, a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). A ICAM-1 pode ser induzida pelas citocinas acima citadas, além de outras moléculas como endotoxinas, e o pico de sua expressão ocorre 8 h após o estímulo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Finalmente, o processo de transmigração pode ocorrer na presença de um gradiente quimiotático. O mediador quimiotático para neutrófilos mais bem estabelecido é a interleucina-8 (IL-8). Entretanto, é importante ressaltar que embora esse mediador tenha sido originalmente descrito como uma interleucina, hoje sabe-se que sua estrutura é similar às quimiocinas da família CXC (cis-X-cis), sendo denominada atualmente de CXCL8, onde X, é um aminoácido localizado entre os dois resíduos de cisteína. O processo de migração trans-endotelial é mediado pela molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1). Essa imunoglobulina é altamente expressa nas junções inter-endoteliais, porém sua molécula de interação em neutrófilos ainda não foi estabelecida (Albelda *et al.*, 1994; Abram e Lowell, 2009; Lawson e Wolf, 2009). Por outro lado, ainda está pouco detalhado na literatura o efeito da SP sobre a expressão ou translocação de moléculas de adesão. A SP parece induzir a expressão de ICAM-1 em células endoteliais (Nakagawa *et al.*, 1995). Entretanto, a SP parece promover a adesão inicial do neutrófilo à superfície de células endoteliais, enquanto a migração efetiva estaria na dependência da interação com citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CXCL8 e outras.

Os neuropeptídeos SP, NKA e NKB são expressos primariamente em neurônios de gânglios sensoriais como o gânglio trigeminal, o qual é a maior fonte de inervação sensorial da ATM (Widenfalk e Wiberg, 1990; Casatti *et al.*, 1999), e são transportados anterogradamente através de fibras nervosas (Kido *et al.*, 1993; Uddman *et al.*, 1998; Haeuchi *et al.*, 1999). Já as terminações nervosas proximais dos aferentes primários trigeminais apresentam densa distribuição no subnúcleo caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo (Sp5C), a maior subdivisão do complexo sensorial trigeminal e o principal centro de modulação da transmissão nociceptiva



trigeminal (Sessle, 2000; Bae *et al.*, 2004). Tem sido descrito um aumento significativo no número de neurônios imunorreativos à proteína Fos no Sp5C após estimulação nociceptiva da ATM (Hathaway *et al.*, 1995). Além disto, esse efeito é revertido após administração de morfina ou de MK-801, um antagonista de receptores NMDA (Bereiter e Bereiter, 2000).

De maneira geral, apesar de haver evidências clínicas e experimentais sugerindo o envolvimento de fibras nervosas sensoriais e o neuropeptídeo SP na patofisiologia da artrite na ATM, os mecanismos que medeiam os eventos inflamatórios dessas doenças são pouco conhecidos. Dessa maneira, seria interessante determinar o curso temporal de eventos vasculares e celulares envolvidos no desenvolvimento de uma resposta imunológica inata induzida pela carragenina na ATM do rato, assim como o potencial envolvimento do receptor  $NK_1$  na mediação desses processos.

## 1.2 Receptor Ativado por Protease 2

A liberação de neuropeptídeos a partir de terminações nervosas em órgãos periféricos ou no sistema nervoso central é um processo dependente da ativação de receptores, despolarização de membrana e aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ . Entretanto, receptores de membrana potencialmente envolvidos na liberação de neuropeptídeos em articulações sinoviais são pouco conhecidos.

Os receptores ativados por protease (PAR) pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G. Até o momento, 4 membros dessa família foram caracterizados e nomeados de acordo com a ordem de clonagem dos mesmos. Essa família de receptores é caracterizada por um mecanismo único de ativação, o qual envolve a proteólise do extremo N-terminal extra-celular, levando à exposição de seu ligante endógeno que interage com o domínio do receptor e desencadeia cascatas de sinalização. Sequências hexapeptídicas sintéticas similares ao agonista endógeno presente no N-terminal tem sido utilizadas com êxito como agonistas desses receptores, com exceção do  $PAR_3$ , cujo peptídeo sintético não ativa esse receptor, embora apresente reação cruzada com o  $PAR_4$ . Os receptores  $PAR_1$ ,  $PAR_3$  e  $PAR_4$  são preferencialmente ativados pela trombina, enquanto o  $PAR_2$  pode ser ativado pelas serino-proteases tripsina, triptase de mastócito, protease-3 derivada

de neutrófilo dentre outras. Por outro lado, um outro aspecto extremamente interessante dessa família de receptores é o fato da proteólise de seu N-terminal em região que libera a sequência do ligante endógeno provocar o desarmamento desse receptor, tornando-o irresponsivo. O PAR<sub>2</sub> por exemplo pode ser desarmado pela elastase e catepsina G (Dale e Vergnolle, 2008; Vergnolle, 2009).

A caracterização do mecanismo de ativação desses receptores despertou o interesse em áreas de pesquisa onde o envolvimento de proteases em funções fisiológicas ou fisiopatológicas é bem estabelecido, como no trato digestório e em articulações. Dentre essa família de receptores, o PAR<sub>2</sub> é o mais estudado em gastroenterologia e reumatologia, sendo esse receptor considerado um potencial alvo terapêutico da inflamação nessas áreas (McIntosh *et al.*, 2007; Russell e McDougall, 2009; Vergnolle, 2009). Entretanto, estudos mais detalhados envolvendo o PAR<sub>1</sub> e o PAR<sub>4</sub> começam a surgir na literatura. Outro aspecto interessante ainda relacionado ao PAR<sub>1</sub> e PAR<sub>4</sub>, é que de maneira geral, altas doses de seus agonistas induzem inflamação e dor, enquanto baixas doses, apesar de não induzirem inflamação, produzem analgesia. O PAR<sub>4</sub>, na articulação do joelho do camundongo, parece ser essencialmente pró-inflamatório (McDougall *et al.*, 2009), enquanto no trato gastrointestinal e em seus aferentes sensoriais, baixas doses de seu agonista inibem o desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia *in vivo* e o influxo de Ca<sup>2+</sup> frente a diversos estímulos *in vitro* (Augé *et al.*, 2009). A ativação do PAR<sub>1</sub> parece ter uma ação predominantemente antinociceptiva, mas esse processo parece ser mediado de maneira indireta, via liberação de opióides a partir de células teciduais residentes (Martin *et al.*, 2009).

Ainda com relação ao PAR<sub>2</sub>, seu papel em doenças inflamatórias, cicatrização e dor tem sido bastante esclarecido nos últimos anos, para revisão vide (Dale e Vergnolle, 2008; Vergnolle, 2009). Esse receptor é expresso e funcional em vários tipos celulares envolvidos na patofisiologia da artrite, como em fibroblastos sinoviais, condrócitos, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos B e T, neurônios, células endoteliais e dendríticas (Mari *et al.*, 1996; Howells *et al.*, 1997; Steinhoff *et al.*, 2000; Fields *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2006; Kelso *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2007) e sua ativação parece estar diretamente associada ao desenvolvimento da artrite na articulação do joelho de roedores (Ferrell *et al.*, 2003; Kelso *et al.*, 2006). Embora haja indícios de que esse receptor

medeia a produção de citocinas inflamatórias como  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  em sinoviócitos humanos sob artrite reumatóide, os alvos celulares e os mecanismos pelos quais a ativação de  $PAR_2$  medeia a artrite ainda está longe de ser completamente estabelecido. Além do mais, o efeito da ativação de  $PAR_2$  têm sido estudado em modelos de artrite na articulação do joelho, mas nunca em outras articulações. Em particular, seu potencial como mediador inflamatório na ATM ou mesmo o papel desse receptor na nocicepção de articulações nunca foi avaliado. Dessa maneira, torna-se importante o desenvolvimento de um estudo para avaliar se agonistas  $PAR_2$  induzem inflamação e dor na ATM do rato, assim como observar se mecanismos neurogênicos, como a ativação de receptores  $NK_1$ , estariam envolvidos nesses processos.

## 6 CONCLUSÕES

Em conclusão, demonstramos que uma única injeção de carragenina na ATM do rato resulta em uma resposta inflamatória bifásica e uma alodinia mecânica persistente; caracterizada pela infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos na fase inicial, seguido de um predomínio de monócitos posteriormente; aumento na permeabilidade vascular e produção de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Observamos que os eventos vasculares e celulares da inflamação induzida pela carragenina são mediados por receptores NK $_1$ , mas não a alodinia mecânica. Demonstramos ainda que o PAR $_2$  é constitutivamente expresso na camada íntima da membrana sinovial da ATM, em uma porcentagem elevada de aferentes trigeminais dessa articulação e em terminações nervosas que expressam o neuropeptídeo sensorial SP; e que a ativação desse receptor induz uma resposta inflamatória e o desenvolvimento de alodinia, ambas dependentes de receptores NK $_1$ . Além do mais, observamos que ocorre um aumento significativo na expressão gênica e protéica do PAR $_2$  na ATM após a indução de uma resposta imunológica inata com carragenina nessa articulação.

Esses dados sugerem que fibras nervosas sensoriais são um alvo direto para serino-proteases, implicando a ativação do PAR $_2$  como um sinal para a resposta imunológica inata na articulação, principalmente via mecanismos neurogênicos.

## REFERÊNCIAS\*

- Abe K, Aslam A, Walls AF, Sato T, Inoue H. Up-regulation of protease-activated receptor-2 by bFGF in cultured human synovial fibroblasts. *Life Sci.* 2006;79:898-904.
- Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:339-62.
- Abramson SB, Weissmann G. The mechanism of action of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 1989;32:1-9.
- Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994;8:504-12.
- Ahluwalia A, De Felipe C, O'Brien J, Hunt SP, Perretti M. Impaired IL-1beta-induced neutrophil accumulation in tachykinin NK1 receptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* 1998;124:1013-5.
- Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C epsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol.* 2006;575:555-571.
- Ambalavanar R, Dessem D. Emerging peripheral receptor targets for deep-tissue craniofacial pain therapies. *J Dent Res.* 2009;88:201-11.
- Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF $\alpha$  gene expression in murine mast cells. *J Immunol.* 1993;150:4478-83.
- Appelgren A, Appelgren B, Eriksson S, Kopp S, Lundeberg T, Nylander M, Theodorsson E. Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study. *Scand J Dent Res.* 1991;99:519-21.
- Atsü SS, Ayhan-Ardic F. Temporomandibular disorders seen in rheumatology practices: A review. *Rheumatol Int.* 2006;26:781-787.
- Augé C, Balz-Hara D, Steinhoff M, Vergnolle N, Cenac N. Protease-activated receptor-4 (PAR(4)): a role as inhibitor of visceral pain and hypersensitivity. *Neurogastroenterol Motil.* *In press* 2009.
- Bae YC, Oh JM, Hwang SJ, Shigenaga Y, Valtschanoff JG. Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol.* 2004;478: 62-71.
- Bakke M, Hu JW, Sessle BJ. Involvement of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor mechanisms in jaw muscle activity reflexly evoked by inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint. *Pain.* 1998;75:219-227.

---

\* 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].

- Bereiter DA, Bereiter DF. Morphine and NMDA receptor antagonism reduce c-fos expression in spinal trigeminal nucleus produced by acute injury to the TMJ region. *Pain*. 2000;85:65-77.
- Bluff JE, Brown NJ, Reed MW, Staton CA. Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. *Breast Cancer Res*. 2008;10:204.
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985a;313:54-6.
- Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*. 1985b;86:855-60.
- Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology*. 1997;37:133-152.
- Bromley M, Woolley DE. Histopathology of the rheumatoid lesion: identification of cell types at sites of cartilage erosion. *Arthritis Rheum*. 1984;27:857-863.
- Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa WC, Ignarro LJ, Cirino G. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:904-908.
- Cairns JA. Inhibitors of mast cell tryptase beta as therapeutics for the treatment of asthma and inflammatory disorders. *Pulm Pharmacol Ther*. 2005;18:55-66.
- Cao T, Pintér E, Al-Rashed S, Gerard N, Hoult JR, Brain SD. Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J Immunol*. 2000;164:5424-9.
- Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Srinivasan GR, Theodorsson E, Lundberg T. Effects of adjuvant on neuropeptide-like immunoreactivity in experimentally induced temporomandibular arthritis in rats. *Arch Oral Biol*. 1996;41:705-712.
- Casatti CA, Frigo L, Bauer JA. Origin of sensory and autonomic innervation of the rat temporomandibular joint: a retrograde axonal tracing study with the fluorescent dye fast blue. *J Dent Res*. 1999;78:776-783.
- Castro AR, Pinto M, Lima D, Tavares L. Secondary hyperalgesia in the monoarthritic rat is mediated by GABAB and NK1 receptors of spinal dorsal horn neurons: a behavior and c-fos study. *Neuroscience*. 2006;141:2087-2095.
- Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: Possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol*. 2003;170:4296-4300.
- Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest*. 2007;117:636-47.

- Cenac N, Altier C, Chapman K, Liedtke W, Zampon G, Vergnolle N. Transient receptor potential vanilloid-4 has a major role in visceral hypersensitivity symptoms. *Gastroenterology*. 2008;135:937-946.
- Cocchiara R, Bongiovanni A, Albeggiani G, Azzolina A, Geraci D. Substance P selectively activates TNF $\alpha$  mRNA in rat uterine immune cells: a neuroimmune link. *Neuroreport*. 1997;8:2961-64.
- Costa SK, Yshii LM, Poston RN, Muscará MN, Brain SD. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF $\alpha$  in the cutaneous microvasculature. *J Neuroimmunol*. 2006a;171:99-109.
- Costa SK, Starr A, Hyslop S, Gilmore D, Brain SD. How important are NK1 receptors for influencing microvascular inflammation and itch in the skin? Studies using *Phoneutria nigriventer* venom. *Vascul Pharmacol*. 2006b;45:209-214.
- Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1984;27:845-851.
- Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci*. 2004;24:4293-99.
- Dale C, Vergnolle N. Protease signaling to G protein-coupled receptors: Implications for inflammation and pain. *J Recept Signal Transduct Res*. 2008;28:29-37.
- Díaz-González F, Sanchez-Madrid F. Inhibition of leukocyte adhesion: An alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunol Today*. 1998;19:169-72.
- Dickerson C, Udem B, Bullock B, Winchurch RA. Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *J Leukoc Biol*. 1998;63:602-5.
- Dinh QT, Cryer A, Dinh S, Trevisani M, Georgiewa P, Chung F. Protease-activated receptor 2 expression in trigeminal neurons innervating the rat nasal mucosa. *Neuropeptides*. 2005;39:461-66.
- Dubner R, Sessle BJ, Storey AT. The neural basis of oral and facial function. New York: Plenum; 1978.
- Egan CG, Lockhart JC, Ferrell WR, Day SM, McLean JS. Pathophysiological basis of acute inflammatory hyperaemia in the rat knee: roles of cyclo-oxygenase-1 and -2. *J Physiol*. 2002;539:579-587.
- Elenkov IJ. Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem Int*. 2008;52:40-51.
- Fajardo I, Pejler G. Human mast cell-tryptase is a gelatinase. *J Immunol*. 2003;171:1493-9.
- Feldmann M, Maini RN. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 1999;38:3-7.

Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso EB, Dunning L, Plevin R, Meek SE, Smith AJ, Hunter GD, McLean JS, McGarry F, Ramage R, Jiang L, Kanke T, Kawagoe, J. Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest.* 2003;111:35-41.

Fields RC, Schoenecker JG, Hart JP, Hoffman MR, Pizzo SV, Lawson JH. Protease-activated receptor-2 signaling triggers dendritic cell development. *Am J Pathol.* 2003;162:1817-22.

Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjelle'n L. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature.* 1999;400:773-76.

Fries JF. How may quality of life for rheumatoid arthritis patients be enhanced by current and future treatments? *Rheumatology.* 1999;38:35-40.

Gao YJ, Zhang YQ, Zhao ZQ. Involvement of spinal neurokinin-1 receptors in the maintenance but not induction of carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Brain Res Bull.* 2003;61:587-93.

Goulart AC, Correia FAS, Sousa SCOM, Luz JGC. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. *Braz Oral Res.* 2005;19:99-105.

Graabaek 1985. Absorption of intraarticularly injected horseradish peroxidase in synoviocytes of rat synovial membrane: an ultrastructural-cytochemical study. *J Ultrastruct Res.* 1985;92:86-100.

Grabowski PS, Wright PK, Van 't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol.* 1997;36:651-5.

Grant AD, Akhtar R, Gerard NP, Brain SD. Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanisms. *J Physiol.* 2002;543:1007-14.

Grant AD, Cottrell GS, Amadesi S, Trevisani M, Nicoletti P, Materazzi S et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol.* 2007;578:715-733.

Gu Z, Feng J, Shibata T, Hu J, Zhang Z. Type II collagen and aggrecan mRNA expression by in situ hybridization in rabbit temporomandibular joint posterior attachment following disc displacement. *Arch Oral Biol.* 2003;48:55-62.

Haeuchi Y, Matsumoto K, Ichikawa H, Maeda S. Immunohistochemical demonstration of neuropeptides in the articular disk of the human temporomandibular joint. *Cell Tissue Org.* 1999;164:205-211.

Hallgren J, Karlson U, Poorafshar M, Hellman L, Pejler G. Mechanism for activation of mouse mast cell tryptase: dependence on heparin and acidic pH for formation of active tetramers of mouse mast cell protease 6. *Biochemistry.* 2000;39:13068-77.

Hamerman JA, Aderem A. Functional transitions in macrophages during in vivo infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Immunol.* 2001;167:2227-33.



Hathaway CB, Hu JW, Bereiter DA. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. *J Comp Neurol.* 1995;356:444-56.

Hirota Y, Osuga Y, Hirata T, Harada M, Morimoto C, Yoshino O, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Activation of protease-activated receptor 2 stimulates proliferation and interleukin (IL)-6 and IL-8 secretion of endometriotic stromal cells. *Hum Reprod.* 2005;20:3547-53.

Higgs GA, Eakins KE, Mugridge KG, Moncada S, Vane JR. The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. *Eur J Pharmacol.* 1980;66:81-6.

Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol.* 1997;159:5654-60.

Holmlund A, Ekblom A, Hansson P, Lind J, Lundeberg T, Theodorsson E. Concentrations of neuropeptides substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid of the human temporomandibular joint. A correlation with symptoms, signs and arthroscopic findings. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1991;20:228-31.

Howells GL, Macey MG, Chinni C, Hou L, Fox MT, Harriott P et al. Proteinase-activated receptor-2: Expression by human neutrophils. *J Cell Sci.* 1997;110:881-887.

Huang C, Wong GW, Ghildyal N, Gurish MF, Sali A, Matsumoto R, et al. The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *J Biol Chem.* 1997;272:31885-93.

Huang C, Friend DS, Qiu WT, Wong GW, Morales G, Hunt J, Stevens RL. Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6. *J Immunol.* 1998;160:1910-19.

Huang C, Morales G, Vago A, Chanasyk K, Ferrazzi M, Burklow C, Qiu WT, Feyfant E, Sali A, Stevens RL. Formation of enzymatically active, homotypic, and heterotypic tetramers of mouse mast cell tryptases: dependence on a conserved Trp-rich domain on the surface. *J Biol Chem.* 2000;275:351-58.

Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature.* 1999;400:769-72.

Ingawalé S, Goswami T. Temporomandibular joint: disorders, treatments, and biomechanics. *Ann Biomed Eng.* 2009;37:976-96.

Ingram KR, Wann AK, Wingate RM, Coleman PJ, McHale N, Levick JR. Signal pathways regulating hyaluronan secretion into static and cycled synovial joints of rabbits. *J Physiol.* 2009;587:4361-76.

Jennings JH, Linderman DJ, Hu B, Sonstein J, Curtis JL. Monocytes recruited to the lungs of mice during immune inflammation ingest apoptotic cells poorly. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:108-17.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-g agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391:82-6.

Jiang X, Bailly MA, Panetti TS, Cappello M, Konigsberg WH, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. *J Thromb Haemost*. 2004;2:93-101.

Jiang X, Zhu S, Panetti TS, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex induces activation of the mTOR pathway which regulates migration of human breast cancer cells. *Thromb Haemost*. 2008;100:127-33.

Kajikawa H, Yoshida N, Katada K, Hirayama F, Handa O, Kokura S, Naito Y, Yoshikawa T. *Helicobacter pylori* activates gastric epithelial cells to produce interleukin-8 via protease-activated receptor 2. *Digestion*. 2007;76:248-55.

Kakudo K, Takasu J, Yamamoto S. Ultrastructural observations of horseradish peroxidase in synovial lining cells of the rats' temporomandibular joint. *J Dent Res*. 1977;56:1376.

Kaneyama K, Segami N, Sato J, Fujimura K, Nagao T, Yoshimur H. Prognostic factors in arthrocentesis of the temporomandibular joint: comparison of bradykinin, leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, and substance P level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:242-47.

Kawao N, Shimada C, Itoh H, Kuroda R, Kawabata A. Capsazepine inhibits thermal hyperalgesia but not nociception triggered by protease-activated receptor-2 in rats. *Jpn J Pharmacol*. 2002;89:184-87.

Keeble J, Blades M, Pitzalis C, Castro da Rocha FA, Brain SD. The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. *Br J Pharmacol*. 2005;144:1059-66.

Kelso EB, Lockhart JC, Hembrough T, Dunning L, Plevin R, Hollenberg MD et al. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316:1017-24.

Kelso EB, Ferrell WR, Lockhart JC, Elias-Jones I, Hembrough T, Dunning L et al. Expression and proinflammatory role of proteinase-activated receptor 2 in rheumatoid synovium - Ex vivo studies using a novel proteinase-activated receptor 2 antagonist. *Arthritis Rheum*. 2007;56:765-71.

Kido MA, Kiyoshima T, Kondo T, Ayasaka N, Moroi R, Terada Y, Tanaka T. Distribution of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint. *J Dent Res*. 1993;72:592-98.

Kido MA, Kondo T, Ayasaka N, Terada Y, Tanaka T. The peripheral distribution of trigeminal nerve fibres in the rat temporomandibular joint studied by an anterograde axonal transport method with wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *Arch Oral Biol*. 1995;36:397-400.

Kim YS, Paik SK, Cho YS, Shin HS, Bae JY, Moritani M, Yoshida A, Ahn DK, Valtschanoff J, Hwang SJ, Moon C, Bae YC. Expression of P2X<sub>3</sub> receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat. *J Comp Neurol*. 2008;506:627-39.

Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol*. 1998;86:80-86.

- Laurenzi MA, Persson MA, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A. The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand J Immunol.* 1990;31:529-33.
- Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009;61:22-32.
- Lee HR, Ho WZ, Douglas SD. Substance P augments tumor necrosis factor release in human monocyte-derived macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994;1:419-23.
- Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1979;310:175-83.
- Levine JD, Khasar SG, Green PG. Neurogenic inflammation and arthritis. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1069:155-67.
- Lindner JR, Kahn ML, Coughlin SR, Sambrano GR, Schauble E, Bernstein D, Foy D, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol.* 2000;165:6504-10.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- Lohi J, Harvima I, Keski-Oja J. Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem.* 1992;50:337-49.
- Loi H, Kido MA, Zhang JQ, Yamaza T, Nakata S, Nakasima A et al. Capsaicin receptor expression in the rat temporomandibular joint. *Cell Tissue Res.* 2006;325:47-54.
- Lotz M, Vaughan JH, Crason DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science.* 1988;241:1218-20.
- Lundeberg T, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Carleson J, Kopp S, Theodorsson E. A model for experimentally induced temporomandibular joint arthritis in rats: effects of carrageenan on neuropeptide-like immunoreactivity. *Neuropeptides.* 1996;30:37-41.
- Mackie EJ, Loh LH, Sivagurunathan S, Uaesoontrachoon K, Yoo HJ, Wong D, Georgy SR, Pagel CN. Protease-activated receptors in the musculoskeletal system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1169-84.
- Madeira MC. Anatomia da face. Bases Anátomo-Funcionais para a Prática Odontológica. Articulação Temporomandibular. 5<sup>o</sup> ed. São Paulo: Editora Sarvier; 2004. 248 p.
- Maggi CA, Schwartz TW. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18:351-55.
- Mapp PI, Revell PA. Fibronectin production by synovial intimal cells. *Rheumatol Int.* 1985;5:229-37.
- Mari B, Guerin S, Far DF, Breitmayer JP, Belhacene N, Peyron JF et al. Thrombin and trypsin-induced  $Ca^{2+}$  mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB J.* 1996;10:309-16.

Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum.* 1990;33:87-90.

Martin L, Augé C, Boué J, Buresi MC, Chapman K, Asfaha S, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Cenac N, Dietrich G, Vergnolle N. Thrombin receptor: An endogenous inhibitor of inflammatory pain, activating opioid pathways. *Pain. In press* 2009.

Masuko K, Murata M, Xiang Y, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, et al. Tryptase enhances release of vascular endothelial growth factor from human osteoarthritic chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25:860-65.

Matsubara T, Spycher MA, Rüttner JR, Fehr K. The ultrastructural localization of fibronectin in the lining layer of rheumatoid arthritis synovium: the synthesis of fibronectin by type B lining cells. *Rheumatol Int.* 1983;3:75-79.

McIntosh KA, Plevin R, Ferrel WR, Lockhart JC. The therapeutic potential of proteinase-activated receptors in arthritis. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:334-38.

McNeil HP, Shin K, Campbell IK, Wicks IP, Adachi R, Lee DM, Stevens RL. The mouse mast cell-restricted tetramer-forming tryptases mouse mast cell protease 6 and mouse mast cell protease 7 are critical mediators in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2338-46.

Milner JM, Patel A, Rowan AD. Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3644-56.

Mizoguchi I, Takahashi I, Nakamura M, Sasano Y, Sato S, Kagayama M, Mitani H. An immunohistochemical study of regional differences in the distribution of type I and type II collagens in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol.* 1996;41:863-69.

Moraes TJ, Martin R, Plumb JD, Vachon E, Cameron CM, Danesh A, Kelvin DJ, Ruf W, Downey GP. Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonal infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294:368-77.

Moriyuki K, Nagataki M, Sekiguchi F, Nishikawa H, Kawabata A. Signal transduction for formation/release of interleukin-8 caused by a PAR2-activating peptide in human lung epithelial cells. *Regul Pept.* 2008;145:42-48.

Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66:307-14.

Nakagawa N, Sano H, Iwamoto I. Substance P induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration. *Peptides.* 1995;16:721-25.

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology. Development, Structure, and Function. Temporomandibular Joint. 7<sup>a</sup> ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2007. 432 p.

Nguyen C, Coelho AM, Grady E, Compton SJ, Wallace JL, Hollenberg MD et al. Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:920-27.

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;61:451-66.

Nozawa-Inoue K, Ajima H, Takagi R, Maeda T. Immunocytochemical demonstration of laminin in the synovial lining layer of the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 1999;44:531-34.

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;66:289-06.

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem.* 2002;277:13375-78.

Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K. Secretory granules of B-cells in the synovial membrane. An ultrastructural and cytochemical study. *Cell Tissue Res.* 1981;216:131-41.

Okamoto K, Imbe H, Tashiro A, Kumabe S, Senba E. Blockade of peripheral 5HT3 receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. *Neurosci Lett.* 2004;367:259-63.

Okamoto K, Kimura A, Donishi T, Imbe H, Senba E, Tamai Y. Central serotonin 3 receptors play an important role in the modulation of nociceptive neural activity of trigeminal subnucleus caudalis and nocifensive orofacial behavior in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. *Neuroscience.* 2005;135:569-81.

Okamoto K, Kimura A, Donishi T, Imbe H, Nishie Y, Matsushita H, Tamai Y, Senba E. Contribution of peripheral 5-HT2A or 5-HT3 receptors to Fos expression in the trigeminal spinal nucleus produced by acute injury to the masseter muscle during persistent temporomandibular joint inflammation in rats. *Neuroscience.* 2006;143:597-06.

Oliveira MC, Parada CA, Veiga MC, Rodrigues LR, Barros SP, Tambeli CH. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *Eur J Pain.* 2005;9:87-93.

Palmer HS, Kelso EB, Lockhart JC, Sommerhoff CP, Plevin R, Goh FG et al. Protease-activated receptor 2 mediates the proinflammatory effects of synovial mast cells. *Arthritis Rheum.* 2007;56:3532-40.

Pan SL, Tao KY, Guh JH, Sun HL, Huang DY, Chang YL, Teng CM. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in PAR2-induced endothelial IL-8 production and leukocyte adhesion. *Shock.* 2008;30:496-02.

Parnham MJ. Antirheumatic agents and leukocyte recruitment. New light on the mechanism of action of oxaceprol. *Biochem Pharmacol.* 1999;58:209-15.

Paszczuk AF, Quintao NLM, Fernandes ES, Juliano L, Chapman K, Andrade-Gordon P et al. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. *Eur J Pharmacol.* 2008;581:204-15.

Patarroyo M, Makgoba MW. Leucocyte adhesion to cells in immune and inflammatory responses. *Lancet.* 1989;8672:1139-42.

- Patarroyo M, Prieto J, Rincon J, Timonen T, Lundberg C, Lindbom L, Asjö B, Gahmberg CG. Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev.* 1990;114:67-108.
- Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.* 2004;142:331-38.
- Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104:567-77.
- Ramachandran R, Morice AH, Compton SJ. Proteinase-activated receptor2 agonists upregulate granulocyte colony-stimulating factor, IL-8, and VCAM-1 expression in human bronchial fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35:133-41.
- Ranganathan P. An update on pharmacogenomics in rheumatoid arthritis with a focus on TNF-blocking agents. *Curr Opin Mol Ther.* 2008;10:562-67.
- Rawlingson A, Costa SK, Brain SD. Role of tachykinins in neurogenic inflammation of the skin and other external surfaces (rev). *Handb Exp Pharmacol.* 2004;164:459-90.
- Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav.* 1999;67:711-16.
- Rittner HL, Lux C, Labuz D, Mousa SA, Schäfer M, Stein C, Brack A. Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception. *Anesthesiology.* 2007;107:1009-17.
- Roy S, Ghadially FN. Synthesis of hyaluronic acid by synovial cells. *J Pathol Bacteriol.* 1967;93:555-57.
- Rupniak NM, Tattersall FD, Williams AR, Rycroft W, Carlson EJ, Cascieri MA, Sadowski S, Ber E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Seward E, Huscroft I, Owen S, Swain CJ, Hill RG, Hargreaves RJ. In vitro and in vivo predictors of the anti-emetic activity of tachykinin NK1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1997;326:201-09.
- Russell FA, McDougall JJ. Proteinase activated receptor (PAR) involvement in mediating arthritis pain and inflammation. *Inflamm Res.* 2009;58:119-26.
- Sandler C, Lindstedt KA, Joutsiniemi S, Lappalainen J, Juutilainen T, Kolah J, Kovanen PT, Eklund KK. Selective activation of mast cells in rheumatoid synovial tissue results in production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-1Ra. *Inflamm Res.* 2007;56:230-39.
- Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Abe A, Yoshimura H et al. Expression of capsaicin receptor TRPV-1 in synovial tissues of patients with symptomatic internal derangement of the temporomandibular joint and joint pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:674-81.
- Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Yoshimura H, Fujimura K, Kitagawa Y. Specific expression of substance P in synovial tissues of patients with symptomatic, non-reducing internal derangement of the temporomandibular joint: Comparison with clinical findings. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45:372-77.
- Schaible H-G, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* 1993;55:5-54.

Schwartz LB, Bradford TR, Littman BH, Wintroub BU. The fibrinogenolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *J Immunol.* 1985;135:2762-67.

Schwartz LB, Bradford TR. Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin: stabilization of the active tetramer. *J Biol Chem.* 1986;261:7372-79.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6:1191-97.

Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:57-91.

Sluka KA, Milton MA, Willis WD, Westlund KN. Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *Br J Pharmacol.* 1997;120:1263-73.

Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, Adachi R, Gurish MF, Gobezie R, Stevens RL, Lee DM. Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J Immunol.* 2009;182:647-56.

Shinoda M, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y Changes in P2X3 receptor expression in the trigeminal ganglion following monoarthritis of the temporomandibular joint in rats. *Pain.* 2005;116:42-51.

Shpacovitch VM, Varga G, Strey A, Gunzer M, Mooren F, Buddenkotte J, Vergnolle N, Sommerhoff CP, Grabbe S, Gerke V, Homey B, Hollenberg M, Luger TA, Steinhoff M. Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J Leukoc Biol.* 2004;76:388-98.

Shpacovitch V, Feld M, Hollenberg MD, Luger TA, Steinhoff M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol.* 2008;83:1309-22.

Song F, Windsor LJ. Novel nonmatrix-metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1721:65-72.

Song F, Bergdoll AS, Windsor LJ. Temporomandibular joint synovial fibroblasts mediate serine proteinase dependent Type I collagen degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760:1521-28.

Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med.* 2000;6:151-58.

Su X, Camerer E, Hamilton JR, Coughlin SR and Matthay MA. Protease-activated receptor-2 activation induces acute lung inflammation by neuropeptide-dependent mechanisms. *J Immunol.* 2005;175:2598-05.

- Ta LE, Dionne RA. Treatment of painful temporomandibular joints with a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized placebo-controlled comparison of celecoxib to naproxen. *Pain*. 2004;111:13-21.
- Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Nasu M, Kadoi J, Shima Y, Ohta H, Matsumoto S. Temporomandibular joint inflammation potentiates the excitability of trigeminal root ganglion neurons innervating the facial skin in rats. *J Neurophysiol*. 2005a;93:2723-38.
- Takeda M, Tanimoto T, Nasu M, Ikeda M, Kadoi J, Matsumoto S. Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. *Pain*. 2005b;116:375-85.
- Tambeli CH, Seo K, Sessle BJ, Hu JW. Central mu opioid receptor mechanisms modulate mustard oil-evoked jaw muscle activity. *Brain Res*. 2001;913:90-94.
- Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: Etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res*. 2008;87:296-307.
- Tanaka Y, Sekiguchi F, Hong H, Kawabata A. PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377:622-6.
- Tesser-Viscaíno SA, Denadai-Souza A, Ervolino E, Costa SKP, Rizzolo RJC, Muscará MN, Casatti CA. Putative antinociceptive action of nitric oxide in the caudal part of the spinal trigeminal nucleus during chronic carrageenan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint. *Brain Res*. *In press* 2009.
- Tetlow LC, Woolley DE. Distribution, activation and tryptase/chymase phenotype of mast cells in the rheumatoid lesion. *Ann Rheum Dis*. 1995;54:549-55.
- Ting E, Roveroni RC, Ferrari LF, Lotufo CM, Veiga MC, Parada CA, Tambeli CH. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. *Life Sci*. 2007;81:765-71.
- Uddman R, Grunditz T, Kato J, Sundler F. Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anat Embryol*. 1998;197:273-82.
- Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol*. 1999;163:5064-9.
- Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum AI, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med*. 2001;7:821-26.
- Vergnolle N, Ferazzini M, D'Andrea MR, Buddenkotte J, Steinhoff M. Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. *Trends Neurosci*. 2003;26:496-500.
- Vergnolle N. Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther*. 2009;123:292-309.
- Visnapuu V, Peltomäki T, Säämänen AM, Rönning O. Collagen I and II mRNA distribution in the rat temporomandibular joint region during growth. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 2000;20:144-9.



- Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:391-99.
- 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;61:278-82.
- Xiang Y, Masuko-Hongo K, Sekine T, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K et al. Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1 beta, TNF-alpha and TGF-beta. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1163-73.
- Wong GW, Yasuda S, Morokawa N, Li L, Stevens RL. Mouse chromosome 17A3.3 contains 13 genes that encode functional tryptic-like serine proteases with distinct tissue and cell expression patterns. *J Biol Chem.* 2004;279:2438-52.
- Widenfalk B, Wiberg M. Origin of sympathetic and sensory innervation of the temporomandibular joint. A retrograde axonal tracing study in the rat. *Neurosci Lett.* 1990;109:30-35.
- Wink CS, Onge M, Zimny ML. Neural elements in the human temporomandibular articular disk. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992;50:334-37.
- Yoshida N, Katada K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Mukaida N, Soma T, Shimada Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Interleukin-8 production via protease-activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells. *Int J Mol Med.* 2007;19:335-40.
- Yu XM, Sessle BJ, Haas DA, Izzo A, Vernon H, Hu JW. Involvement of NMDA receptor mechanisms in jaw electromyographic activity and plasma extravasation induced by inflammatory irritant application to temporomandibular joint region of rats. *Pain.* 1996;68:169-78.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16:109-10.
- Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen JS, van den Berg W, Schett G. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:11742-57.