FLÁVIA BATISTA CHAVES DE LIRA

ESTUDO DOS EFEITOS DO COMPOSTO GYY-4137, UM DOADOR DE SULFETO DE HIDROGÊNIO (H_2S), NA SINOVITE AGUDA 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
2016

FLÁVIA BATISTA CHAVES DE LIRA

ESTUDO DOS EFEITOS DO COMPOSTO GYY-4137, UM DOADOR DE SULFETO DE HIDROGÊNIO (H_2S), NA SINOVITE AGUDA 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.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão original

São Paulo
2016

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

Lira, Flávia Batista Chaves de.
Estudo dos efeitos do composto GYY-4137, um doador de sulfeto de hidrogênio (H2S), na sinovite aguda induzida por carragenina na articulação temporomandibular de ratos / Flávia Batista Chaves de Lira. -- São Paulo, 2016.

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: Estudo da participação do sulfeto de hidrogênio nas respostas inflamatória e nociceptiva.

Versão do título para o inglês: Study of the effects of GYY-4137 compound, a donor of hydrogen sulfide (H2S), in carrageenan-induced acute synovitis in temporomandibular joint of rats.

1. Inflamação 2. Articulação temporomandibular 3. Sulfeto de hidrogênio 4. Carragenina 5. Sinovite 6. Nocicepção I. Muscará, Prof. Dr. Marcelo Nicolás II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB09/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia Batista Chaves de Lira.

Título da Dissertação: Estudo dos efeitos do composto GYY-4137, um doador de sulfeto de hidrogênio (H2S), na sinovite aguda 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 ...../...../....., considerou

( ) 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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.070/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 046/10/CEUA, datado de 10.06.2010 e por solicitação do Prof. Dr. **Marcelo Nicolas Muscará**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Flávia Batista Chaves de Lira** ao Projeto de Pesquisa "Indução de artrite na articulação temporomandibular (ATM) de ratos pela carragenina", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

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

Of.CEUA. 052.13

São Paulo, 02 de agosto de 2013.

REF.: Protocolo nº 046/2010.

"Indução de artrite na articulação temporomandibular (ATM) de ratos pela carragenin"

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 10.06.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Ednéia e Luíz, pelas preces, apoio e incentivo.

À minha irmã Paula, por ser minha primeira e melhor amiga.

Ao meu marido Alexandre, pelo amor, companheirismo e pela paciência em ceder nosso tempo ao meu estudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter colocado pessoas especiais em meu caminho sem as quais eu não seria capaz de chegar até aqui.

Gostaria de agradecer especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, por acreditar em meu potencial e em meu trabalho e por não me deixar esmorecer. Obrigada pela força, pelos ensinamentos e pela orientação. Suas palavras e incentivo foram essenciais para que eu concluísse este projeto. É um privilégio tê-lo como orientador!

À Prof. Dra. Soraia Costa, pelo acompanhamento, sugestões e críticas que muito ajudaram a enriquecer esta pesquisa.

À Dra. Simone Aparecida Teixeira (Simon) pela inifinita paciência em ensinar e supervisionar os ensaios bioquímicos realizados neste trabalho. Por compartilhar seus conhecimentos com todos e pela disposição em me ajudar na contagem total de células.

Ao Marco que me ensinou a técnica de indução de sinovite na ATM de ratos. Obrigada pelo tempo dedicado a me ensinar e sanar minhas dúvidas.

Ao Prof. Mathew Whiteman por ter cedido o GYY-4137 para a realização deste trabalho.

À Mariana Sandy, que chegou em um momento difícil e com sua energia e alegria contagiantes tornou minha jornada mais leve e agradável. Sua ajuda foi fundamental para a conclusão deste projeto.

À Karla Feitosa pelas conversas, pelo convívio e pelo auxílio na contagem celular diferencial.

Ao Leandro pelas palavras de incentivo durante uma fase difícil que me deram forças e fé para continuar. Sua paixão pela pesquisa, pelo H_2S e pelo ensino são inspiradores!

À todos os meus amigos do laboratório Sílvia, Leandro, Tuanny, Mariana, Flávia Neto, Anderson, Mayrine, Karla, Salvador, Elly, Simone, Antônio e Irene. Obrigada pelo acolhimento, companheirismo, por cada crítica ou correção, por todos os ensinamentos e por compartilharem seus conhecimentos comigo. Sou muito grata por fazer parte da “família dos mediadores gasosos” e agradeço profundamente a todos que fizeram parte desta jornada.

Aos meus pais, Ednéia e Luíz, que são meu exemplo de vida. Obrigada pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos. Por sempre enfatizarem a importância da formação acadêmica e por me apoiarem em minhas decisões.

À minha querida irmã Paula, que sempre foi e será minha cumplice, amiga e companheira de toda vida. Obrigada por ouvir e compartilhar comigo histórias, sonhos, lamentos e alegrias e por sempre torcer pelo meu sucesso.

Ao meu marido Alexandre, por permanecer ao meu lado em todos os momentos. Graças ao seu amor, apoio, companheirismo, amizade, paciência e compreensão este trabalho pôde ser concretizado.

À toda a minha família e amigos, pela torcida e pelo carinho.

Aos animais utilizados nesta pesquisa, meu profundo respeito e agradecimento.

Às agencias de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro prestado ao projeto.

“Muitas das coisas mais importantes do mundo foram conseguidas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver mais nenhuma esperança de sucesso.”

Dale Carnegie

RESUMO

Lira FBC. Estudo dos efeitos do composto GYY-4137, um doador de sulfeto de hidrogênio (H_2S), na sinovite aguda induzida por carragenina na articulação temporomandibular de ratos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é uma molécula sinalizadora produzida endogenamente que desempenha um importante papel em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo na inflamação e nocicepção. Apesar do reconhecimento de sua importância biológica e de seus efeitos benéficos, os mecanismos de ação do H_2S nos processos inflamatórios articulares não estão definitivamente estabelecidos. Em vista disso, os objetivos deste estudo são avaliar os efeitos de um doador de H_2S de liberação lenta, GYY-4137, na sinovite induzida pela injeção intra-articular de carragenina (CGN) na ATM de ratos Wistar machos, e caracterizar farmacologicamente os mecanismos envolvidos. Os resultados deste estudo mostraram que a injeção de CGN induziu sinovite aguda na ATM dos animais, caracterizada por alodinia mecânica, recrutamento de neutrófilos na cavidade, aumento do infiltrado neutrofílico na membrana sinovial (avaliado como atividade de MPO) e aumento da produção de citocinas IL-1β e IL-6. A administração concomitante de GYY-4137 reduziu a alodinia mecânica e o influxo leucocitário. Com relação aos mecanismos envolvidos, observamos que o bloqueio dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) pela glibenclamida antagonizou o efeito antinociceptivo do GYY-4137 sem interferir no recrutamento de leucócitos. Ainda, observamos que o GMPc participa das ações anti-inflamatória e antinociceptiva do H_2S de forma contrária, visto que a inibição da enzima guanilato ciclase solúvel pelo ODQ antagonizou a ação anti-inflamatória do GYY-4137 (mas não afetou a antinociceptiva), e a inibição da enzima fosfodiesterase-V pelo sildenafil foi capaz de reverter a ação antinocipetiva do GYY-4137 sem afetar sensivelmente a anti-inflamatória (avaliada pela atividade tecidual de MPO). Estes resultados evidenciam que doadores de H_2S como o GYY-4137 possuem potencial terapêutico para serem usados no tratamento de distúrbios temporomandibulares de etiologia inflamatória.

Palavras-chave: Inflamação. Articulação temporomandibular. Sulfeto de hidrogênio. Carragenina. Sinovite. Nocicepção. Rato.

ABSTRACT

Lira FBC. Study of the effects of GYY-4137 compound, a donor of hydrogen sulfide (H_2S), in carrageenan-induced acute synovitis in temporomandibular joint of rats. [dissertation (Master thesis in Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Hydrogen sulfide (H_2S) is an endogenously produced signaling molecule that plays important roles in many physiological and pathological processes, including inflammation and nociception. Despite the recognition of its biological importance and beneficial effects, the mechanisms of action of H_2S in joint inflammation are not definitely established. In this way, the objectives of this study were to evaluate the effects of a slow-releasing H_2S donor, GYY-4137, in synovitis induced by intra-articular injection of carrageenan (CGN) into the TMJ of male Wistar rats, and to pharmacologically characterize the mechanisms involved. The results of this study showed that the injection of CGN induced acute synovitis in TMJ of the animals, characterized by mechanical allodynia, neutrophil recruitment into the cavity, increased neutrophil infiltrate into the synovial membrane (evaluated as MPO activity) and increased production of the cytokines IL-1β and IL-6. The concomitant administration of GYY-4137 reduced mechanical allodynia and leukocyte influx. Regarding the mechanisms involved, we observed that the blockade of ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) by glibenclamide antagonized the analgesic effect of GYY-4137 without interfering with leukocyte recruitment. In addition, we found that cGMP participates in the anti-inflammatory and antinociceptive actions of H_2S in an opposite way, as the inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ antagonized the anti-inflammatory actions of GYY-4137 (but did not affect the antinociceptive effects), and the inhibition of phosphodiesterase-V by sildenafil was able to reverse the antinociceptive action of GYY-4137 without substantially affecting the anti-inflammatory actiuns (as assessed by tissular MPO activity). These results evidence that H_2S donors like GYY-4137 have therapeutic potential for being used in the treatment of temporomandibular disorders of inflammatory etiology.

Keywords: Inflammation. Temporomandibular joint. Hydrogen sulfide. Carrageenan. Synovitis. Nociception. Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Articulação Temporomandibular……..……. 20

Figura 2: Principais vias para síntese de H_2S……..... 27

Figura 3: Estrutura química de alguns doadores de H_2S……..... 30

Figura 4: Efeito da injeção de CGN na ATM de ratos…..……..... 44

Figura 5: Efeito do GYY-4137 sobre a alodinia mecânica……..... 45

Figura 6: Efeito do GYY-4137 sobre atividade de MPO no tecido sinovial da ATM de ratos……..……..... 46

Figura 7: Efeito do GYY-4137 sobre o influxo leucocitário na cavidade articular da ATM de ratos……..……..... 47

Figura 8: Efeito do bloqueio dos canais K_{ATP} pela glibenclamida sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137 …..... 49

Figura 9: Efeito da inibição da guanilato ciclase solúvel pelo ODQ sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137..... 51

Figura 10: Efeito do inibidor da fosfodiesterase tipo-V sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137……..... 52

Figura 11: Efeito do doador de NO sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137……..... 54

Figura 12: Concentração de citocinas no tecido sinovial da ATM de ratos..... 56

Figura 13: Avaliação do efeito do GYY-4137 sobre a atividade das enzimas antioxidantes no tecido sinovial da ATM de ratos com sinovite induzida por CGN……..... 58

Figura 14: Detecção das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 no tecido sinovial da ATM de ratos……..... 60

Figura 15: Detecção das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 no plasma de ratos……..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos farmacológicos para o estudo do mecanismo de ação do H_2S……..……..……..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3MP	- 3 mercaptopiruvato
3MST	- 3 mercaptopiruvato sulfotransferase
AINES	- Anti-inflamatório não esteróide
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	- Análise de variância de uma via
ATM	- Articulação temporomandibular
ATP	- Adenosina trifosfato
BSA	- Albumina sérica bovina
Ca^{2+}	- Cálcio
CAT	- Cisteína aminotransferase
CBS	- Cistationina β sintetase
CDNB	- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	- Comissão de ética no uso de animais
CFA	- Adjuvante completo de Freund
CGN	- Carragenina
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CO	- Monóxido de carbono
COX-2	- Cicloxigenase 2
CSE	- Cistationina γ liase
DTM	- Disfunção temporomandibular
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- Ensaio imunoenzimático
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	- Erro padrão da média
FLS	- Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos
GCs	- Guanilato ciclase solúvel
GMPc	- Guanosina monofosfato cíclico
GPx	- Glutationa peroxidase
GR	- Glutationa redutase
GSH	- Glutationa reduzida
GSSG	- Glutationa oxidada

GST	- Glutationa S-transferase
GTP	- Trifosfato de guanosina
GYY-4137	- Ácido fosfino dióico p-metoxifenil morfolino
H_2O_2	- Peróxido de hidrogênio
H_2S	- Sulfeto de hidrogênio
HOBr	- Ácido hipobromoso
HOCl	- Ácido hipocloroso
HOSCN	- Ácido hipotiocianoso
HRP	- Enzima peroxidase
HS^-	- Íon Hidrossulfeto
HTAB	- Brometo de hexadecil-trimetil-amônio
HTAB	- Brometo de hexadeciltrimetilamônia
ICB	- Instituto de Ciências Biomédicas
IL-10	- Interleucina - 10
IL-1β	- Interleucina - 1 beta
IL-6	- Interleucina - 6
IL-8	- Interleucina - 8
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível
K^+	- Potássio
K_{ATP}	- Canal de potássio dependente de ATP
K_{ca}	- Canal de potássio ativado por cálcio
LPS	- Lipopolissacarídeo
MMP	- Enzima metaloproteinase de matriz
MPO	- Enzima mieloperoxidase
Na_2S	- Sulfeto de sódio
$NADP^+$	- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NaHS	- Hidrossulfeto de sódio
NF-κB	- Fator de transcrição nuclear κappa B
NO	- Óxido nítrico
Nrf2	- Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
O^-	- Radical de oxigênio
O_2	- Oxigênio

O^{2-}	- Ânion superóxido
ODQ	- 1H-(1,2,4) oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one
OH	- Radical hidroxil
PBS	- Tampão fosfato-salino
PG	- Prostaglandina
PGE_2	- Prostaglandina E_2
PGly	- DL-propargilglicina
PKG	- Proteína quinase G
S^{2-}	- Ânion sulfeto
SNAP	- S-Nitroso-N-acetylpenicillamine
SOD	- Superóxido dismutase
SP	- Substância P
SQR	- Sulfeto quinona oxiredutase
TMB	- 3,3’5,5’ tetrametilbenzidina
TNF-α	- Fator de necrose tumoral - alfa
TRPA1	- Receptor de potencial transitório anquirina subtipo 1
TRPV1	- Receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1
USP	- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 Articulação temporomandibular 20

1.2 Disfunções temporomandibulares 22

1.3 Processo inflamatório na sinovite..... 24

1.4 Sulfeto de hidrogênio…….…….…….. 26

1.5 Sulfeto de hidrogênio na inflamação e nocicepção……..... 28

1.6 Justificativa……..... 31

1.7 Objetivos..... 32

2 MATERIAL E MÉTODOS 33

2.1 Animais..... 33

2.2 Indução de inflamação na ATM do rato 33

2.3 Tratamento farmacológico…… 33

2.4 Avaliação da alodinia mecânica 34

2.5 Coleta de lavado articular e quantificação do número de células..... 35

2.6 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase 35

2.7 Quantificação dos níveis de citocinas……..... 36

2.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes……..... 37

2.8.1 Preparação das amostras…… 37

2.8.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)……..... 37

2.8.3 Atividade da Catalase…… 38

2.8.4 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)……..... 39

2.8.5 Atividade da glutationa redutase (GR)……..... 40

2.8.6 Atividade da glutationa S-transferase (GST)……..... 41

2.9 Determinação da atividade das enzimas metaloproteinases de matriz (MMP)……..... 41

2.10 Análise estatística..... 42

3 RESULTADOS..... 43

3.1 Infiltração leucocitária e alodinia mecânica induzidas pela injeção intra-articular de CGN……..……..... 43

3.2 Efeito do doador de H_2S sobre a alodinia mecânica e o recrutamento de leucócitos na cavidade articular de ratos……..…..... 45

3.3 Avaliação do mecanismo de ação da resposta inibitória do H_2S na sinovite induzida por CGN……..... 48

3.2.1 Papel dos canais K_{ATP} sobre o efeito protetor do GYY-4137 na inflamação articular e comportamento nociceptivo induzido por CGN……..……... 48

3.3.2 Participação da via da guanilato ciclase solúvel sobre os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do GYY-4137…….....…..... 50

3.3.3 Efeito do NO sobre as ações anti-inflamatórias e antinociceptivas do GYY-4137…….…….....……... 53

3.4 Efeito do GYY-4137 sobre a concentração de citocinas no tecido sinovial da ATM de ratos…….....……. 55

3.5 Efeito do GYY-4137 sobre a atividade das enzimas antioxidantes..... 57

3.6 Efeito do GYY-4137 sobre a atividade gelatinolítica das enzimas metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9…….....……... 59

4 DISCUSSÃO..... 62

5 CONCLUSÃO……..... 70

REFERÊNCIAS 71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Articulação temporomandibular

A articulação temporomandibular (ATM) é uma ligação móvel situada em cada um dos lados da cabeça que permite à mandíbula realizar movimentos em torno de um osso fixo. Esta articulação é constituída de um componente fixo (fossa mandibular do osso temporal), um componente móvel (processo condilar da mandíbula) e um disco articular fibrocartilaginoso localizado entre os dois (Figura 1; Bath-Balogh, Fehrenbach, 2008; Madeira, 2012). Considerada uma das articulações mais complexas do corpo e presente apenas nos mamíferos, esta articulação permite que a mandíbula se mova como uma unidade, tanto em movimento de dobradiça como de deslizamento. Juntamente com as estruturas ósseas, ligamentos e musculatura associada, permite os movimentos de mastigação, deglutição, fonética e postura mandibular (Madeira, 2012; Stankovic et al., 2013).

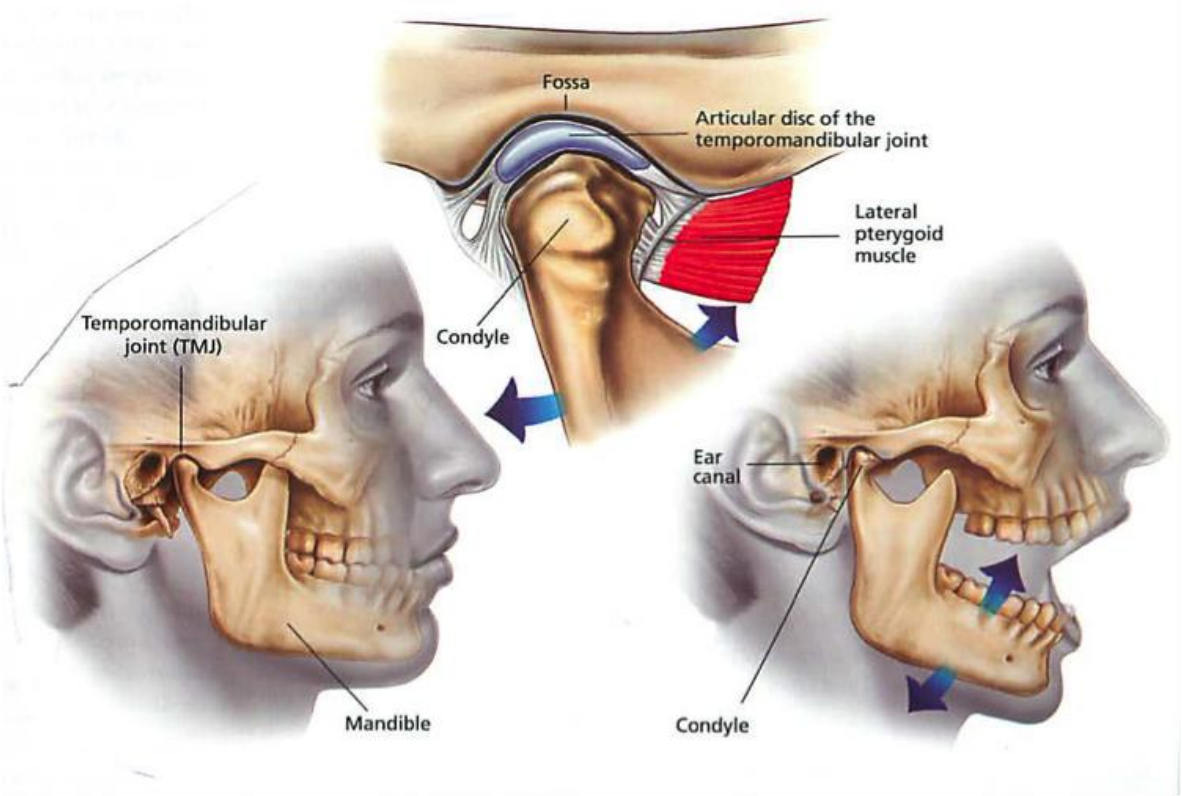


Figura 1: Articulação temporomandibular: Localização da fossa mandibular do osso temporal, do condilo da mandíbula e do disco articular fibrocartilaginoso que compõem a ATM. FONTE: North Shore Oral and Maxillofacial Surgery, 2015.

A ATM é envolvida totalmente pela cápsula articular, que cerca todo o fluido sinovial e orienta os movimentos da mandíbula (Biasotto-Gonzalez, 2005; Nanci, 2008). Extensões da cápsula na cavidade articular formam o disco articular, que permite a distribuição da tensão e maior estabilidade da ATM. Esta estrutura divide a articulação em dois compartimentos: acima do disco a cápsula é bastante frouxa, enquanto que abaixo, é ligada firmemente no côndilo (Nanci, 2008; Stankovic et al., 2013).

Morfologicamente a camada externa da cápsula articular é resistente, composta por tecido conjuntivo fibroso e reforçada pelos ligamentos associados à ATM, enquanto a superfície interna é revestida por células epiteliais específicas que formam a membrana sinovial (Avery, 2005; Bath-Balogh, Fehrenbach, 2008). A membrana sinovial é composta por duas camadas: uma íntima celular localizada sobre uma subintima vascular. A subintima é um tecido conjuntivo frouxo contendo elementos vasculares dispersos com fibroblastos, macrófagos, mastócitos, células adiposas e algumas fibras elásticas. A íntima varia em estrutura, tendo uma a quatro camadas de células sinoviais incorporadas em uma matriz intercelular amorfa, livre de fibras (Alvez et al., 2014; Nanci, 2008). As principais células formando esta camada são de dois tipos: a célula tipo A semelhante a macrófagos e a célula tipo B semelhante a fibroblastos (Alvez et al., 2014; Iwanaga et al., 2000; Nozawa-Inoue et al., 2003).

As células do tipo A semelhantes a macrófagos são caracterizadas pela presença de numerosos vacúolos, vesículas e lisossomas e têm alta atividade migratória e fagocítica. Estudos realizados por Nozawa-Inoue et al. (2003) demonstraram que ocorre aumento de células do tipo A na inflamação da membrana sinovial e que essas células são capazes de produzir substâncias pró-inflamatórias como o óxido nítrico (NO) produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). As células do tipo B, por sua vez, são caracterizadas pela presença de um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e grânulos secretórios, e são responsáveis por produzir e secretar componentes do fluido sinovial e da matriz extracelular, incluindo ácido hialurônico, colágeno e fibronectina, presentes no líquido sinovial, bem como mediadores envolvidos em processos inflamatórios como citocinas e enzimas metaloproteinases de matriz (Iwanaga et al., 2000; Sieghart et al., 2015).

O líquido sinovial consiste em um dialisado de plasma sanguíneo com grandes quantidades de ácido hialurônico e glicosaminoglicanos com viscosidade suficiente para manter lubrificadas as superfícies articulares. Além disso, é responsável por atender às necessidades metabólicas dos tecidos e pela drenagem dos metabólitos liberados pelas células, enquanto os elementos celulares do sistema imunológico se encarregam dos processos de fagocitose. A viscosidade do líquido sinovial pode ser alterada em decorrência de inflamação ou infecção. Com a diminuição da viscosidade, a cartilagem articular pode sofrer erosão ou tornar-se vulnerável a enzimas degradativas, dando início a processos degenerativos (Avery, 2005; Biasotto-Gonzalez, 2005; Nanci, 2008).

1.2 Disfunções temporomandibulares

O desequilíbrio das estruturas que formam a ATM pode resultar em quadros de disfunção temporomandibular (DTM), um termo genérico que corresponde a um conjunto de condições clínicas que envolvem a articulação temporomandibular, a musculatura da mastigação ou estruturas relacionadas (Okeson, 2008).

A etiologia das DTMs é descrita como multifatorial, com influência de fatores biológicos e psicológicos, tais como lesões traumáticas ou degenerativas da ATM, alterações esqueléticas, alterações na oclusão, fatores emocionais, bruxismo, ausências dentárias, mastigação unilateral, má postura corporal e hábitos parafuncionais (Furquim et al., 2015; Okeson, 2008).

Tais desordens afetam cerca de 5% da população e podem ocorrer em todas as faixas etárias, mas principalmente entre 20 e 40 anos. A incidência é maior em mulheres, em uma proporção estimada de 5:1 em relação aos homens e apenas 10% da população acometida busca ajuda terapêutica (Bagis et al., 2012; Biasotto-Gonzalez, 2005; Manfredini et al., 2011).

A DTM pode desencadear uma grande variedade de sinais e sintomas, que incluem dor nos músculos da mastigação e da ATM, alteração na dinâmica mandibular, limitação ou desvio da abertura madibular, ruídos articulares, cefaléias, zumbidos e compressões. A somatória ou a exacerbação desses sintomas acaba por limitar ou mesmo incapacitar o indivíduo em suas atividades diárias, causando redução significativa em sua qualidade de vida (Bagis et al., 2012; Dahlström, Carlsson, 2010; Kostrzewa-Janicka et al., 2013).

O diagnóstico é feito por meio de exame físico, com avaliação geral da cabeça e pescoço, palpação dos músculos mastigatórios, análise oclusal, exame da abertura e fechamento da mandíbula e palpação da ATM. Além disso, análises radiográficas podem ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico suplementares (Oliveira, 2008; Siqueira, 2001).

Em geral as DTM podem ser classificadas como disfunções articulares e não articulares. São denominadas não articulares quando afetam os músculos da mastigação e normalmente são decorrentes de bruxismo, compressão e hábitos parafuncionais, resultando em dores musculares, cefaléias, espasmos e limitação funcional. As disfunções articulares por sua vez podem ser divididas em inflamatórias e não inflamatórias. As desordens inflamatórias articulares incluem artrite reumatóide, artrite psoriática, gota, artrite infecciosa e sinovite, enquanto as disfunções não inflamatórias incluem osteoartrite, lesões articulares decorrentes de trauma ou cirurgia prévia e outros distúrbios da cartilagem e ossos. Estas podem levar a dores, desvios mandibulares, ruídos articulares e limitação da abertura da mandíbula (Oliveira, 2008; Siqueira, 2001).

A dor miofascial pode ser tratada com combinações de medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (AINES), placas oclusais estabilizadoras, fisioterapia, relaxantes musculares e injeções locais com combinações de anestésicos e esteróides (Cairns, 2010; Siqueira, 2001).

O tratamento para as DTMs articulares é dividido em 3 categorias: não invasivo, minimamente invasivo e invasivo. O tipo de tratamento empregado varia de acordo com o diagnóstico e a gravidade da disfunção. As placas estabilizadoras e os tratamentos farmacológicos são os tratamentos não invasivos mais empregados. A farmacoterapia visa tratar a doença e os sintomas associados, como dor e inchaço e muitas vezes associações medicamentosas são necessárias para se cumprir este objetivo. Em pacientes que não respondem às modalidades mais conservadoras, tratamentos minimamente invasivos podem ser empregados, como a artrocentese (aspiração do líquido sinovial e lavagem da cavidade) e a artroscopia (Liu, Steinkeler, 2013).

A artroplastia e a substituição total da articulação são dois tratamentos invasivos. A primeira consiste na remodelação da superfície articular para remover erosões e irregularidades e no reposicionamento do disco articular ou sua total remoção. A substituição total da articulação visa restaurar a forma e a função da

ATM e é indicada apenas para articulações severamente afetadas quando há falha de todos os outros tipos de tratamento (Tanaka et al., 2008).

1.3 Processo inflamatório na sinovite

Uma das disfunções que podem afetar a ATM é a inflamação na membrana sinovial, denominada sinovite, que normalmente está associada a outras desordens temporomandibulares como a artrite. A sinovite é caracterizada por infiltração de células inflamatórias, aumento da camada de revestimento sinovial e frequentemente progride para alterações intracapsulares, remodelamento e degeneração da cartilagem articular (Israel et al., 2006; Ogura, Kondoh, 2014). Neste sentido, as células sinoviais semelhantes a fibroblastos (FLS) desempenham um papel fundamental na progressão da inflamação na ATM devido a sua capacidade de produzir um grande número de mediadores inflamatórios (Kardel et al., 2003; Satoh et al., 2009; Sieghart et al., 2015).

Bouloux (2009), conclui em seu estudo que um dos fatores responsáveis por induzir a sinovite é o aumento nos níveis de interleucina-1 beta (IL-1β) e/ ou fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) na cavidade articular. Os níveis dessas citocinas são significativamente mais elevados nos fluidos sinoviais de pacientes com DTM, em comparação àqueles com ATM saudável (Feldmann et al., 2004; Gulen et al., 2009; Tominaga et al., 2004).

A IL-1β é produzida por vários tipos de células, como macrófagos, fibroblastos, osteoblastos e sinoviócitos. O TNF-α é produzido principalmente por macrófagos ativados no tecido sinovial inflamado, e em menor proporção, por linfócitos T, células natural killer, mastócitos e fibroblastos (Matsumoto et al., 2006; Ogura, Kondoh, 2014). Essas citocinas desempenham um importante papel em reações imunológicas e inflamatórias, bem como na resposta à dor (Kaneyama et al., 2007; Kerins et al., 2004; Schütz et al., 2007). Além disso, podem causar degradação da cartilagem e reabsorção óssea por meio do aumento na expressão de genes de metaloproteinases de matriz e diminuição das vias de síntese compensatórias nos condrócitos (Aida et al., 2006; Kostrzewa-Janicka et al., 2013; Lv et al., 2012; Tanimoto et al., 2011).

Quando os níveis de IL-1β e/ ou TNF-α aumentam nos fluidos sinoviais, as células FLS aumentam a produção de quimiocinas e moléculas de adesão. Estes

fatores estimulam a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T, e o acúmulo dessas células nos tecidos sinoviais pode gerar danos estruturais significativos para as articulações (Patterson et al., 2002). A presença dessas células inflamatórias pode ser detectada no tecido e no fluido sinovial de pacientes com DTM (Ogura, Kondoh, 2014).

A destruição dos tecidos, em última análise, depende da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (p. ex. ânion superóxido, peróxido de hidrogênio - H_2O_2, radical hidroxilo e NO) pelos neutrófilos e macrófagos na articulação inflamada (Hitchon, El-Gabalawy, 2004). O líquido sinovial humano não possui grande quantidade de componentes antioxidantes, como glutationa, glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalase e, desse modo, os radicais livres gerados não são eliminados de maneira eficaz, resultando em estresse oxidativo, e lipoperoxidação (Hitchon, El-Gabalawy, 2004; Seven et al., 2008). A identificação dos produtos de peroxidação lipídica tanto no fluido sinovial como no soro de pacientes com DTM tem sido reconhecida como uma evidência indireta do efeito dos radicais livres como mediadores de danos teciduais articulares (Seven et al., 2008). Além disso, pacientes com DTM submetidos à artroscopia apresentaram concentração de NO significativamente mais elevada em comparação com controles saudáveis (Alpaslan et al., 2000; Homma et al., 2001).

A IL-1β também induz a expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2), tanto nas células FLS como em células endoteliais, células mononucleares e na membrana sinovial de pacientes com diferentes DTMs (Hardy et al., 2002; Kojima et al., 2004; Seki et al., 2004; Tanimoto et al., 2011). As enzimas COX catalizam a conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas (PG) e tromboxano A_2, considerados cruciais para o metabolismo fisiológico de vários tecidos. A COX-2 é uma isoforma induzível, regulada por uma variedade de citocinas e mediadores pró-inflamatórios e desempenha importante papel no processo de inflamação (Smith et al., 1996). Satoh et al. (2009) demonstraram que a IL-1β aumenta a produção de PGE_2 via COX-2 em cultura de células FLS humanas. A PGE_2 também foi encontrada no fluido sinovial de pacientes com diferentes tipos de DTMs e está associada ao grau de sinovite e dor (Alstergren, Kopp, 2000; Arinci et al., 2005).

Fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas com terminações nervosas livres, algumas das quais contendo neuropeptídeos associados com a dor e a inflamação (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP; substância P - SP)

inervam a cápsula articular, a membrana sinovial e o disco articular (Cairns, 2006). PGE_2, bem como leucotrieno B_4, bradicinina, serotonina, histamina, glutamato e adenosina trifosfato (ATP), são chamados de compostos pró-nociceptivos, pois são capazes de ativar e sensibilizar nociceptores, e induzir comportamento de dor em modelos animais (Cairns et al., 2001; Oliveira et al., 2005; Takeuchi et al., 2004). A excitação dos nociceptores da ATM por estes compostos aumenta a liberação de CGRP e SP, resultando em edema articular, vermelhidão, aumento de temperatura, alodinia (dor provocada por estímulo não nocivo) e hiperalgesia (aumento da intensidade da dor associada a estímulo nocivo leve; Cairns, 2010; Kaneyama et al., 2007; Rang et al., 2011).

1.4 Sulfeto de hidrogênio

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é uma molécula sinalizadora que desempenha importantes funções na manutenção da homeostase dos sistemas biológicos. Como outros membros da mesma família (NO e monóxido de carbono - CO), o H_2S foi primeiramente reconhecido como um gás nocivo e tóxico ao meio ambiente. Atualmente sabe-se que essa molécula é produzida por enzimas presentes em mamíferos e modula uma série de processos fisiológicos (Calvert et al., 2010, Kolluru, 2013; Whiteman, Winyard et al., 2011). Este gasotransmissor atua na regulação do sistema nervoso e cardiovascular, apoptose, ciclo celular e estresse oxidativo. Tem ainda ação cardioprotetora e pode modular processos inflamatórios, nociceptivos, a função gastrointestinal, mitocondrial e o metabolismo energético (Kabil et al., 2014; Olas, 2015; Whiteman, Winyard, 2011).

Trata-se de uma molécula altamente lipofílica e, portanto, penetra facilmente a bicamada lipídica das membranas celulares. O H_2S é um ácido fraco que em solução aquosa encontra-se em equilíbrio: $H_2S \leftrightarrow HS^- \leftrightarrow S^{2-}$. Sendo que praticamente não há ânion sulfeto S^{2-} em tecidos biológicos e existem quantidades aproximadamente iguais de H_2S e HS^- dentro da célula, e cerca de 20% de H_2S e 80% de HS^- no fluido extracelular e plasma a 37 ºC e pH 7,4 (Kolluru et al., 2013; Wang, 2012).

O H_2S é sintetizado endogenamente por ação das enzimas cistationina γ-liase (CSE), cistationina β-sintetase (CBS) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST). As enzimas CBS e CSE metabolizam cisteína e/ ou homocisteína para liberar H_2S,

enquanto a 3MST gera H_2S a partir do 3-mercaptopiruvato (3MP), que é produzido pela ação da enzima cisteína aminotrasferase (CAT) sobre a cisteína e o α-cetoglutarato (Figura 2; Stipanuk, Beck, 1982; Kimura, 2012; Wang, 2012). Essas enzimas estão amplamente distribuídas no organismo, sendo que a CBS é predominantemente encontrada no cérebro, sistema nervoso e fígado, enquanto a CSE é encontrada principalmente na vasculatura e no fígado e a 3-MST pode ser encontrada no cérebro e vasculatura (Calvert et al., 2010). Quantidades menos significativas de H_2S também podem ser produzidas a partir de fontes não enzimáticas (Wang, 2012).

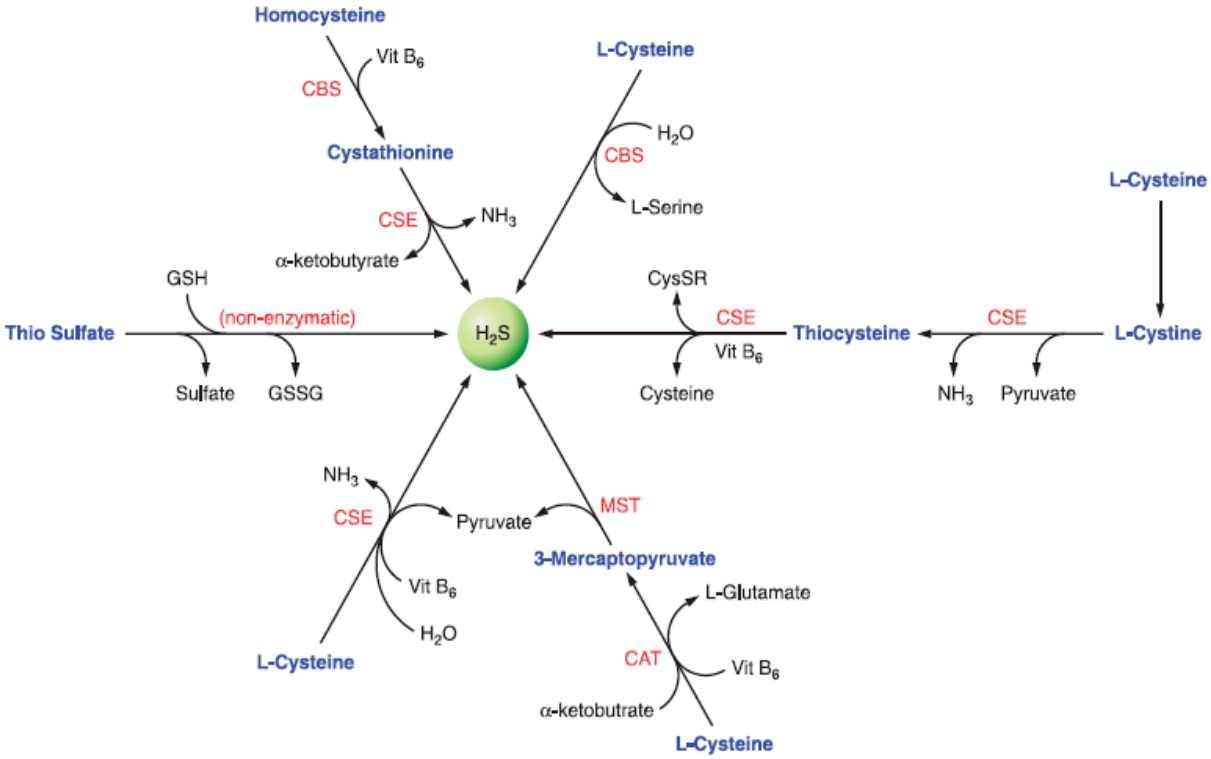


Figura 2: Principais vias para síntese de H_2S: L-cisteína é o principal substrato para geração de sulfeto de hidrogênio a partir da CBS, CSE e da via CAT/3MST. FONTE: Wang (2012)

O H_2S é metabolizado na mitocôndria, onde é primeiramente oxidado a persulfato pela enzima sulfeto quinona oxiredutase (SQR). O segundo passo dessa via consiste na conversão do persulfato a sulfito, pela persulfito dioxigenase, e em seguida a tiossulfato, pela rhodanese (Kabil, Banerjee, 2014; Kimura, 2014a; Stein, Bailey, 2013). No citosol o H_2S sofre metilação pela enzima tiol-S-metiltransferase, originando metanotiol que, por sua vez, é metilado mais lentamente pela mesma enzima formando dimetilsulfeto. Por ser um agente redutor, pode ser consumido por

espécies oxidantes endógenas na vasculatura, tais como peroxinitrito, ânion superóxido, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - Chang et al., 2008; Whiteman et al., 2004). E também pode ser eliminado do plasma mediante reação com a metahemoglobina, uma forma de hemoglobina que não se liga ao oxigênio, formando sulfemoglobina (Li et al., 2011; Wang, 2012). O H_2S e seus metabólitos são excretados na urina, respiração, fezes e flatulências e o equilíbrio entre a produção e a depuração do H_2S determina a sua concentração celular (Kimura, 2014a; Wang, 2012).

1.5 Sulfeto de hidrogênio na inflamação e nocicepção

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* fornecem evidências de que o H_2S desempenha um papel importante como modulador nos processos inflamatórios e nociceptivos em vários tecidos, atuando em múltiplos alvos. Apesar disso, o papel do H_2S nesses processos parece promissor, mas ainda controverso, visto que alguns estudos demonstram papel anti-inflamatório e antinociceptivo (Ekundi-Valentim et al., 2010; Li et al., 2009; Zanardo et al., 2006), enquanto outros sugerem efeito pró-inflamatório e algésico (Li et al., 2005; Zhang et al., 2010).

Evidências experimentais têm demonstrado que o H_2S atua como um fator pró-inflamatório em vários modelos animais, incluindo edema de pata (Bhatia et al., 2005a), pancreatite (Bhatia et al., 2005b; Nishimura et al., 2009), endotoxemia (Kimura, 2000), e sepsis (Zhang et al., 2006). Tem efeito pró-nociceptivo quando administrado por via intratecal (Maeda et al., 2009), intraplantar (Kawabata et al., 2007) ou intracolônica (Matsunami et al., 2009).

Kloesch et al. (2012) observaram que altas concentrações de H_2S atuam como um potente indutor da expressão de uma série de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-8 e COX-2 em células FLS derivadas de pacientes com artrite reumatóride. Além disso, H_2S também elevou a expressão de metaloproteinases envolvidas na degradação da matriz extracelular na artrite.

Maeda et al. (2009) demonstram que a injeção intraplantar de hidrossulfeto de sódio (NaHS), um doador de H_2S, na pata traseira de ratos, provoca hiperalgesia mecânica. Este mesmo doador também induz inflamação tecidual, evidenciada pelo aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), marcador da infiltração tecidual de neutrófilos (Li et al., 2005). Outro estudo ressalta que a inibição da

síntese endógena de H_2S utilizando DL-propargilglicina (PGly), um inibidor irreversível da CSE, reduz o edema de pata induzido por carragenina (CGN; Bhatia et al., 2005a).

Por outro lado, as propriedades anti-inflamatórias do H_2S têm sido observadas em diversos modelos experimentais, tais como o de edema de pata induzido por CGN (Zanardo et al., 2006), artrite (Ekundi-Valentim et al., 2010; Li et al., 2013), lesão pulmonar (Esechie et al., 2008), asma (Benetti et al., 2013) e em modelo de dor viceral induzida por distensão coloretal (Distrutti et al., 2010).

Estudos comprovam que este gasotransmissor possui um efeito antiproliferativo em linfócitos T e induz apoptose de células polimorfonucleares. Esses efeitos limitam o desenvolvimento da inflamação (Wang et al., 2012). Zanardo et al. (2006) demonstraram que a injeção dos doadores de H_2S, NaHS e sulfeto de sódio (Na_2S), inibiram a infiltração leucocitária e a aderência ao endotélio vascular, bem como a formação de edema na pata traseira de ratos. Além disso, em modelo de artrite aguda induzida por kaolin/CGN no joelho de camundongos, Na_2S inibiu a adesão leucocitária nas vênulas, sugerindo papel anti-inflamatório do H_2S neste modelo de artrite (Fox et al., 2012).

A utilização de moléculas doadoras de H_2S derivadas de anti-inflamatórios não esteróides (AINES), também vem apresentando resultados promissores. A administração de ATB-346, um doador de H_2S derivado do naproxeno, evidenciou atividade anti-inflamatória na sinovite induzida por CGN no joelho de ratos e foi capaz de reduzir os efeitos gástricos deletérios do naproxeno (Ekundi-Valentim et al., 2013). Doadores de H_2S derivados do diclofenaco também exibiram atividade anti-inflamatória em modelo de choque endotóxico e no edema de pata induzido pela CGN (Li et al., 2007; Sidhapuriwala et al., 2007; Wallace et al., 2007).

Os resultados contraditórios reportados na literatura podem ser decorrentes da utilização de diferentes concentrações de H_2S, vias de administração e modelos animais. É possível observar este efeito ambíguo na sinalização inflamatória com o tratamento de macrófagos com LPS, onde baixas concentrações de H_2S inibem a síntese de PGE_2, NO, IL-1β, IL-6 e a atividade de NF-κB, mas altas concentrações promovem a síntese de mediadores pró-inflamatórios (Whiteman et al., 2010). A utilização de diferentes rotas de administração também exerce influência sobre as ações do H_2S. Matsunami et al. (2009), avaliando o papel do H_2S na nocicepção, demonstraram que a administração intracolônica de NaHS induz comportamento

nociceptivo visceral em camundongos, acompanhado por hiperalgesia e alodinia abdominal. No entanto, a administração intraperitoneal desse doador não afetou a sensibilidade viceral.

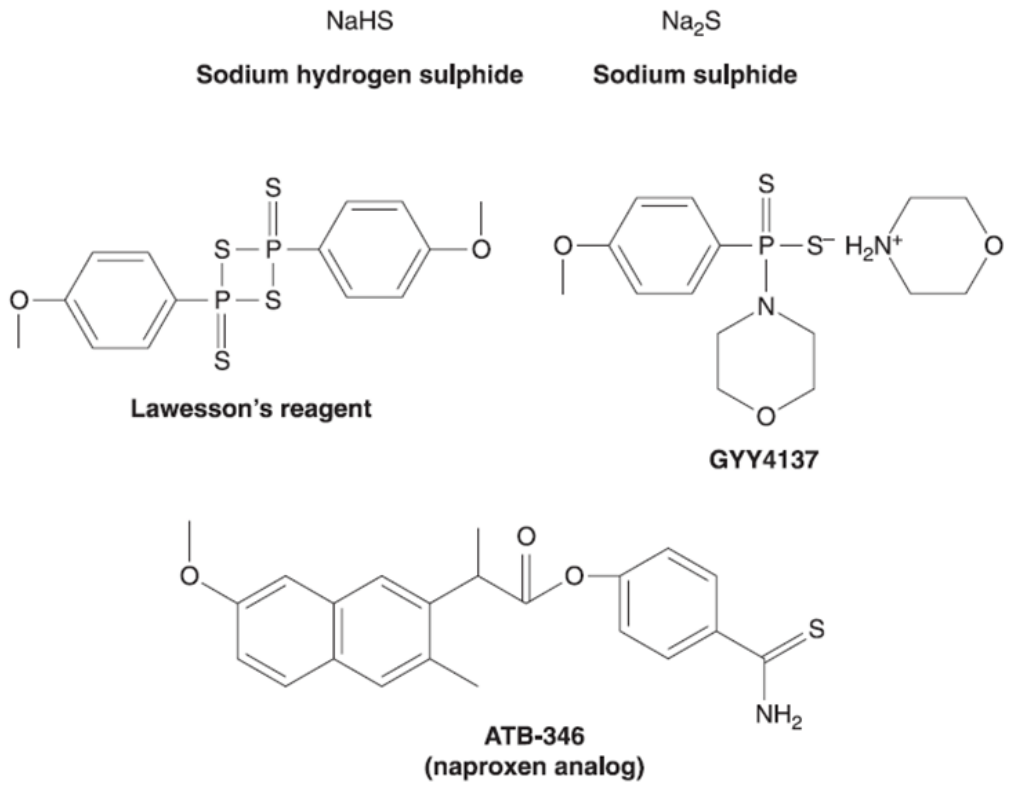


Figura 3: Estrutura química de alguns doadores de H_2S. Hidrossulfeto de sódio, sulfeto de sódio e reagente de Lawesson são doadores de H_2S de liberação rápida, GYY-4137 é um doador de liberação lenta e o ATB-346 é um doador híbrido derivado do naproxeno. FONTE: Modificado de Wang (2012).

Ademais, o emprego de diferentes tipos de doadores de H_2S pode resultar em respostas pró ou anti-inflamatórias (Wedmann et al., 2014). Neste sentido, a introdução recente de doadores de H_2S de liberação lenta (p. ex. GYY-4137) vem promovendo resultados mais consistentes e promissores quanto às ações anti-inflamatórias desse gasotransmissor (Li et al., 2013; Whiteman et al., 2011; Whiteman, Winyard, 2011). Enquanto a liberação de H_2S a partir do NaHS é espontânea e rápida, a liberação de H_2S pelo composto GYY-4137 ocorre de forma lenta (e assim durante longos períodos de tempo), possivelmente mimetizando a cinética de produção endógena do H_2S (Whiteman et al., 2010).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos farmacológicos do H_2S ainda não estão estabelecidos de forma precisa, embora os dados existentes indiquem diversos alvos. Vários autores observaram que a

ativação de canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}) parece ser a principal via responsável pelo efeito anti-inflamatório do H_2S, uma vez que esses efeitos foram revertidos pela glibenclamida, um bloqueador deste canal (Cunha et al., 2008; Donatti et al., 2014; Zanardo et al., 2006). Os canais de Ca^{2+} tipo T, por sua vez, são geralmente relacionados com os efeitos pró-inflamatórios e pró-nociceptivos deste mediador (Maeda et al., 2009; Schemann, Grundy, 2009). Além disso, uma série de outros canais podem ser modulados pelo H_2S, como o K_{Ca} (canal de K^+ ativado por Ca^{2+}), canais de Ca^{2+} tipo L e os receptores de potencial transitório (TRPs) TRPA1 e TRPV1 (Streng et al., 2008; Sun et al., 2008; Telezhkin et al., 2009; Trevisani et al., 2005).

O H_2S ainda possui a habilidade de modular a expressão de genes para uma série de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras enzimas, que tem sido associada ao seu efeito sobre fatores de transcrição, como o NF-κB e o Nrf2 (Wallace et al., 2012, 2015). Estudos sugerem que a administração de diferentes doadores de H_2S reduz a ativação do NF-κB, resultando na inibição da expressão de iNOS e COX-2, bem como dos níveis de PGE_2 e TNF-α, e leva ao aumento da expressão do Nrf2, fator responsável pela maior expressão de enzimas antioxidantes (Kimura, 2014b; Oh et al., 2006; Whiteman et al., 2010).

1.6 Justificativa

As DTMs são importantes problemas de saúde pública e têm um alto impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Sendo assim, o tratamento adequado para o controle efetivo da dor, bem como da progressão da doença é fundamental (Dahlström, Carlsson, 2010).

Embora existam medicamentos disponíveis para o tratamento dessas disfunções, estes muitas vezes não são efetivos ou exercem inúmeros efeitos adversos. Nesse contexto, pode ocorrer a progressão da doença e a utilização de métodos terapêuticos invasivos e não reversíveis, aumentando o risco de cronificação da inflamação (Liu, Steinkeler, 2013). Deste modo, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais eficazes, bem como estudos de mecanismos fisiopatológicos são necessários.

Neste sentido, diversos estudos, inclusive do nosso grupo, têm demonstrado o papel anti-inflamatório e antinociceptivo do H_2S em modelos de inflamação

articular (Ekundi-Valentim et al., 2010; 2013). Dentre os diferentes tipos de doadores de H_2S, estudos vêm demonstrando que o composto GYY-4137 possui um papel bastante promissor. A ação anti-inflamatória e protetora deste doador foi observada em modelo de inflamação evocada por LPS em cultura de sinoviócitos e condrócitos humanos (Li et al., 2013), inflamação articular induzida por CFA (Li et al., 2013), cultura de macrófagos RAW264.7 tratados com LPS (Whiteman et al., 2011) e em modelo de miocardite causada por infecção por vírus Coxsackie tipo B3 em cardiomiócitos de ratos (Wu et al., 2015).

Sendo assim, acreditou-se ser pertinente aprofundar esse conhecimento, testando o doador de H_2S, GYY-4137, no modelo *in vivo* de sinovite aguda induzida por CGN na ATM de ratos, bem como investigar os mecanismos envolvidos em seus efeitos.

1.7 Objetivos

Os objetivos deste projeto foram avaliar o efeito do tratamento com o doador de H_2S, GYY-4137, na sinovite induzida por CGN na articulação temporomandibular de ratos e caracterizar farmacologicamente os possíveis mecanismos envolvidos.

Estratégias:

I. Caracterizar a sinovite na ATM de ratos em resposta à injeção intra-articular de CGN;

II. Observar o efeito do tratamento com o composto doador de H_2S, GYY-4137, sobre a nocicepção;

III. Verificar a capacidade deste doador de modular a produção de mediadores/ marcadores inflamatórios, como citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10) e metaloproteinases de matriz (MMP-2 e 9);

IV. Avaliar o efeito deste mesmo tratamento sobre o influxo celular na cavidade articular, atividade da enzima MPO e atividade de algumas enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase);

V. Caracterizar os mecanismos envolvidos na ação do H_2S neste modelo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 46, livro 02, página 85) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP). Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos de 6-7 semanas, provenientes do Biotério Central do ICB/USP. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*, com temperatura e ciclo de iluminação controlados (22 °C; claro/escuro, 12/12 h). Todo procedimento experimental invasivo foi realizado sob anestesia geral inalatória.

2.2 Indução de inflamação na ATM do rato

Os animais foram previamente anestesiados por via inalatória com isoflurano (3% v/v em O_2; Matrix Medical, Orchard Park, NY, EUA) e, em seguida, submetidos à tricotomia da pele próxima à região da ATM. A inflamação foi induzida por uma injeção intra-articular (i. art.) de 500 µg de carragenina (CGN 5% em salina) no espaço supra discal da ATM esquerda com o emprego de uma microsseringa Hamilton (modelo 702RN, Hamilton Co., Reno, NV, EUA) acoplada a uma agulha de anestesia gengival (30G, Terumo Co., Tóquio, Japão), como descrito por Denadai-Souza et al. (2009). Em todos os experimentos o volume injetado na articulação foi de 10 µL para evitar a difusão para estruturas adjacentes a ATM.

2.3 Tratamento farmacológico

A fim de investigar o papel do H_2S na resposta inflamatória induzida pela CGN, realizou-se co-injeção com GYY-4137 (composto doador de H_2S de liberação lenta; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg).

A seguir, procurou-se avaliar os mecanismos envolvidos na ação do H_2S neste modelo de inflamação na ATM de ratos, avaliando primeiramente o papel dos canais de K_{ATP} e da via NO-GC-GMPc. Para tanto, foi empregado o esquema descrito na tabela abaixo. Todas as substâncias testadas foram co-injetadas com

CGN e GYY-4137. O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento e recebeu o veículo salina.

Tabela 1: Tratamentos farmacológicos para o estudo do mecanismo de ação do H_2S.

Fármaco/Droga	Mecanismo de ação	Dose	Referência
Glibenclamida	Bloqueador de canais K_{ATP}	10 e 30 µg/ cavidade	Déciga-Campos, López-Muñoz, 2004
ODQ (1H-(1,2,4) oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one)	Inibidor específico da guanilato ciclase solúvel	0,8 e 8 µg/ cavidade	Clemente-Napimoga et al., 2009
Sildenafil	Inibidor da enzima fosfodiesterase tipo V	0,3 e 1 nmol/ cavidade	Asomoza-Espinosa et al., 2001; Brock, Tonussi, 2008
SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillamine)	Doador de óxido nítrico	0,3 e 1 nmol/ cavidade	Lázaro-Ibáñez et al., 2001

2.4 Avaliação da alodinia mecânica

O teste de alodinia mecânica foi realizado utilizado 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. As alterações no limiar nociceptivo foram avaliadas exercendo-se uma pressão superficial de intensidade crescente na ATM do animal até a observação do comportamento de retirada da cabeça ou reflexos dolorosos.

Os animais foram colocados em gaiolas plásticas individuais 30 minutos antes do início dos testes e, em seguida, condicionados a receber estímulos mecânicos na ATM durante quatro dias consecutivos. No quinto dia, foi obtido o valor basal. A intensidade de hipernocicepção (em gramas) foi determinada pela média de três medidas consecutivas e o resultado foi expresso como Δ, dado pela diferença entre a resposta obtida antes (tempo 0 h) e depois do tratamento farmacológico (4 h).

Após 4 horas, a alodinia mecânica foi novamente avaliada e, em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por exposição a uma concentração elevada de isoflurano (5% em O_2), seguida de deslocamento cervical. O intervalo de 4 horas

do tratamento foi adotado com base em experimentos prévios do grupo demonstrando ser o período ideal para análise de parâmetros inflamatórios e nociceptivos, no modelo de inflamação induzida por CGN na articulação da ATM de ratos (Denadai-Souza et al., 2009, 2010, 2012).

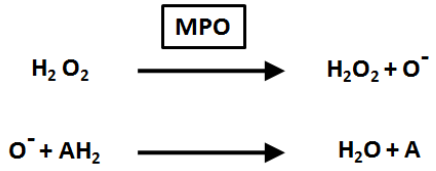
2.5 Coleta de lavado articular e quantificação do número de células

Após a eutanásia dos animais, a região da cápsula articular foi exposta por meio da remoção da pele e musculatura sobre a área. Com o auxílio de uma seringa (0,5 mL, BD Ultra Fine II insulin syringe, EUA) provida de agulha ultrafina (30 G), 50 µL de solução de salina (contendo 1,488 mg/ L de heparina e 1 mL/ L de EDTA) foram injetados lentamente no espaço intra-articular da ATM. O volume da solução injetada foi subsequentemente aspirado juntamente com o líquido sinovial e o processo foi repetido, totalizando um volume de lavado de aproximadamente 100 µL.

Para quantificação celular na cavidade, o lavado articular foi diluído 1:2 com solução de Turk (cristal violeta 0,2% em solução aquosa de ácido acético 30%) e 10 µL dessa solução foram dispostos em câmara de Neubauer para a realização da contagem total de células. Os resultados foram expressos em número de células ($x10^5$) por mL de lavado. A análise diferencial dos leucócitos foi efetuada por técnica de citocentrífuga (Fanem, Brasil). As lâminas foram coradas com May-Grünwald-Giemsa e as células presentes no lavado foram diferenciadas de acordo com a morfologia nuclear em neutrófilos, linfócitos e macrófagos. Os dados foram expressos como número de células (10^5 mL).

2.6 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase

A atividade da enzima MPO foi determinada nas amostras de tecido sinovial da ATM de ratos como um marcador indireto da infiltração de neutrófilos. Neste ensaio, o H_2O_2 é quebrado pela MPO liberada das amostras dos tecidos. O radical de oxigênio resultante (O^-) combina com dihidrocloreto de o-dianisidina, um doador de hidrogênio (AH_2), o qual é convertido em um composto colorido (A), conforme o esquema abaixo. A velocidade de formação desse composto colorido é medida utilizando-se um espectrofotômetro e relacionada à atividade enzimática de MPO presente nas amostras.



Cada amostra foi pesada e homogeneizada com solução tampão contendo o detergente brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB; 50 mg/ mL em tampão fosfato de potássio, pH 6,0) e, posteriormente, aquecida (60 °C por 2 h) para inativação da catalase endógena e centrifugadas (10.000 *g*, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi coletado (10 µL) e disposto em microplaca, juntamente com 200 µL do tampão fosfato de potássio (5 mM, pH 6,0) contendo a solução dihidrocloreto de o-dianisidina (0,164 mg/ mL) e H_2O_2 (0,0005%). A medida de densidade óptica, em comprimento de onda de 460 nm, foi feita em leitor de ELISA durante 10 min. A atividade de MPO foi calculada em relação ao peso do tecido (MPO/ g), onde uma unidade de MPO é definida como aquela capaz de degradar 1 µmol de H_2O_2/ minuto (Bradley et al., 1982)

2.7 Quantificação dos níveis de citocinas

A concentração das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 nas amostras de lavado e de tecido sinovial da ATM foi determinada por ELISA, segundo instruções do fabricante (R&D System, MN, EUA). Para isso, placas de 96 poços foram tratadas com 100 µL de anticorpo monoclonal específico para cada citocina, diluídos em tampão fosfato (anti-TNF-α e anti-IL-10; 0,2 M, pH 6,5) ou tampão carbonato (anti-IL-1β e anti-IL-6; 0,1 M, pH 9,6), por um período de 18 h à 4 °C. Para o bloqueio do anticorpo primário, as placas foram submetidas a quatro lavagens com o tampão PBST (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e depois preenchidas com 300 µL/ poço de solução de bloqueio (3% gelatina em PBST) e foram mantidas a 37 ºC por 2 h. Após um novo ciclo de lavagens, 100 µL das amostras (diluídas 1:10 em tampão PBS contendo 0,1% de BSA) ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à cada placa e estas foram mantidas à 4 °C por 18 h. As placas foram lavadas novamente e, em seguida, 100 µL do anticorpo secundário específico biotinilado foram adicionados em cada poço e mantidos à 4 °C por 2 h. Cada placa

foi submetida a novo ciclo de lavagem e o volume de 100 µL de estreptavidina conjugada com peroxidase foram adicionados em cada poço e as placas foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz por 30 min. Após novo ciclo de lavagem das placas, a reação foi revelada pela adição de 100 µL da solução de 3,3'5,5' tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico (2 N) em cada poço.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção para 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1b, IL-6 e IL-10 foi 0,98 pg/ ml, enquanto para TNF- α foi 1,95 pg/ ml.

2.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

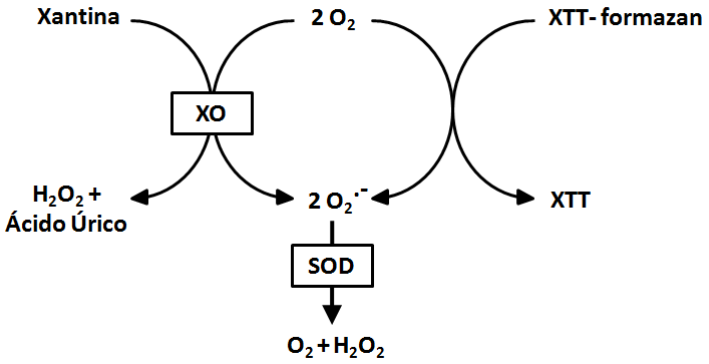
2.8.1 Preparação das amostras

Amostras de tecido sinovial foram homogeneizadas em tampão fosfato (1g/ 1 mL de tampão 50 mM, pH 7,0) e centrifugadas (10.000 rpm, 10 min, 4 ºC). O sobrenadante foi separado para determinar a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase. Todas as análises para enzimas antioxidantes foram realizadas em duplicata.

2.8.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutases (SODs) são enzimas que convertem o ânion superóxido (O_2^-) em H_2O_2, que é então removido pela glutationa peroxidase ou pela catalase (Afonso et al., 2007). A atividade da SOD foi determinada utilizando o método de Ukeda et al. (1997) com algumas modificações. Trata-se de um método indireto que envolve a geração de superóxido utilizando xantina oxidase (XO) e sal tetrazólio (XTT). Como é possível observar abaixo, o O_2^- é gerado pelo sistema xantina/ XO e reduz o reagente cromogênico XTT, formando o composto XTT-formazan que apresenta máximo de absorção de luz a 470nm. Na presença de

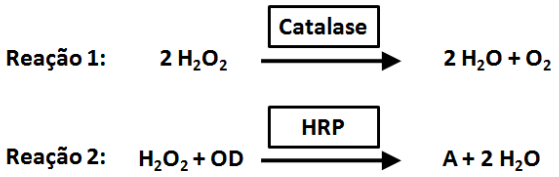
SOD, a concentração de ânion superóxido é reduzida, diminuindo desse modo o sinal colorimétrico.



A fim de remover compostos interferentes, foram adicionados 80 µL da mistura etanol: clorofórmio (62,5: 37,5, v/ v) a 50 µL de amostra preparadas como descrito no item 2.8.1. Em seguida a amostra foi agitada em vórtex por 30 segundos, centrifugada (3000 *g*, 10 min, 4 ºC) e a camada aquosa foi separada. O volume de 10 µL de amostra ou tampão carbonato (branco) foi pipetado em microplaca de quartzo, juntamente com 280 µL de mix (260 µL de tampão carbonato, 10 µL de xantina e 10 µL de XTT) e a reação foi iniciada pipetando 10 µL de XO. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 470 nm durante 20 min. Os resultados foram expressos como USOD/ mg prot, onde uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de SOD capaz de transformar 1 µmol de O_2 por minuto.

2.8.3 Atividade da Catalase

A catalase catalisa a decomposição de H_2O_2 em água e oxigênio, protegendo as células contra a peroxidação lipídica e a toxicidade do O_2. A determinação da atividade da catalase foi baseada no método proposto por Fossati et al. (1980). Neste método a reação ocorre em duas etapas (demonstradas abaixo), na primeira, a catalase na amostra dismuta o H_2O_2 (de concentração conhecida) em água e oxigênio molecular. Em seguida, na segunda reação, o H_2O_2 restante é determinado pela oxidação do reagente dihidrocloreto de o-dianisidina (OD) em uma reação catalizada pela enzima peroxidase de rabanete (HRP).



Sendo assim, primeiramente as amostras foram preparadas como descrito no item 2.8.1. Para preparar os brancos da reação, 100 µL de sobrenadante foram incubados a 60 ºC por 2 h para inativação da catalase endógena. A curva padrão de H_2O_2 foi preparada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) em concentrações compreendidas entre 11 E 8820 µM.

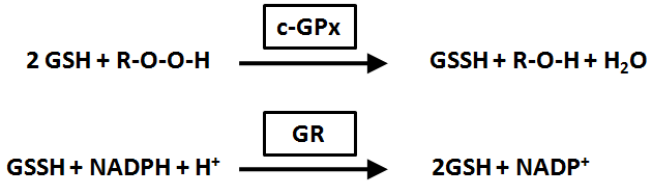
A reação 1 foi iniciada adicionando 30 µL de amostra (brutas e inativadas) a 500 µL de H_2O_2 (10mM) e, após 2 min em temperatura ambiente, foi interrompida com 500 µL de azida sódica (NaN_3, 1mM). Em paralelo, 30 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) foram incubados com 500 µL de H_2O_2 nas diferentes concentrações da curva. A reação 2 foi realizada em placa de ELISA, adicionando 20 µL do produto da reação anterior a 200 µL de reagente contendo 0,167 mg/ mL de OD e 0,095 µg/ mL de HRP em tampão fosfato (5 mM, pH 6,0).

A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da OD foi realizada registrando-se o aumento da absorbância da mistura a 460 nm, por meio de leituras coletadas em intervalos de 10 segundos durante 10 minutos. O valor de atividade da catalase foi calculado a partir da velocidade máxima por minuto de cada reação e extrapolado na curva de H_2O_2. O resultado foi expresso em U Cat/ mg de proteína, onde uma unidade de catalase foi definida como aquela que degrada 1 µmol de H_2O_2 por minuto.

2.8.4 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx foi realizada de acordo com o método de Paglia e Valentine (1967). Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx por meio de uma reação associada com a glutationa redutase (GR). A glutationa oxidada (GSSG), produzida pela redução do terc-butil hidroperóxido pela ação da GPx, é reciclada para sua forma reduzida (GSH) através da GR e NADPH, conforme observado no esquema abaixo. A oxidação de NADPH para $NADP^+$ é acompanhada pelo decréscimo de absorbância a 340nm revelando uma maneira

espectrofotométrica de monitorar a atividade de GPx. O coeficiente de extinção molar para NADPH é 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ a 340 nm.



Para isto, o sobrenadante das amostras foi diluído em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) com EDTA 0,1 M (1: 3). Em microplaca de quartzo 30 µL do sobrenadante diluído foi incubado (5 min, à 37 ºC) com 155 µL da mistura de tampão fosfato (145 µL, 0,05M, pH 7,0 e EDTA 0,1 M), glutationa reduzida (5 µL, 0,8 M) e glutationa redutase (5 µL, 9,6 U/ mL). Em seguida, adicionou-se 5 µL de terc-butil hidroperóxido (0,46%) e 10 µL de NADPH (1,2 mM). A leitura de absorbância foi realizada a 340 nm por 10 min à 37 ºC e os resultados foram expressos como µmol GSH/ min/ mg proteína.

2.8.5 Atividade da glutationa redutase (GR)

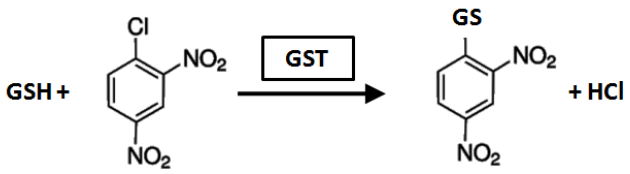
A determinação da atividade da GR foi realizada de acordo com o método de Carlberg e Mannervik (1975), baseado na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a $NADP^+$ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm a 37 ºC. O coeficiente de extinção molar para NADPH é 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ a 340 nm.

Para isto, 10 µL de amostra ou tampão fosfato (50 mM, pH 7,0 e EDTA 0,05 M) foram adicionados ao volume de 190 µL de meio de reação (tampão fosfato 50 mM; EDTA 0,05 M; GSSG 20 mg/ mL e NADPH 5 µM) em microplaca de quartzo. O decréscimo dos valores de absorbância foi monitorado a 340 nm por 30 min à 37 ºC. Os resultados foram expressos como µmol NADPH/ min/ mg proteína, onde uma

unidade de glutationa redutase é aquela capaz de oxidar 1 µmol de NADPH por minuto.

2.8.6 Atividade da glutationa S-transferase (GST)

Este método baseia-se na formação de um complexo entre a glutationa reduzida (GSH) e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST, conforme observado abaixo. O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra (Habig et al., 1974).



Para tanto, em cada poço da microplaca de quartzo foram pipetados 10 µL de amostra diluída (1: 3) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e 180 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo CDNB (0,1 M, 5 µL). Essa mistura foi pré-incubada (10 min) à temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 15 µL de glutationa reduzida (GSH) 0,1 M. A mudança de absorbância foi monitorada num comprimento de onda de 340 nm por 15 min à 25 ºC. Os resultados foram expressos como µmol glutationa (GLU) conjugada/ min/ mg proteína.

2.9 Determinação da atividade das enzimas metaloproteinases de matriz (MMP)

Um grupo adicional de animais foi anestesiado com isoflurano (3% v/v em O_2) e posteriormente submetidos à coleta de sangue periférico (1 mL) através da artéria abdominal, e o sangue coletado foi centrifugado (10.000 *g*, 10 min, 4 ºC) para obtenção do plasma. Subsequentemente, os animais foram submetidos à eutanásia com uma concentração elevada de isoflurano (5% em O_2), seguida de deslocamento cervical e o tecido sinovial da ATM foi coletado. As amostras de tecido foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris (50 mM, 1% triton X-100), com inibidor da protease (10 µL) e centrifugadas (10.000 *g*, 10 min, 4 ºC). O sobrenadante de ambas as amostras foi utilizado para análise da atividade das MMP-2 e MMP-9.

. A atividade das MMPs foi avaliada utilizando a técnica de zimografia, que consiste de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), próprio para avaliação de proteínas, contendo substrato enzimático (gelatina 10%). Em cada gel foram utilizados padrão de peso molecular (Kaleidoscope, Bio-Rad, Canadá) e controle positivo (soro fetal bovino). As amostras homogeneizadas de plasma (10 µL) e de tecido (20 µL) foram pipetadas nos respectivos géis, que por sua vez foram submetidos à eletroforese (120 V, 20 mA, 90 min). Os géis foram então lavados em solução contendo 2% de Triton X-100 para eliminar o duodecil sulfato de sódio (SDS). Em seguida, foram incubados durante 17 h, sob temperatura de 37 º C, em tampão Tris-HCl 50 mM ($CaCl_2$ 10 mM, pH 7,4) para que as enzimas renaturassem e degradassem o substrato proteico. Após a incubação, o gel foi corado durante 30 minutos com Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,05% de Comassie Blue, 10% de ácido acético e 30% de metanol) e descolorido na mesma solução sem o corante por tempo suficiente para a visualização das bandas (Kuntze et al., 2014).

A atividade gelatinolítica foi detectada como bandas descoloridas em contraste com o fundo azul do gel. A imagem do gel foi obtida pelo fotodocumentador (Bio-Rad) e a quantificação densitométrica destas bandas foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os valores de densitometria MMPs ativas presentes nas amostras (Vandooren et al., 2013).

2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) obtidos de *n* valores, onde *n* representa o número de animais de cada grupo experimental. Esses dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett, ou quando apropriado, diferenças entre pares de grupos foram analisados pelo teste *t* de Student utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism, versão 5.0. Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Infiltração leucocitária e alodinia mecânica induzidas pela injeção intra-articular de CGN

A sinovite foi induzida pela administração de CGN (500 µg/ cavidade, i.art.) na ATM esquerda dos animais. Após o intervalo de 4 h, a injeção de CGN resultou em alodinia mecânica evidenciada por uma redução significativa do limiar de força necessário para a resposta de retirada da cabeça frente ao estímulo mecânico, em relação ao grupo controle que recebeu salina (10 µL, i. art.), como ilustrado na Figura 4 A.

Além disso, o tratamento com CGN foi capaz de aumentar significativamente a atividade da enzima MPO no tecido sinovial da ATM dos ratos (Figura 4 B) quando comparados ao grupo controle salina.

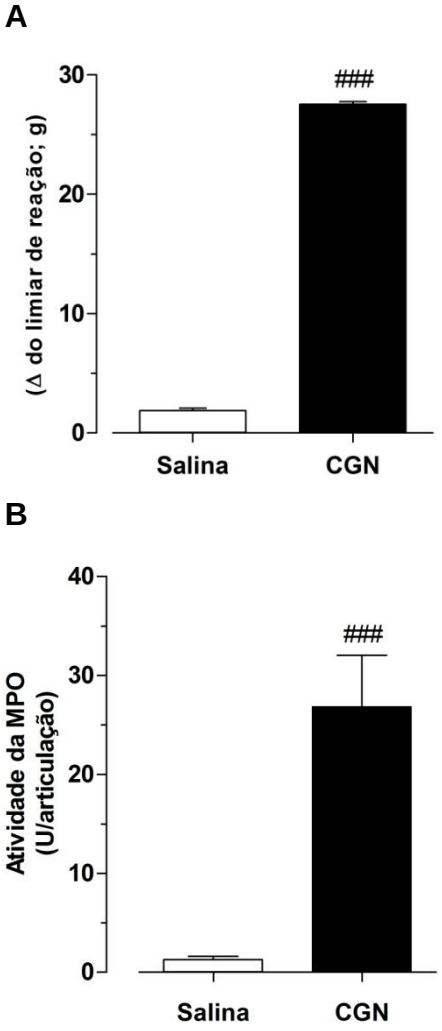


Figura 4: Efeito da injeção de CGN na ATM de ratos. O painel A mostra o efeito da administração (i. art.) de CGN (500 µg/ cavidade) sobre o limiar de força para retirada da cabeça, 4 h após a indução da sinovite (n=11). O painel B corresponde à atividade de MPO, em amostras de tecido sinovial, de animais tratados ou não com CGN (n=6). Os dados foram expressos como média ± EPM. $^{###}P<0.001$ vs. grupo controle salina (teste *t* de Student).

3.2 Efeito do doador de H_2S sobre a alodinia mecânica e o recrutamento de leucócitos na cavidade articular de ratos

A co-injeção do doador de H_2S, GYY-4137, juntamente com CGN, resultou na redução da alodinia mecânica induzida pela CGN na ATM de ratos (Figura 5). As doses de 2,5 a 20 µg/ cavidade de GYY-4137 apresentaram diferença significativa em relação ao grupo com sinovite. Para os demais experimentos foi empregada a dose de 2,5 µg/ cavidade desse doador, devido à sua capacidade de reduzir cerca de 50% do efeito nociceptivo da CGN. Desta forma, esta dose permite a observação do aumento ou redução da alodinia frente aos diferentes tratamentos farmacológicos empregados. Quando administrado isoladamente, o GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade) não induziu alonidia mecânica, sendo esta resposta semelhante à salina (Figura 5).

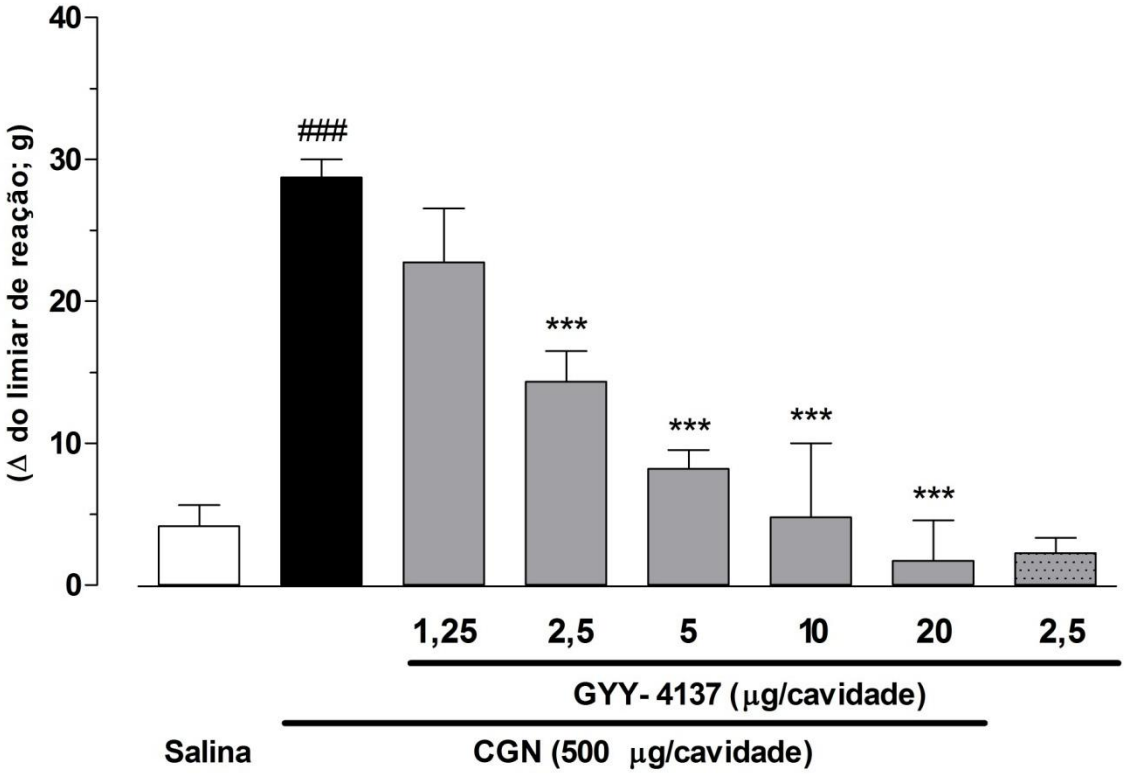


Figura 5: Efeito do GYY-4137 sobre a alodinia mecânica. A figura mostra o efeito das diferentes doses de GYY-4137 (1,25-20 µg/ cavidade) na alodinia mecânica induzida pela injeção i.art. de CGN (500 µg/ cavidade) na ATM de ratos (n=7). Os dados foram expressos como média ± EPM. ###P<0.001 vs grupo controle salina; ***P<0.001 vs grupo CGN (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Do mesmo modo, o aumento da atividade de MPO, constatado no tecido sinovial da ATM de animais tratados com CGN, foi significativamente reduzido pela co-injeção com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). Quando testada isoladamente, a mesma dose de GYY-4137 não revelou alteração na atividade desta enzima, obtendo resultado semelhante ao grupo tratado com salina (Figura 6).

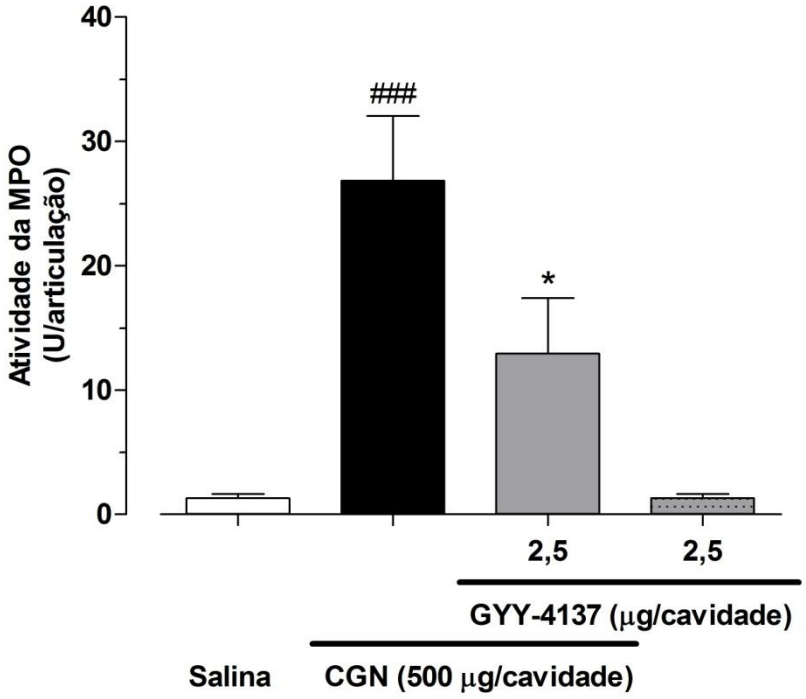


Figura 6: Efeito do GYY-4137 sobre atividade de MPO no tecido sinovial da ATM de ratos. Ação do co-tratamento com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade) e CGN (500 µg/ cavidade) sobre a atividade da enzima MPO em amostra de tecido sinovial (n=6). Os dados foram expressos como média ± EPM. ###P<0.001 vs grupo controle salina; *P<0.05 vs grupo CGN (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Conforme apresentado na Figura 7, o lavado articular coletado dos ratos com sinovite exibiu um número significativamente maior de neutrófilos, quando comparado ao grupo injetado com salina, não revelando alterações no influxo de linfócitos ou macrófagos. O tratamento dos animais com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade) evitou o aumento do recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular em resposta à CGN.

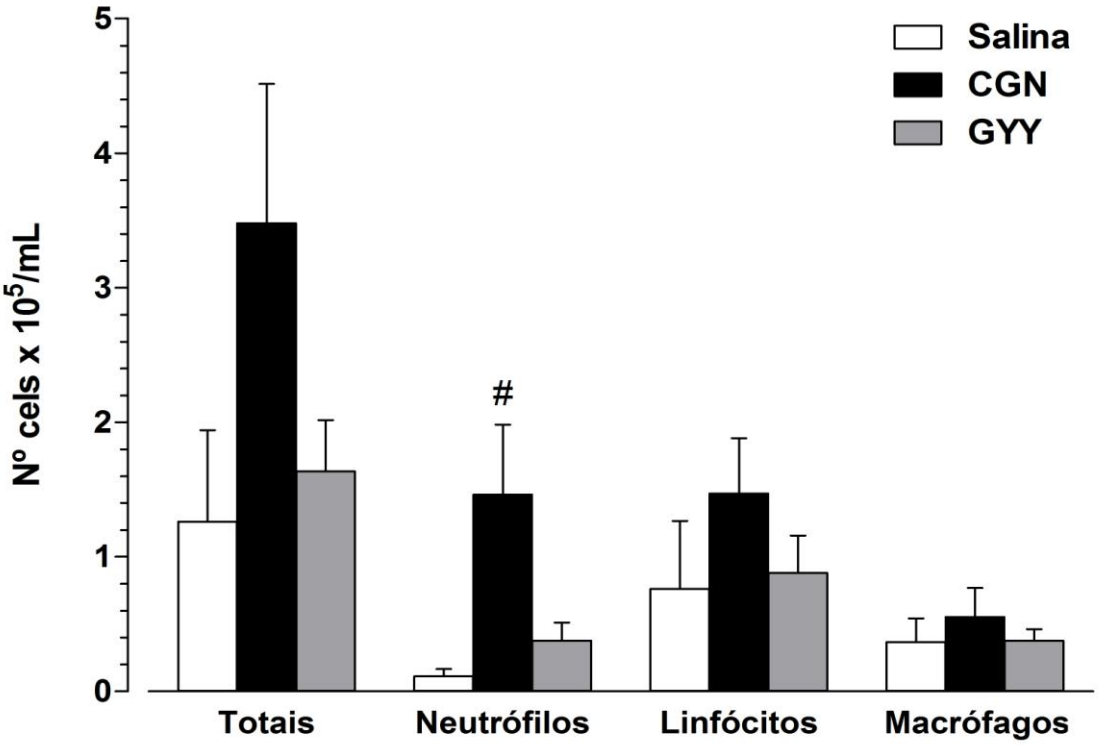


Figura 7: Efeito do GYY-4137 sobre o influxo leucocitário na cavidade articular da ATM de ratos. O número total e diferencial de leucócitos foi avaliado no lavado articular da ATM de ratos com sinovite induzida por CGN (i. art., 500 µg/ cavidade), tratados ou não com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade), após o intervalo de 4 h (n=5-7). Os dados foram expressos como média ± EPM. $^{\#}P<0.05$ vs grupo controle salina (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.3 Avaliação do mecanismo de ação da resposta inibitória do H_2S na sinovite induzida por CGN

3.3.1 Papel dos canais de K_{ATP} sobre o efeito protetor do GYY-4137 na inflamação articular e comportamento nociceptivo induzido por CGN

Conforme o item 3.2 deste estudo, a injeção i.art de CGN reduziu marcantemente o limiar de força de retirada da cabeça (alodinia mecânica) quando comparado com o grupo controle injetado com a salina, sendo esta resposta substancialmente inibida pelo GYY-4137 (Figura 5). Concomitantemente, a sinovite evocada pela CGN levou a um aumento significativo da atividade de MPO no tecido sinovial da ATM dos ratos, sendo esta resposta significativamente reduzida pela co-administração de GYY-4137 (Figura 6).

A Figura 8 mostra que o tratamento farmacológico dos animais com glibenclamida, um bloqueador de canais de K_{ATP}, na maior dose testada (30 µg/ cavidade), foi capaz de reverter este efeito antinociceptivo do GYY-4137 sobre a alodinia mecânica induzida por CGN (Figura 8 A). No entanto, a atividade da enzima MPO não foi afetada por ambas as doses utilizadas de glibenclamida (Figura 8 B).

Ratos que receberam co-injeção apenas de CGN e glibenclamida (30 µg/ cavidade), não diferiram do grupo controle CGN, tanto na análise de alodinia mecânica quanto da atividade de MPO (Figura 8 A e B). Do mesmo modo, aqueles tratados com apenas com salina e glibenclamida (30 µg/ cavidade) responderam de maneira semelhante ao grupo controle salina. Sendo assim, a glibenclamida *per se* não é capaz de desencadear alterações na nocicepção ou na atividade de MPO.

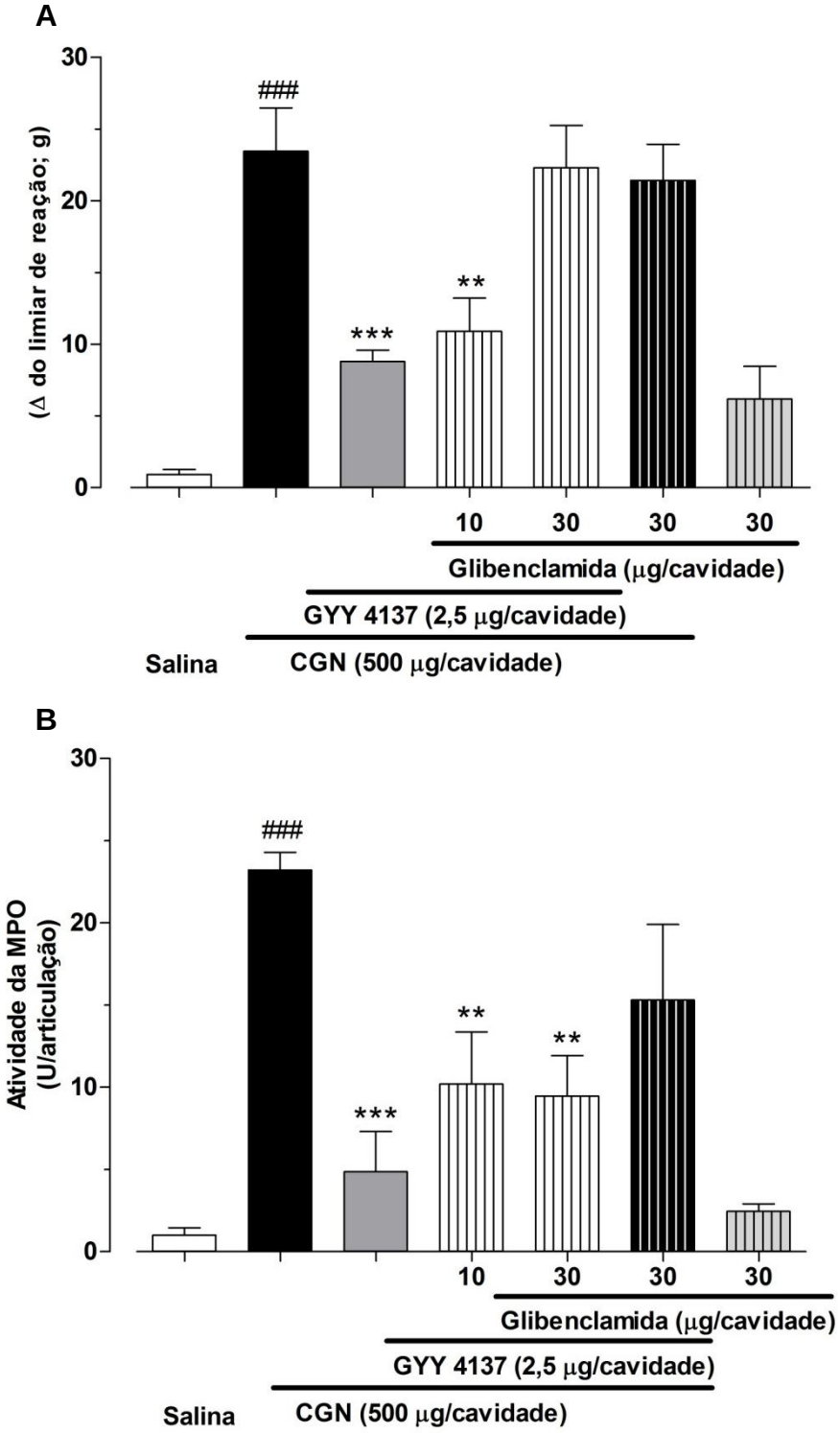


Figura 8: Efeito do bloqueio dos canais K_{ATP} pela glibenclamida sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137. Painel A mostra o efeito da administração (i. art.) de glibenclamida (10 e 30 µg/ cavidade) sobre a alodinia mecânica induzida pela CGN (500 µg/ cavidade) na ATM de ratos (n=6), tratados ou não com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). A atividade de MPO em amostras de tecido sinovial dos mesmos animais (n=6) é ilustrada no painel B. Os dados foram expressos como média ± EPM. $^{##}$P<0.01 e $^{###}$P<0.001 vs. grupo controle salina; **P<0.01 e ***P<0.001 vs grupo CGN (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.3.2 Participação da via da guanilato ciclase solúvel sobre os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do GYY-4137

O tratamento dos animais com ODQ (0,8 e 8 µg/ cavidade), um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, não alterou o efeito antinociceptivo do GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade) sobre a alodinia mecânica induzida por CGN (Figura 9 A). Em contrapartida, em ambas as doses testadas, reverteu o efeito inibitório conferido ao GYY-4137 sobre o aumento da atividade de MPO em animais com sinovite (Figura 9 B).

Ratos que receberam co-injeção apenas de CGN e ODQ (8 µg/ cavidade), não diferiram do grupo controle CGN, tanto na análise de alodinia mecânica quanto da atividade de MPO (Figura 9, painéis A e B). Do mesmo modo, aqueles tratados apenas com salina e ODQ (8 µg/ cavidade) responderam de maneira semelhante ao grupo controle salina. Deste modo, o ODQ isoladamente não é capaz de gerar alterações no comportamento nociceptivo ou na atividade de MPO.

Por outro lado, a administração de sildenafil (0,3 e 1 nmol/ cavidade), um inibidor da enzima fosfodiesterase tipo-V, foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo do GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade) sobre a alodinia mecânica induzida por CGN (Figura 10 A). Além disso, afetou parcialmente a redução de MPO causada pelo doador de H_2S (Figura 10 B). Administrado concomitantemente apenas com salina ou CGN, o sildenafil (1 nmol/ cavidade) não revelou diferença significativa em relação aos grupos controles (Figura 10, painéis A e B). No entanto, é possível observar uma tendência à elevação da atividade de MPO por parte do sildenafil em relação ao grupo controle salina (Figura 10 B).

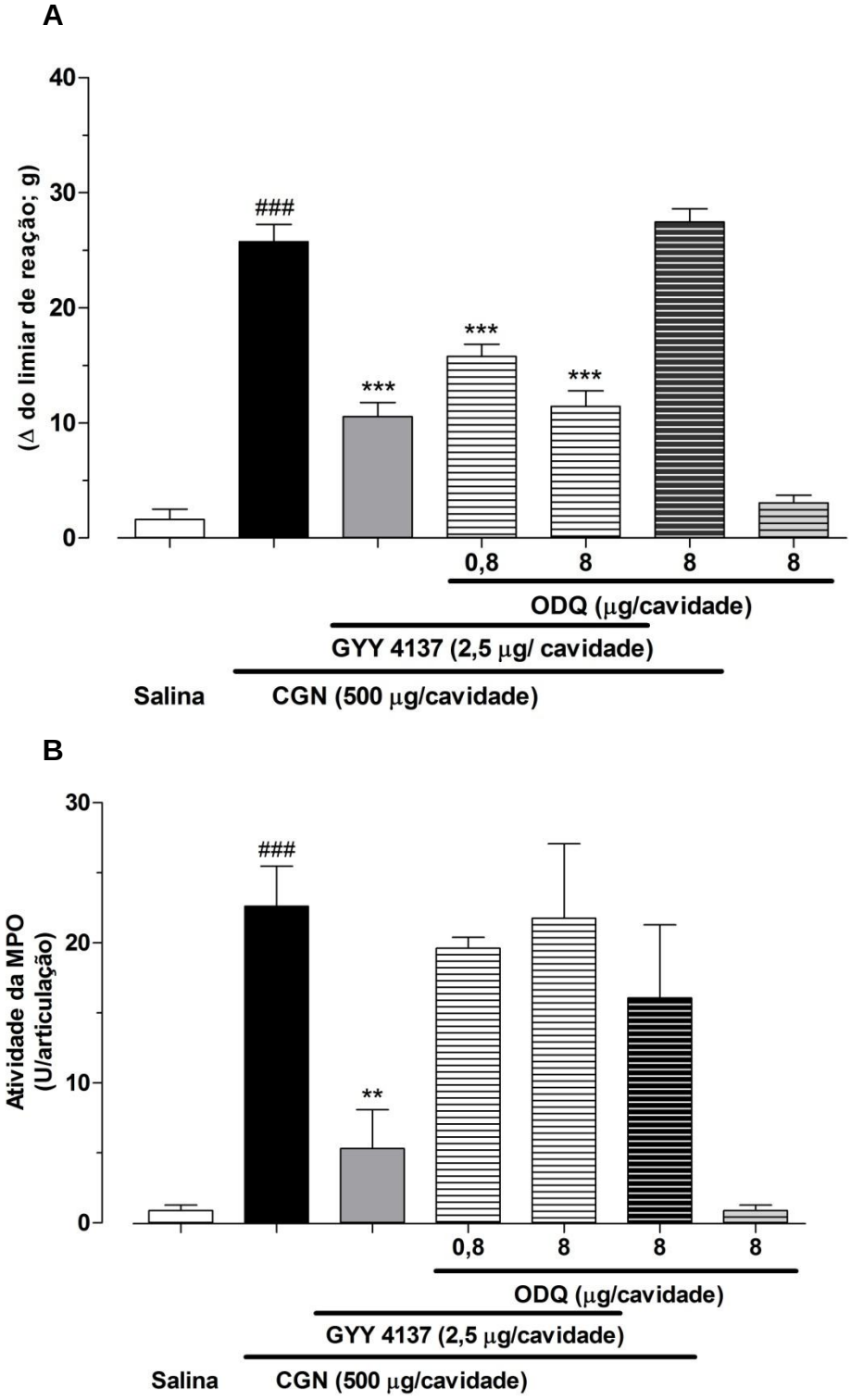


Figura 9: Efeito da inibição da guanilato ciclase solúvel pelo ODQ sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137. Os animais receberam injeção i. art. de CGN (500 µg/ cavidade) e um grupo foi co-tratado com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). O painel A demonstra o efeito da administração (i. art.) de ODQ (0,8 e 8 µg/ cavidade) sobre a alodinia mecânica induzida pela CGN na ATM de ratos (n=6). O painel B ilustra a atividade de MPO em amostras de tecido sinovial dos mesmos animais (n=6). Os dados foram expressos como média ± EPM. $^{###}$P<0.001 vs. grupo controle salina; **P<0.01 e ***P<0.001 vs grupo CGN (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

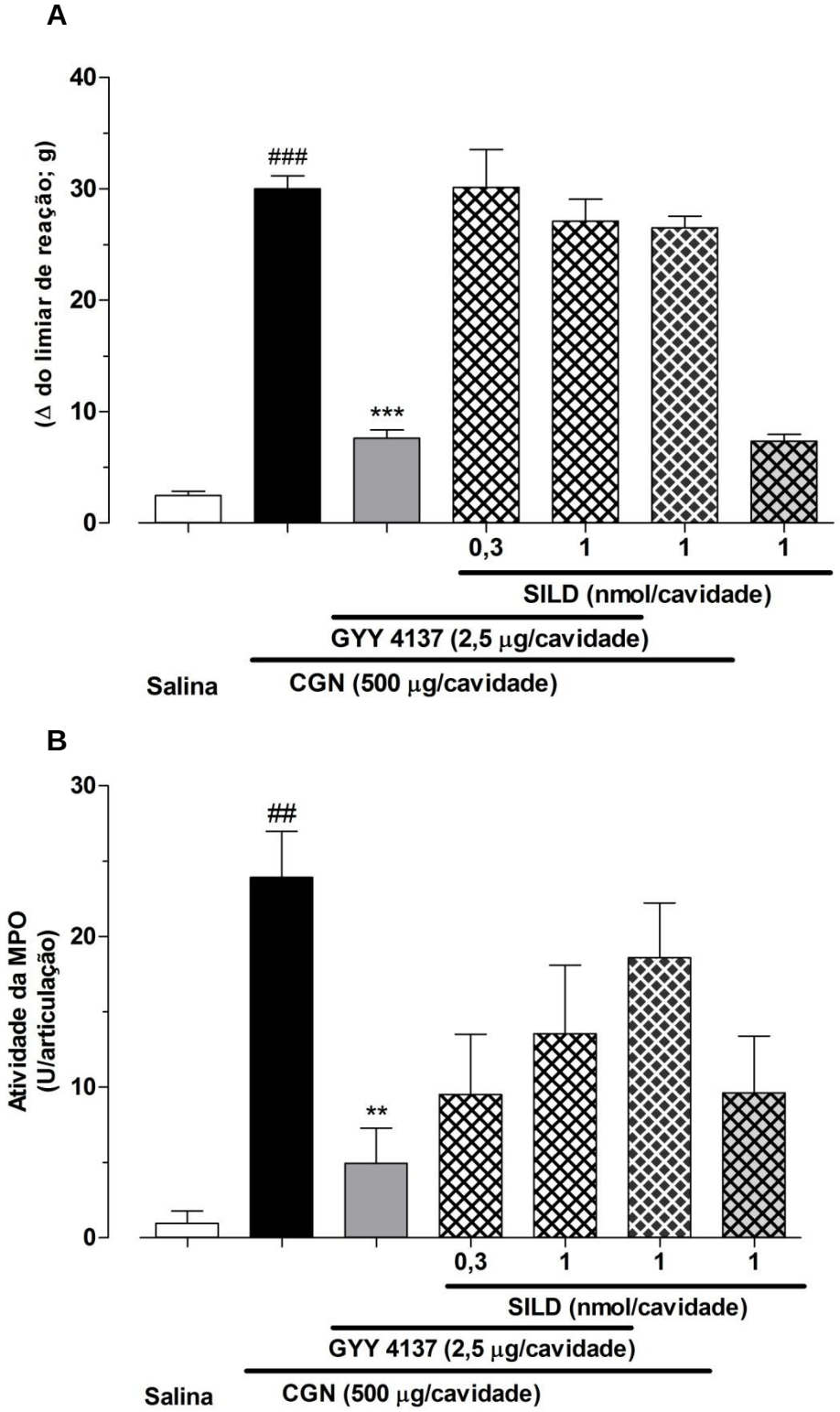


Figura 10: Efeito do inibidor da fosfodiesterase tipo-V sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137. Painel A mostra o efeito da administração (i. art.) de sildenafil (0,3 e 1 nmol/ cavidade) sobre a alodinia mecânica induzida pela CGN (500 µg/ cavidade) na ATM de ratos (n=6), tratados ou não com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). O painel B exibe a atividade de MPO em amostras de tecido sinovial dos mesmos animais (n=6). Os dados foram expressos como média ± EPM. $^{###}$P<0.001 vs. grupo controle salina; **P<0.01 e ***P<0.001 vs grupo CGN (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.3.3 Efeito do NO sobre as ações anti-inflamatórias e antinociceptivas do GYY-4137

A Figura 11 mostra que a administração do doador de NO, SNAP (1 nmol/ cavidade), apenas com salina, provocou alodinia mecânica (Figura 11 A). Com base nesse dado, não é possível aferir sobre a relação do H_2S com o óxido nítrico no comportamento nociceptivo dos animais.

Na maior dose testada, o SNAP (1 nmol/ cavidade) reverteu a redução da atividade de MPO causada pelo GYY-4137 (Figura 11 B). Quando testado somente com salina ou CGN, não apresentou resultados significativamente diferentes com relação aos grupos controles.

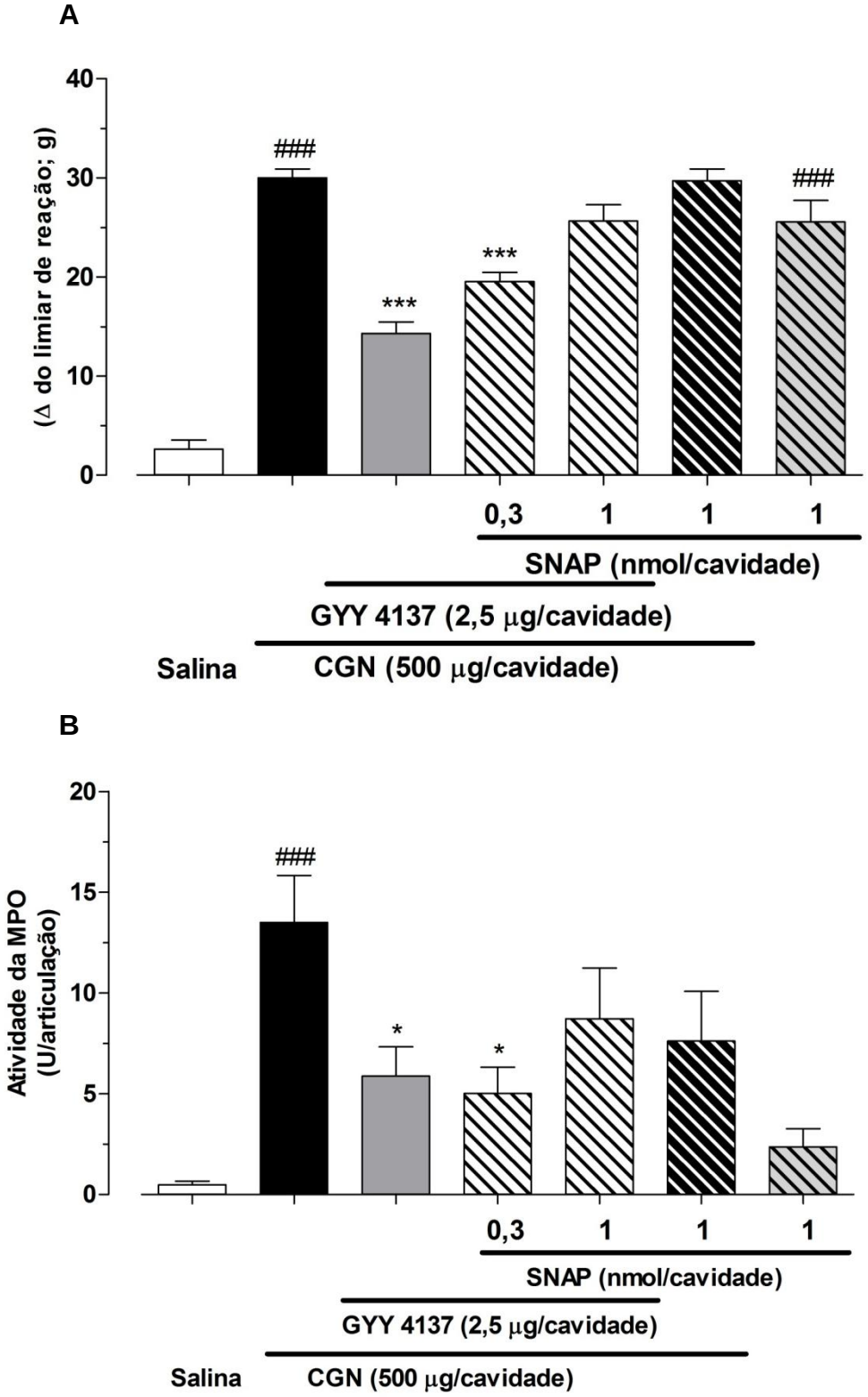


Figura 11: Efeito do doador de NO sobre as ações antinociceptivas e anti-inflamatórias do GYY-4137. Painel A exibe o efeito da administração (i. art.) de SNAP (0,3 e 1 nmol/ cavidade) sobre a alodinia mecânica induzida pela CGN (500 µg/ cavidade) na ATM de ratos (n=5), tratados ou não com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). A atividade de MPO em amostras de tecido sinovial dos mesmos animais (n=5) é ilustrada no painel B. Os dados foram expressos como média ± EPM. ###P<0.001 vs. grupo controle salina; *P<0.05 e ***P<0.001 vs grupo CGN (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.4 Efeito do GYY-4137 sobre a concentração de citocinas no tecido sinovial da ATM de ratos

A administração de CGN levou a um aumento significativo do conteúdo das citocinas IL-1β e IL-6 (Figura 12, painéis A e B) no tecido sinovial da ATM, quando comparados aos animais que receberam apenas salina, o qual não ocorreu na co-injeção da CGN com o GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). Nenhuma alteração foi observada em relação ao conteúdo de TNF-α ou IL-10 em resposta à CGN (Figura 12, painéis C e D), entretanto, a co-injeção desta com GYY-4137 resultou em redução significativa do conteúdo de IL-10 (Figura 12 D).

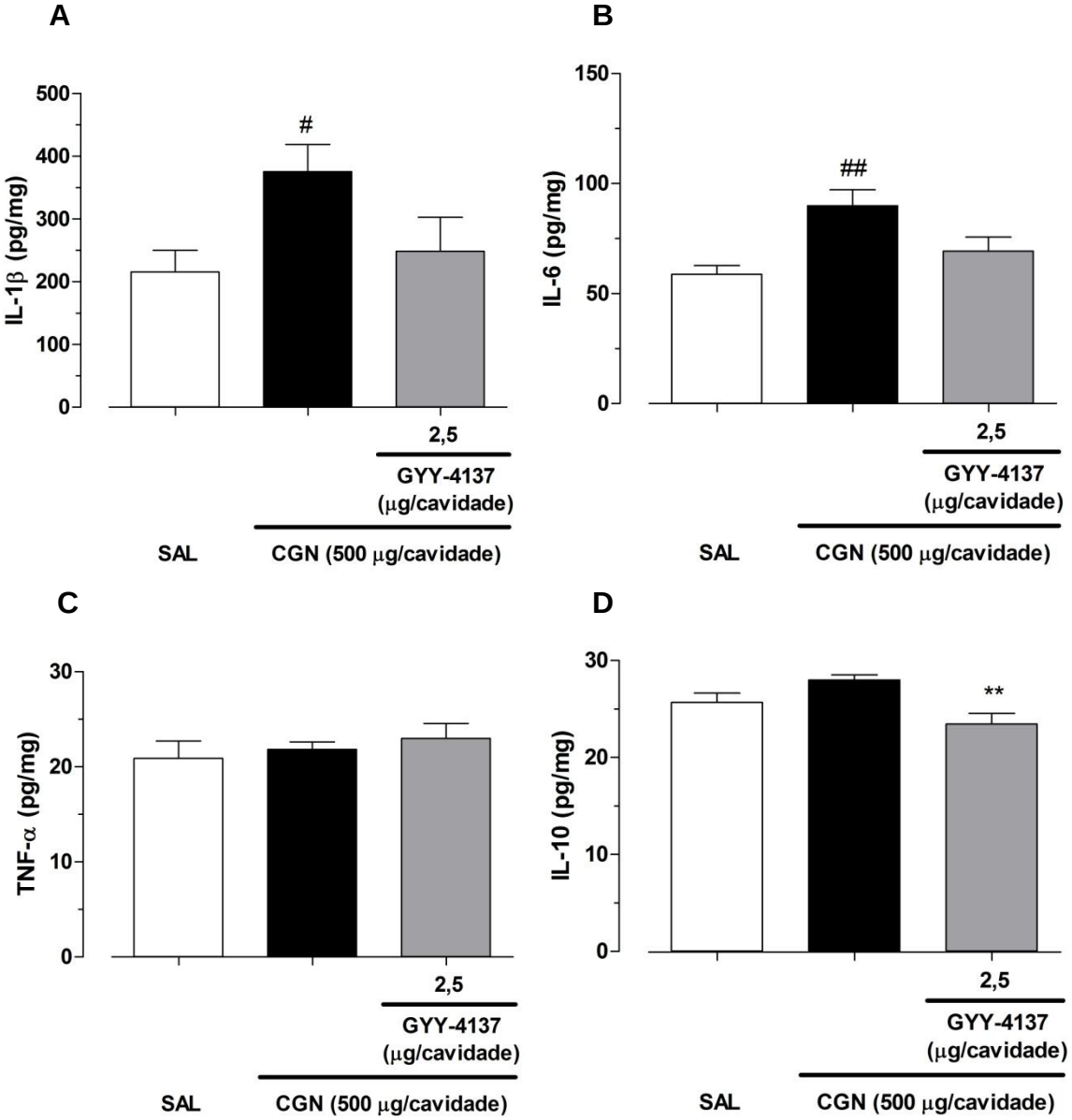


Figura 12: Conteúdo de citocinas no tecido sinovial da ATM de ratos. Os animais receberam injeção i. art. de CGN (500 µg/ cavidade) e um grupo foi co-tratado com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). Após 4 h, o conteúdo das citocinas IL-1β (painel A), IL-6 (painel B), TNF-α (painel C) e IL-10 (painel D) foi determinada pelo método de ELISA. Os dados foram expressos como média ± EPM para n=5 animais por grupo. $^{\#}P<0.05$ e $^{\#\#}P<0.01$ vs grupo controle salina; $^{**}P<0.01$ vs grupo CGN (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.5 Efeito do GYY-4137 sobre a atividade das enzimas antioxidantes

Não foram observados quaisquer efeitos nas atividades das enzimas antioxidantes catalase (Figura 13 A), superóxido dismutase - SOD (Figura 13 B), glutationa peroxidase - GPx (Figura 13 C), glutationa redutase - GR (Figura 14 D) e glutationa S-transferase - GST (Figura 13 E) tanto em resposta à injeção i.art. de CGN sozinha ou combinada com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade).

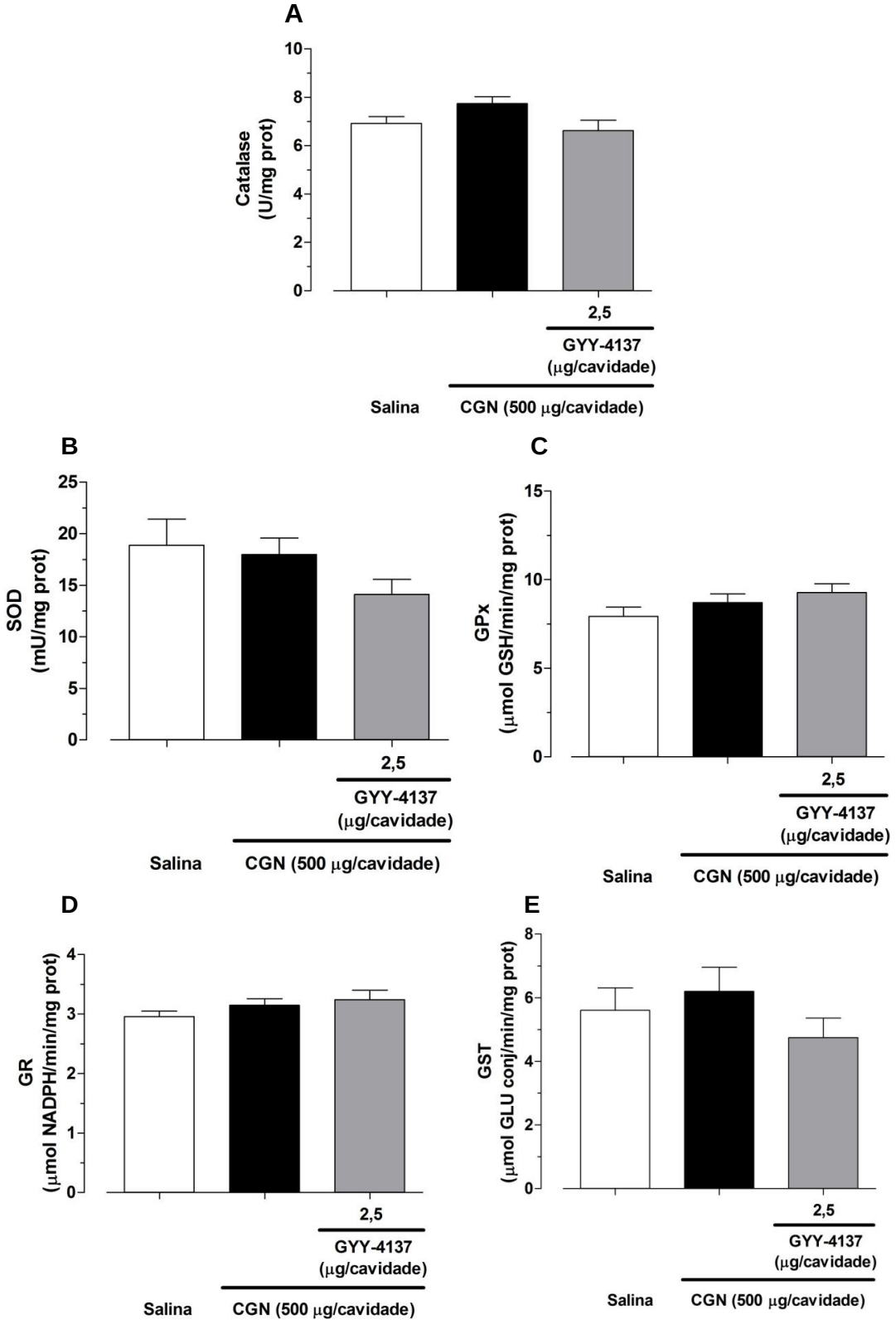


Figura 13: Avaliação do efeito do GYY-4137 sobre a atividade das enzimas antioxidantes no tecido sinovial da ATM de ratos com sinovite induzida por CGN. Os animais receberam injeção i. art. de CGN (500 µg/ cavidade) e um grupo foi co-tratado com GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade). Após o intervalo de 4 h, a atividade das enzimas catalase (painel A), SOD (painel B), GPx (painel C), GR (painel D) e GST (painel E) foi mensurada no tecido sinovial. Os dados foram expressos como média ± EPM para n=5 animais por grupo (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.6 Efeito do GYY-4137 sobre a atividade gelatinolítica das enzimas metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9

Na figura 15 (painel A) é possível observar a atividade gelatinolítica das metaloproteinases no tecido sinovial da ATM de ratos, onde as bandas superiores com 92 kD (forma latente) e 88 kD (forma ativa) representam a MMP-9, enquanto as bandas inferiores com 72 kD (forma latente) e 64 kD (forma ativa) representam a MMP-2. Como controle positivo foi utilizado soro fetal bovino (SFB). A injeção i. art. de CGN e o tratamento com GYY-4137 na dose de 2,5 µg/ cavidade, não alteraram a atividade gelatinolítica da MMP-2 (Figura 15 B) e MMP-9 (Figura 15 C).

As MMP-2 e 9 são proteínas solúveis secretadas em sua forma latente, sendo necessária uma ativação extracelular. Desse modo, podem ser encontradas no plasma em sua forma ativa e inativa (Beurden e Hoff, 2005). No entanto, a análise dessas metaloproteinases no plasma de ratos com sinovite (Figura 16 A) não revelou alterações significativas com relação ao grupo controle salina, tanto para MMP-2 (Figura 16 B), quanto para MMP-9 (Figura 16 C).

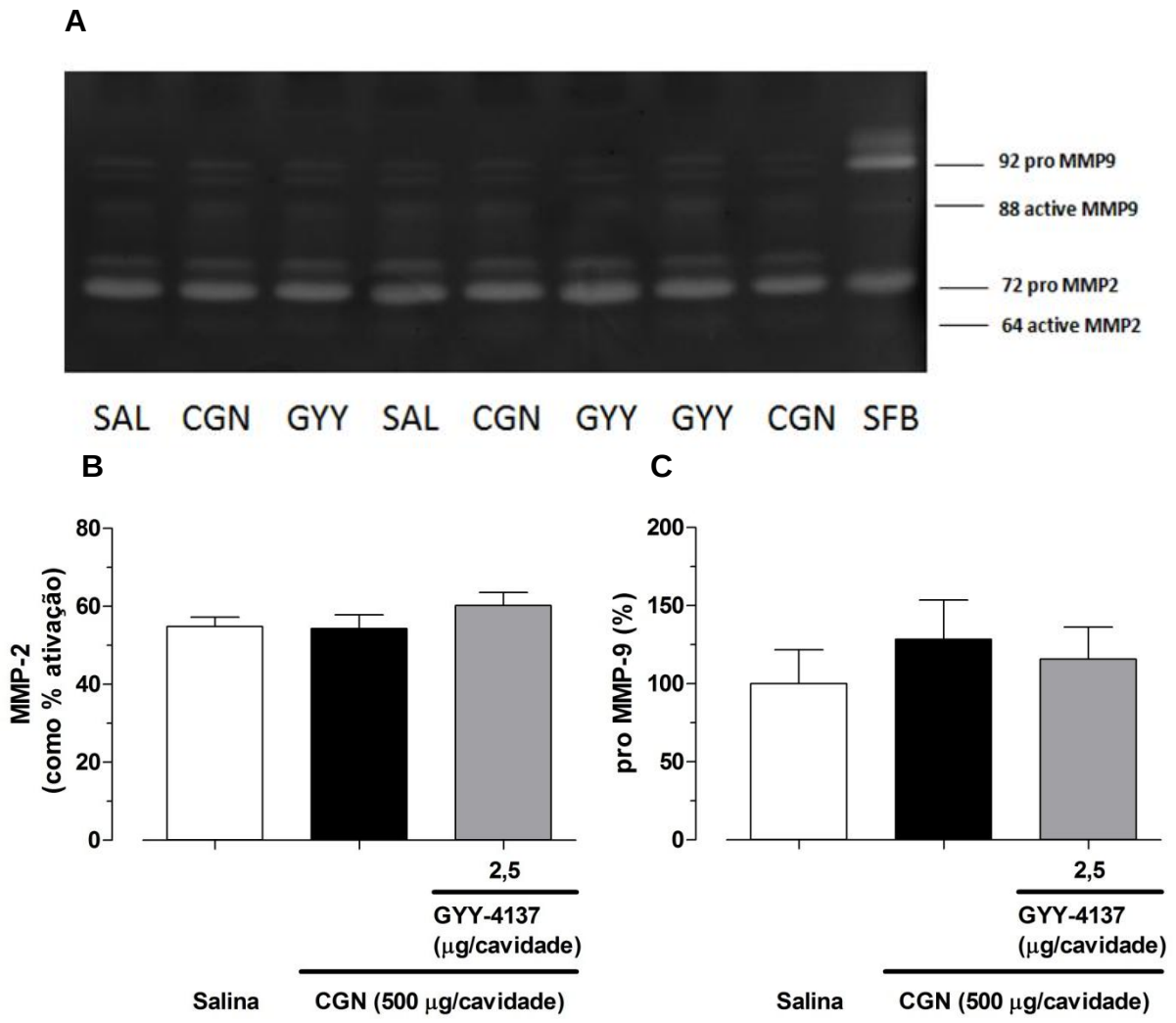


Figura 15: Detecção das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 no tecido sinovial da ATM de ratos. No painel A as bandas representam a atividade proteolítica das metaloproteinases 2 e 9 em amostras de tecido sinovial da ATM de ratos injetados com CGN (500 µg/ cavidade) ou co-tratados com CGN e GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade), utilizando o método de zimografia com gelatina 10% como substrato. Soro fetal bovino (SFB) foi utilizado como controle positivo para a marcação das MMPs. Os painéis B e C mostram a densitometria das bandas de zimografia para MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Os dados foram expressos como média ± EPM para n=5 animais por grupo (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

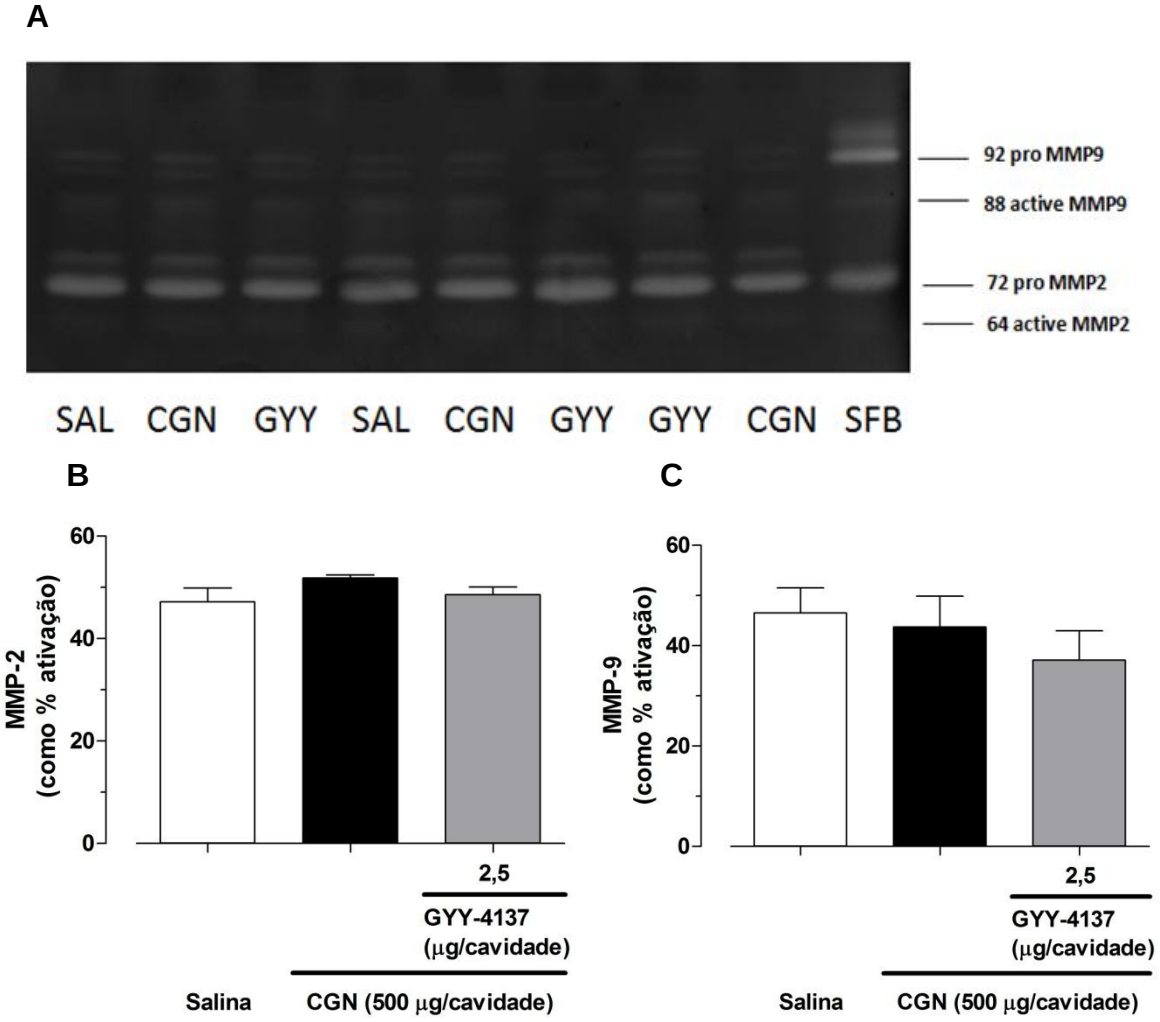


Figura 16: Detecção das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 no plasma de ratos. No painel A as bandas representam a atividade proteolítica das metaloproteinases 2 e 9 no plasma de ratos injetados com CGN (500 µg/ cavidade) ou co-tratados com CGN e GYY-4137 (2,5 µg/ cavidade), utilizando o método de zimografia com gelatina 10% como substrato. Soro fetal bovino (SFB) foi utilizado como controle positivo para a marcação das MMPs. Os painéis B e C exibem a densitometria das bandas de zimografia para MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Os dados foram expressos como média ± EPM para n=5 animais por grupo (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4 DISCUSSÃO

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos com o propósito de estudar condições inflamatórias que afetam a articulação, inclusive da região temporomandibular, e consistem, geralmente, na injeção intra-articular de substâncias inflamatórias, tais como óleo de mostarda (Haas et al., 1992; Yu et al., 1995), suspensão de *Mycobacterium butyricum* inativados por calor em óleo de parafina (Carleson et al., 1996a), IL-1α humana recombinante (Carleson et al., 1996b), glutamato (Fiorentino et al., 1999), ovalbumina (Tominaga et al., 1999), adjuvante completo de Freund (CFA, Ren, 1999), formalina (Roveroni et al., 2001), capsaicina (Tang et al., 2004) e CGN (Denadai-Souza et al., 2009).

A CGN é uma molécula amplamente utilizada para induzir inflamação articular em modelos animais a fim de testar a atividade anti-inflamatória de novos compostos (Lee et al., 2010). Trata-se de um polissacarídeo obtido a partir de algas vermelhas comestíveis das espécies *Chondrus crispus* (Rhodophyceace), conhecidas como "Carrageen Moss" ou "Carraigin" (Prajapati et al., 2014). A fase inicial da sinovite induzida por CGN tem intensidade máxima 4-6 h após a administração intra-articular, e é caracterizada por influxo celular, aumento nos níveis de mediadores pró-inflamatórios e alodinia mecânica. Prostaglandinas estão associadas com a permeabilidade vascular aumentada e são detectáveis na fase tardia da inflamação, que ocorre 24-72 h após administração da CGN (Denadai-Souza et al., 2009; Ekundi-Valentim et al., 2010; Posadas et al., 2004; Prajapati et al., 2014).

A infiltração de células, principalmente de neutrófilos, durante a fase aguda induzida pela CGN, contribui para a resposta inflamatória devido à produção e liberação, entre outros mediadores, de espécies reativas derivadas de oxigênio (ex.: OH, H_2O_2). Nesse contexto, o H_2O_2 pode atuar como substrato para outras enzimas, como a MPO. Esta enzima é liberada de leucócitos ativados, principalmente neutrófilos, e cataliza o H_2O_2, gerando ácidos hipo-halosos (p.ex. HOCl, HOSCN e HOBr). Estes compostos oxidantes tem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais e possuem um importante papel no sistema imune humano. No entanto, a exacerbação dessa atividade pode contribuir para o desenvolvimento de lesão tecidual nos locais de inflamação (Pattison et al., 2012; Rayner et al., 2014; Whiteman et al., 2005). Esses dados demonstram que este modelo de indução de sinovite compartilha características importantes da inflamação na ATM em humanos.

Os resultados deste trabalho corroboram dados anteriores do laboratório, evidenciando que a injeção intra-articular de CGN é capaz de evocar alodinia mecânica, um sinal típico de sinovite em humanos, caracterizada neste modelo como diminuição do limiar de força necessária para a retirada da cabeça frente ao estímulo mecânico aplicado na ATM de ratos (Denadai-Souza et al., 2009). Além disso, a análise do tecido sinovial desses animais revelou um aumento significativo da atividade de MPO presente na ATM, em relação ao grupo controle que recebeu salina. A atividade de MPO é um marcador indireto bem padronizado de infiltração de neutrófilos no tecido e este dado foi confirmado após contagem diferencial de células, que revelou um aumento no número de neutrófilos no lavado articular de ratos com sinovite. Da mesma forma, Ekundi-Valentim et al. (2010) observaram um aumento do recrutamento de neutrófilos e da atividade de MPO no lavado articular do joelho de ratos injetados com CGN.

A adminsitração de CGN também elevou a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-6 no tecido articular. Reforçando nossos achados, a análise do fluido sinovial de pacientes com disfunção temporomandibular revelou um aumento de diversas citocinas com relação ao grupo controle, sendo as mais relevantes IL-1β e IL-6 (Kim et al., 2012). O aumento de IL-6 no fluido sinovial também está associado com alterações e desgaste ósseo na ATM (Kaneyama et al., 2003). Por outro lado, em voluntários saudáveis, os níveis de IL-10, IL-1β e IL-6 praticamente não são detectados (Kristensen et al., 2014). Juntos estes resultados confirmam que a CGN atua como agente hipernociceptivo e pró-inflamatório.

Neste sentido, diversos estudos vêm demonstrando que o H_2S atua como um mediador nos processos de inflamação aguda e crônica, bem como na nocicepção, e evidenciam suas propriedades anti-inflamatórias em diferentes modelos experimentais (Benetti et al., 2013; Fox et al., 2012; Li et al., 2013; Zanardo et al., 2006). No modelo de sinovite induzida pela CGN, diferentes doses de GYY-4137 foram co-injetadas na ATM de ratos e foi observada uma redução da hipernocicepção de forma dependente da dose, sendo que 50% de redução desta resposta foi observada com a dose de 2,5 µg/ cavidade. Esta dose de 2,5 µg/ cavidade de GYY-4137 também apresentou redução significativa da atividade de MPO no tecido sinovial. Portanto, é válido sugerir que o efeito inibitório do H_2S sobre a migração de neutrófilos para a cavidade articular da ATM, somado ao seu efeito antinociceptivo, configura uma diminuição da resposta inflamatória no local.

Além dos efeitos inibitórios do H_2S sobre o recrutamento leucocitário que ocorre na resposta inflamatória aguda, recentemente Pálinkás et al. (2015) demonstraram que, sob condições fisiológicas, o sulfeto livre pode ligar-se diretamente de maneira reversível à enzima MPO, inativando-a. Durante a resposta oxidativa induzida em processos inflamatórios, quando os níveis de H_2O_2 estão elevados, pode ocorrer reversão competitiva da ligação com sulfeto e a consequente exarcebação dos danos causados pela ativação da MPO. No entanto, a administração de sulfeto é capaz de restituir a inibição desta enzima nos sítios de inflamação e estresse oxidativo, o que pode explicar alguns efeitos anti-inflamatórios e protetores do H_2S.

Dados da literatura vêm evidenciando que tanto a alodinia mecânica quanto a inflamação articular em animais, são expressivamente reduzidas pelo tratamento com doadores de H_2S, sejam estes de liberação rápida, lenta ou acoplados a AINES tradicionais (Ekundi-Valentim et al., 2013; Fox et al., 2012; Li et al., 2013; Sidhapuriwala et al., 2007). Estudo anterior do nosso grupo revelou que, assim como o AINE indometacina, o tratamento intra-articular de ratos com o doador rápido de H_2S, o reagente de Lawesson, resultou em marcada inibição dos sinais inflamatórios e nociceptivos da sinovite induzida por CGN (Ekundi-Valentim et al., 2010). Corroborando esses achados, Sidhapuriwala e colaboradores (2007), compararam a ação do tratamento com diclofenaco e o seu derivado doador de H_2S - S-diclofenaco no modelo de edema de pata induzido por CGN, demonstrando que o S-diclofenaco é mais eficiente em reduzir PGE_2 e NO e, portanto, evidenciando o papel anti-inflamatório do H_2S neste modelo. Li et al. (2013) observaram resultado semelhante ao utilizar o GYY-4137 no tratamento da inflamação articular induzida por CFA no joelho de camundongos. Este doador foi capaz de reduzir a atividade da MPO, bem como de mediadores pró-inflamatórios como TNF-α, IL- 1β, IL-6 e IL-8 quando administrada 6 h após CFA (Li et al., 2013).

Nas disfunções da ATM, células inflamatórias, bem como as células FLS têm demonstrado produzir grandes quantidades de citocinas, principalmente pró-inflamatórias (Steiner et al., 1999). Essas citocinas foram detectadas no fluido sinovial e encontram-se significativamente mais elevadas em pacientes com artrite (Feldmann et al., 2004; Gulen et al., 2009; Tominaga et al., 2004). No presente estudo, a dose utilizada de GYY-4137 não foi capaz de reduzir os níveis das citocinas IL-1β e IL-6, aumentados devido à injeção de CGN porém,

surpreedentemente, reduziu a concentração de IL-10. Tais resultados contrastam com outros da literatura que mostram que os doadores de H_2S são eficazes em reduzir a expressão de uma série de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-6 (Li et al., 2013; Wallace et al., 2015). Em modelo de endotoxemia em ratos, o tratamento com o doador GYY-4137 resultou em diminuição das concentrações plasmáticas desses mediadores, reduzindo assim os danos teciduais (Li et al., 2009). O tratamento com o doador de H_2S, NaSH, reduziu a secreção de IL-6 e IL-8 em células FLS derivadas de pacientes com osteoartrite e estimuladas com IL-1β. Tal inibição da expressão dessas citocinas ocorre provavelmente devido a supressão de fatores de transcrição nuclear como o NF-κB (Burgera et al., 2014).

As MMPs são um importante grupo de enzimas proteolíticas zinco-dependentes responsáveis pela degradação da matriz extracelular e membranas basais. Estas enzimas estão envolvidas na angiogenese, embriogenese, remodelamento e reparo normal do tecido. No entanto, alterações em sua expressão podem levar à destruição de tecidos conjuntivos e ao desenvolvimento de algumas condições inflamatórias, como a artrite. A estimulação de macrófagos, sinoviócitos ou condrócitos por citocinas pró-inflamatórias aumenta a síntese das MMPs, incluindo MMP-2 e MMP-9, que são capazes de degradar a maioria dos componentes de matriz extracelular que formam a membrana basal (Arinci et al., 2005; Lone, 2014; Navarro et al., 2006). Mizui et al. (2001) avaliaram a presença da MMP-2 no fluido sinovial de pacientes com disfunções temporomandibulares por zimografia e observaram relação entre as bandas detectadas e os achados radiográficos. Nenhuma forma ativa de MMP-2 foi detectada no grupo controle, e a incidência de MMP-2 ativa foi alta no grupo que apresentava alterações intracapsulares e mais alta no grupo que apresentava osteoartrite. Nascimento et al. (2013), observaram que há aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 no gânglio trigeminal de ratos durante o processo inflamatório induzido por injeção intra-articular de CFA. Além disso, ambas as MMPs foram encontradas em sinoviócitos e células do endotélio vascular, bem como em macrófagos e monócitos infiltrados, quando avaliadas no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóride (Meng et al., 2014). Todavia, a análise das MMPs no presente estudo, tanto no plasma quanto no tecido sinovial da ATM de ratos, não revelou alterações significativas entre os grupos, sugerindo que a CGN, no intervalo de 4 h, não é capaz de induzir maior síntese e ativação de MMP-2 e MMP-9. Deste modo, estes dados permitem observar

que os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do H_2S derivado do GYY-4137, no modelo de sinovite empregado, não são decorrentes de uma influência na atividade das MMPs.

A fim de avaliar o envolvimento das defesas antioxidantes no nosso modelo de sinovite, mensuramos as atividades de algumas enzimas antioxidantes no tecido sinovial inflamado dos animais. Sabe-se que o H_2S é capaz de interagir com o fator nuclear, Nrf2, o que confere a capacidade de regular enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo (Kimura, 2014b; Oh et al., 2006; Sen et al., 2012; Whiteman et al., 2010). Benetti et al. (2013) demonstraram que o tratamento com NaHS, em modelo de inflamação alérgica das vias aéreas, é capaz de abolir o aumento da peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo e previnir danos pulmonares através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes. Contudo, nossos resultados não revelaram alterações significativas na atividade das enzimas antioxidantes frente à administração de CGN ou ao tratamento com GYY-4137.

Em continuidade ao estudo e de posse do conhecimento da literatura de que moléculas sinalizadoras como o NO, o CO e o H_2S são conhecidas pelas suas interações seletivas com diferentes tipos de canais iônicos (Wang, 2002), decidimos avaliar a participação dos canais K_{ATP}. Em diversos sistemas, esta parece ser a principal via responsável pelo efeito anti-inflamatório do H_2S, uma vez que seus efeitos protetores foram revertidos pela glibenclamida, um bloqueador deste canal (Cunha et al., 2008; Donatti et al., 2014; Zanardo et al., 2006). Postula-se que a ativação dos canais de K_{ATP} pelo H_2S ocorre devido ao mecanismo de S-sulfidração, um processo que envolve a conversão de grupos tióis (-SH) de cisteína para persulfetos (-SSH), uma vez que esse canal possui subunidades que formam o poro de condução para o K^+ (Kir6.x) e subunidades do receptor de sulfoniluréia (SUR; Mustafa et al., 2009). Essas subunidades SUR formam pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína na porção extracelular, onde o H_2S pode romper tais ligações, e atuar em grupos tióis livres das cisteínas. Isso, por sua vez, induz mudanças na conformação da subunidade SUR e, consequentemente, a abertura do canal de K_{ATP} (Jiang et al., 2010). O influxo de K^+ nas células provoca hiperpolarização de membranas celulares e, consequentemente, redução da transmissão de impulsos (Paul, Snyder, 2012). Deste modo, a ação do H_2S nos canais K_{ATP} pode provocar, dentre outros efeitos, vasodilatação e antinocicepção. Zanardo et al. (2006), observaram que o H_2S é capaz de inibir a adesão leucocitária ao endotélio e

promover vasodilatação ao ativar K_{ATP} no leucócitos e no endotélio vascular. Cunha e colaboradores (2008), mostraram que o efeito antinociceptivo do H_2S na hipernocicepção induzida por PGE_2 é dependente de canais K_{ATP}. O efeito antinociceptivo de outros doadores de H_2S (NaHS and Na_2S) também foi suprimido pela glibenclamida em modelo de edema de pata evocado pela CGN (Zanardo et al., 2006) e em modelo de dor orofacial induzida por formalina (Donatti et al., 2014). De forma semelhante, em nosso modelo de sinovite o tratamento farmacológico dos animais com glibenclamida na maior dose testada foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do GYY-4137 sobre a alodinia mecânica induzida por CGN. No entanto, ambas as doses testadas não alteraram a infiltração de neutrófilos no tecido sinovial, avaliada pela atividade de MPO. O possível efeito hipernociceptivo da glibenclamida foi excluido, visto que a administração de glibenclamida sozinha na cavidade articular de ratos não produziu alodinia mecânica. Isso sugere que os canais K_{ATP} estão envolvidos no efeito antinociceptivo do H_2S derivado do GYY-4137, mas não atuam na redução da infiltração de neutrófilos neste modelo de sinovite.

Em vista destes achados que mostram que o efeito antinociceptivo do doador de H_2S, GYY-4137, na sinovite induzida por CGN ocorrem de maneira dependente da ativação de canais K_{ATP}, avaliamos mecanismos intracelulares dependentes da ativação da via NO-GCs-GMPc de face às evidências de um possível *cross-talk* entre o H_2S e o NO em diversos tecidos (Faro et al., 2014). Interessantemente, alguns resultados sugerem que os canais K_{ATP} parecem estar relacionados com a via L-arginina-NO-GMPc e que alguns efeitos antinociceptivos destas vias estão atrelados (Déciga-Campos, López-Muñoz, 2004).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina por um grupo de enzimas denominadas oxido nítrico sintase (NOS). O NO ativa a enzima GCs, que por sua vez, converte trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), o qual regula uma variedade de funções celulares, incluindo as respostas inflamatórias e vascular (Miller, 2015). O GMPc promove a abertura dos canais K_{ATP} diretamente ou indiretamente via estimulação da proteina kinase G (PKG). Agentes que estimulam a via arginina-NO-GMPc bloqueiam a hipernocicepção através da abertura de canais K_{ATP} (Sachs et al., 2004). De fato, foi demonstrado que o efeito do AINE cetorolaco envolve a ativação da via NO-GMPc, seguida pela abertura de canais K_{ATP} a nível periférico (Lázaro-Ibáñez et al., 2001). Outro estudo mostrou que

a glibenclamida também reduz o efeito antinociceptivo do doador de NO, nitroprussiato de sódio, sugerindo uma interação entre a abertura de canais K_{ATP} e a ativação da via L-arginina-NO-GMPc (Soares et al., 2000). Além disso, alguns fármacos analgésicos que bloqueiam a hipernocicepção induzida pela PGE_2, como a morfina e a dipirona, exercem seus efeitos através da abertura de canais K_{ATP} estimulada pela via NO-GMPc (Soares, Duarte, 2001).

Utilizando um doador de NO, SNAP, verificamos que na dose de 1 nmol/cavidade este evocou hipernocicepção *per se*, pelo qual não foi possível avaliar a influência direta do NO sobre a ação do H_2S na alodinia mecânica induzida por CGN. Ao analisar a maior dose de SNAP com relação à atividade de MPO, observamos reversão do efeito anti-inflamatório do GYY-4137. O NO, assim como o H_2S, tem demostrado ter propriedades tanto pró quanto anti-inflamatórias e o equilibrio entre ambas depende da quantidade e do local em que é produzido. Pequenas quantidade de NO derivadas da eNOS (NOS endotelial) são consideradas benéficas, ao inibir a adesão e a migração de células inflamatórias. Em contraste, grandes quantidades de NO produzidas pela iNOS (NOS induzível) podem contribuir para a inflamação, causando infiltração de leucócitos e lesões nos tecidos inflamados (Faro et al., 2014). Arinci et al. (2005) mostraram que as concentrações de NO medidas no fluido sinovial de pacientes com DTMs estão intimamente relacionadas com alterações inflamatórias e dor na ATM. Paradoxalmente, diversos doadores de NO tem demonstrado exercer efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, bloqueando iNOS, MPO e inibindo a ativação de NF-κB em ratos tratados com LPS (Anuar et al., 2006; Turnbull et al., 2008), bem como reduzindo a hipernocicepção (Alves et al., 2013; Staurengo-Ferrari et al., 2014). Desta forma, os efeitos nociceptivo e pró-inflamatório observados (i.e., alodinia mecânica e atividade de MPO) podem ter sido decorrentes de uma dose elevada de SNAP na cavidade articular.

Dando prosseguimento à análise da via NO-GCs-GMPc, fomos verificar o envolvimento da GCs na resposta anti-inflamatória e antinociceptiva do GYY-4137, utilizando ODQ, um conhecido inibidor desta enzima. Observamos que ODQ não interferiu no efeito antinociceptivo do GYY-4137, mas reverteu completamente a redução da atividade de MPO. Estes dados são indicativos de que a ação do H_2S no influxo de neutrófilos é dependente da produção de GMPc pela enzima GCs, mas

que o efeito antinociceptivo ocorre por via independente. Sendo assim, avaliamos o papel das fosfodiesterases no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do GYY-4137.

As fosfodiesterases são enzimas responsáveis pela degradação de GMPc e AMPc, portanto, possuem uma função essencial na modulação dos níveis destes segundos mensageiros e na regulação das funções celulares (Miller, 2015). O H_2S parece atuar como inibidor de fosfodiesterases, uma vez que em ensaio com cultura de células, o doador NaHS foi capaz de inibir de maneira não seletiva diferentes isoformas de fosfodiesterases, suprimindo a hidrólise de GMPc e AMPc (Bucci et al., 2010). No presente estudo a co-administração de sildenafil, inibidor da fosfodiesterase tipo-V responsável pela hidrólise de GMPc, juntamente com CGN, reverteu completamente o efeito antinociceptivo, e parcialmente o efeito anti-inflamatório do GYY-4137 na ATM. Em conjunto, os dados obtidos nos tratamentos farmacológicos com ODQ e sildenafil, permitem sugerir que a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do H_2S neste modelo de sinovite é dependente de GMPc. No entanto, apenas o efeito redutor do influxo de neutrófilos parece ser influenciado pelo GMPc derivado da enzima GCs.

Apesar desses achados, não está bem claro de que forma o H_2S atua na via NO-GCs-GMPc-K_{ATP}, se diretamente ou de maneira dependente de outros mediadores endógenos. Deste modo, futuros estudos se fazem necessários para elucidar tal questão.

Em suma, diversos estudos evidenciam os efeitos benéficos dos doadores de H_2S no tratamento da inflamação e nocicepção em diversos modelos experimentais e, no mesmo sentido, o presente estudo mostra que a administração intra-articular de GYY-4137 é capaz de reduzir a nocicepção e a inflamação na ATM de ratos. Vale a pena mencionar que no tratamento de pacientes com DTM, é muito frequente a realização da artrocentese, um procedimento minimamente invasivo que consiste na aspiração do líquido sinovial da ATM e a lavagem da cavidade articular com solução salina acrescida de anti-inflamatórios (principalmente corticosteróides). Neste sentido, e em vista dos resultados obtidos, podemos especular que o composto GYY-4137 possui um grande potencial terapêutico para ser empregado nesta prática clínica em vista das suas ações anti-inflamatórias, e principalmente, por estar desprovido dos bem conhecidos efeitos colaterais dos corticóides.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados no presente trabalho, podemos afirmar que:

- a indução da sinovite de ATM pela injeção i. art. de CGN leva a alodinia mecânica, recrutamento de neutrófilos na cavidade (e a consequente infiltração tecidual de neutrófilos) e aumento da produção das citocinas IL-1β e IL-6;

- a co-administração do doador de H_2S de liberação lenta, GYY-4137, na dose de 2,5 mg/cavidade resulta em redução da alodinia mecânica e da infiltração tecidual de neutrófilos;

- nesta dose, porém, o GYY-4137 não é capaz de reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6, elevadas em resposta à CGN;

- a ação anti-inflamatória e antinociceptiva do GYY-4137 neste modelo de sinovite aguda não parece estar relacionada com enzimas antioxidantes ou metaloproteinases de matriz (MMP-2 e -9);

- a ativação de canais K_{ATP} e GMPc parecem mediar o efeito antinociceptivo do GYY-4137;

- a infiltração de neutrófilos para a cavidade articular parece ser dependente do GMPc derivado da enzima GCs.

REFERÊNCIAS*

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. Joint Bone Spine. 2007;74:324-9.

Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Namba A, Motohashi M, Matsumoto M, Makimura M, Matsumura H. The effect of IL-1beta on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. Life Science. 2006;79:764-71.

Alpaslan C, Bilgihan A, Alpaslan GH, Güner B, Ozgür Yis M, Erbaş D. Effect of arthrocentesis and sodium hyaluronate injection on nitrite, nitrate and thiobarbituric acid-reactive substance levels in the synovial fluid. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics. 2000;89:686.

Alstergren P, Kopp S. Prostaglandin E_2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2000;58:180-6.

Alves DP, da Motta PG, Romero TR, Klein A, Duarte ID. NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. Nitric Oxide. 2013;28:8-13.

Alvez CS, Moraes LOC, Marques SR, Tedesco RC, Harb LJC, Rodríguez-Vázquez JF, Mérida-Velasco JR, Alonso LG. Analysis by light, scanning, and transmission microscopy of the intima synovial of the temporomandibular joint of human fetuses during the development. Anatomy Research International. 2014.

Anuar F, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Flurbiprofen and its nitric oxide-releasing derivative protect against septic shock in rats. Inflammation Research. 2006;55(11):498-503.

Arinci A, Ademoglu E, Aslan A, Mutlu-Turkoglu U, Karabulut AB, Karan A. Molecular correlates of temporomandibular joint disease. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics. 2005;99:666-70.

Asomoza-Espinosa R, Alonso-López R, Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Bañuelos P, Torres-López JE, Granados-Soto V. Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. European Journal of Pharmacology. 2001;418(3):195-200.

Avery JK. Desenvolvimento e histologia bucal, 3th ed. São Paulo, Porto Alegre: Artmed. 2005:373-83.

---

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2014 set 02]. Available from: http://www.icb.usp.br/~sbibicb/images/diretrizesVancouver2012sbibPDF/Manual%20%20Vancouver%20Compacto.pdf

Bagis B, Aydogan EA, Turgut S, Durkan R, Özcan M. Gender difference in prevalence of signs and symptoms of temporomandibular joint disorders: a retrospective study on 243 consecutive patients. International Journal of Medical Sciences. 2012;9(7):539-44.

Bath-Balogh M, Fehrenbach M J. Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais, 2th ed. São Paulo: Manole. 2008:325-33.

Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. European Journal of Pharmacology. 2013;698(1-3):463-9.

Beurden SPA, Hoff VJW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. BioTechniques. 2005;38(1):73-83.

Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moochhala SM, Moore PK. Hydrogen sulfide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. British Journal of Pharmacology. (2005a);145:141-4.

Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. The FASEB Journal. (2005b);19:623-5.

Biasotto-Gonzalez DA. Abordagem interdisciplinar das disfunções temporomandibulares, 2th ed. Manole. 2005:1-17,43-65.

Bouloux GF. Temporomandibular joint pain and synovial fluid analysis: a review of the literature. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2009; 67:2497-04.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. Journal of Investigative Dermatology. 1982;78(3):206-9.

Brock SC, Tonussi CR. Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: the involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. Anesth Analg. 2008;106(3):965-71.

Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, Roviezzo F, Brancaleone V, Cirino G. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology Journal. 2010;30:1998-2004.

Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhães J, Meijide-Faílde R, Blanco FJ. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1b-stimulated human articular chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage. 2014;22(7):1026-35.

Cairns BE, Sessle BJ, Hu JW. Characteristics of glutamate evoked temporomandibular joint afferent activity in the rat. Journal of Neurophysiology. 2001;85:2446-54.

Cairns BE. Nociceptors in the orofacial region (temporomandibular joint and masseter muscle). In: Schmidt R F, Willis W D, eds. Encyclopedic reference of pain. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2006;14:2261-4.

Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain - basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. Journal of Oral Rehabilitation. 2010;37(6):391-410.

Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. Antioxidants & Redox Signaling. 2010;12(10):1203-17.

Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. The Journal of Biological Chemistry. 1975;260(14):5470-80.

Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Srinivasan GR, Theodorsson E, Lundeberg T. Effects of adjuvant on neuropeptide-like immunoreactivity in experimentally induced temporomandibular arthritis in rats. Archives of Oral Biology. (1996a);41(7):705-12.

Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Theodorsson E, Lundeberg T. A model for the study of experimentally induced temporomandibular arthritis in rats: the effect of human recombinant interleukin-1α on neuropeptide-like immunoreactivity. Journal of Orofacial Pain. (1996b);10(1):9-14.

Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, Tang C. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. Amino Acids. 2008;34:573-85.

Clemente-Napimoga JT, Pellegrini-da-Silva A, Ferreira VHA, Napimoga MH, Parada CA, Tambeli CH. Gonadal hormones decrease temporomandibular joint κ-mediated antinociception through a down-regulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia. European Journal of Pharmacology. 2009;617:41-7.

Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA Jr, Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM, Lotufo CM, Neto AF, Ferreira SH, Cunha FQ. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. European Journal of Pharmacology. 2008;20(1-3): 127-35.

Dahlström L, Carlsson GE. Temporomandibular disorders and oral health-related quality of life. Acta Odontologica Scandinavica. 2010;68:80-5.

Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ. Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K^+ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. European Journal of Pharmacology. 2004;484(2-3):193-9.

Denadai-Souza A, Camargo LL, Ribela MTCP, Keeble JE, Costa SKP, Muscará MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. European Journal of Pain. 2009;13:812-19.

Denadai-Souza A, Cenac N, Casatti CA, de Souza Câmara PR, Yshii LM, Costa SK P, Vergnolle N, Muscará MN. PAR_2 and Temporomandibular Joint Inflammation in the Rat. Journal of Dental Research. 2010;89(10):1123-8.

Denadai-Souza A, Martin L, de Paula MA, de Avellar MC, Muscará MN, Vergnolle N, Cenac N. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. Arthritis & Rheumatology. 2012;64(6):1848-58.

Distrutti E, Cipriani S, Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, Cianetti S, Fiorucci S. Hydrogen sulphide induces μ opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. Molecular Pain. 2010;6:36.

Donatti AF, Araujo RM, Soriano RN, Azevedo LU, Leite-Panissi CA, Branco LGS. Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. European Journal of Pharmacology. 2014;738:49-56.

Ekundi-Valentim E, Mesquita FP, Santos KT, de Paula MA, Florenzano J, Zanoni CI, Rodrigues L, de Nucci G, Teixeira SA, Ferreira HH, Wallace JL, Costa SK, Muscará MN. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H_2S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. Medical Gas Research. 2013;3(1):24.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. British Journal of Pharmacology. 2010;159(7):1463-74.

Esechie A, Kiss L, Olah G, Horváth EM, Hawkins H, Szabo C, Traber DL. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. Clinical Science (London). 2008;115(3):91-7.

Faro MLL, Fox B, Whatmore JL, Winyard PG, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. Nitric Oxide. 2014;41:38-47.

Feldmann M, Brennan FM, Williams RO, Woody JN, Maini RN. The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis. Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2004;18(1):59-80.

Fiorentino PM, Cairns BE, Hu JW. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. Archives of Oral Biology. 1999;44(1):27-32.

Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3, 5-dichloro- 2-hydroxybenzenesulfonic acid/ 4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clinical Chemistry. 1980;26(2):227-31.

Fox B, Schantz JT, Haigh R, Wood ME, Moore PK, Viner N, Spencer JP, Winyard PG, Whiteman M. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H_2S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2012;(4):896-910.

Furquim BD, Flamengui LMSP, Conti PCR. TMD and chronic pain: A current view. Dental Press Journal of Orthodontics. 2015;20(1):127-33.

Gulen H, Ataoglu H, Haliloglu S, Isik K. Proinflammatory cytokines in temporomandibular joint synovial fluid before and after arthrocentesis. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics. 2009;107:e1-e4.

Haas DA, Nakanishi O, MacMillan RE, Jordan RC, Hu JW. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. Archives of Oral Biology. 1992;37(5):417-22.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S- transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry. 1974;249(22):7130-9.

Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A, Tripp CS. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. Arthritis & Rheumatology. 2002;46(7):1789-3.

Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy 2004;6(6):265-78.

Homma H, Takahashi T, Seki H, Ohtani M, Kondoh T, Fukuda M. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase in synovial tissue of human temporomandibular joints with internal derangement. Archives of Oral Biology. 2001;46:93-7.

Israel HA, Langevin CJ, Singer MD, Behrman DA. The relationship between temporomandibular joint synovitis and adhesions: pathogenic mechanisms and clinical implications for surgical management. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2006;64:1066-74.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. Archives of Histology and Cytology. 2000;63(1):17-31.

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H(2)S-induced activation of K(ATP) channels. Antioxid Redox Signal. 2010;12(10):1167-78.

Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H_2S biogenesis, decay and signaling. Antioxidants & Redox Signaling. 2014;20(5):770-82.

Kabil O, Motl N, Banerjee R. H_2S and its role in redox signaling. Biochimica et Biophysica Acta. 2014;1844(8):1355-66.

Kaneyama K, Segami N, Sato J, Fujimura K, Nagao T, Yoshimura H. Prognostic factors in arthrocentesis of the temporomandibular joint: comparison of bradykinin, leukotriene B_4, prostaglandin E_2, and substance P level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2007;65:242-7.

Kaneyama K, Segami N, Sato J, Nishimura M, Yoshimura H. Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2004;42:246-50.

Kardel R, Ulfgren A-K, Reinholt FP, Holmlund A. Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with painful clicking and osteoarthritis in the temporomandibular joint. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2003;32:390-6.

Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Sekiguchi F, Wada T, Ichida S, Nishikawa H. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. Pain. 2007;132:74-81.

Kerins C, Carlson D, McIntosh J, Bellinger L. A role for cyclooxygenase II inhibitors in modulation temporomandibular joint inflammation from a meal pattern analysis perspective. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2004;62:989-95.

Kim YK, Kim SG, Kim BS, Lee JY, Yun PY, Bae JH, Oh JS, Ahn JM, Kim JS, Lee SY. Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint: Preliminary study. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2012;40:337-41.

Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. Molecules. 2014a;19(10):16146-57.

Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000;267:129-33.

Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. Frontiers in physiology. 2012;101(3):1-3.

Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. Antioxidants & Redox Signaling. 2014b;20(5):783-93.

Kloesch B, Liszt M, Krehan D, Broell J, Kiener H, Steiner G. High concentrations of hydrogen sulphide elevate the expression of a series of pro-inflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid and osteoarthritis patients. Immunology Letters. 2012;141(2):197-203.

Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. Arthritis Research & Therapy. 2004;6(4):R355-65.

Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. Nitric Oxide. 2013;35:5-20.

Kostrzewa-Janicka J, Mierzwinska-Natalska E, Jurkowski P, Okonski P, Nedzi-Gora M. Assessment of temporomandibular Join Disease. Neurobiology of respiration, Advances in experimental medicine and biology. 2013;788:207-11.

Kristensen KD, Alstergren P, Stoustrup P, Küseler A, Herlin T, Pedersen K. Cytokines in healthy temporomandibular joint synovial fluid. Journal of Oral Rehabilitation. 2014;41:250-56.

Kuntze KB, Antonio RC, Izidoro-Toledo TC, Meschiari CA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Captopril and Lisinipril only inhibit matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity at milimolar concentrations. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2014;114:233-9.

Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V. Participation of the nitric-cyclic GMP-ATP-sensitive K^+ channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. European Journal of Pharmacology. 2001;426:39-44.

Lee MJ, Han KJ, Kwon HJ, Jung HS, Cho SW. Effects of hyaluronan on carrageenan-induced synovitis in rat TMJ. Anatomy & Cell Biology. 2010;43(2):125-31.

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. The FASEB Journal. 2005;19(9):1196-8.

Li L, Fox B, Keeble J, Salto-Tellez M, Winyard PG, Wood ME, Moore PK, Whiteman M. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2013;17(3):365-76.

Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2011;51:169-87.

Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee LC, Del Soldato P, Moore PK. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. Free Radical Biology and Medicine. 2007;42:706-19.

Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. Free Radical Biology & Medicine. 2009;47:103-13.

Liu F, Steinkeler A. Epidemiology, diagnosis, and treatment of temporomandibular disorders. Dental Clinics of North America. 2013;57:465-79.

Lone BA. MMP-9, MMP-2 Profile in different mice tissues and LPS induced MMP-9 and MMP-2 expression in RAW 264.7 cells, down regulated by Emodin treatment. International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies (IJIMS). 2014;1(9):1-7.

Lv X, Li Q, Wu S, Sun J, Zhang M, Chen Y J. Psychological stress alters the ultrastructure and increases IL-1β and TNF-α in mandibular condylar cartilage. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2012;45(10):968-76.

Madeira MC. Anatomia da face: bases anátomo funcionais para a prática de odontologia, 8th ed.. São Paulo: Sarvier. 2012:105-23.

Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, Kawabata A. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. Pain. 2009;142:127-32.

Manfredini D, Guarda-Nardini L, Winocur E, Piccotti F, Ahlberg J, Lobbezoo F. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systematic review of axis I epidemiologic findings. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;112:453-62.

Matsumoto K, Honda K, Ohshima M, Yamaguchi Y, Nakajima I, Micke P, Otsuka K. Cytokine profile in synovial fluid from patients with internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary study. Dentomaxillofacial Radiology. 2006;35:432-41.

Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A. Luminal hydrogen sulfide plays a pro-nociceptive role in mouse colon. Gut. 2009;58:751-61.

Miller MS. Phosphodiesterase inhibition in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases: current status and potential. Journal of Receptor, Ligand and Channel Research. 2015;8:19-30.

Mizui T, Ishimaru JI, Miyamoto K, Kurita K. Matrix metalloproteinase-2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2001; 39: 310-4.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H_2S signals through protein S-sulfhydration. Science Signaling. 2009;2(96):ra72.

Nanci A. Tem Cate, Oral histology - Development, structure, and function, 7th ed. Mosby Elsevier. 2008:358-79.

Nascimento GC, Rizzi E, Gerlach RF, Leite-Panissi CRA. Expression of MMP-2 and MMP-9 in the rat trigeminal ganglion during the development of temporomandibular

joint inflammation. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2013;46:956-67.

Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. Revista de Odontologia da UNESP. 2006;35(4):233-8.

Nishimura S, Fukushima O, Ishikura H, Takahashi T, Matsunami M, Tsujiuchi T, Sekiguchi F, Naruse M, Kamanaka Y, Kawabata A. Hydrogen sulfide as a novel mediator for pancreatic pain in rodents. Gut. 2009;58:762-70.

North Shore Oral and Maxillofacial Surgery, organization. [Internet]. Crows Nest, Austrália; Temporomandibular joint disease treatment, c2015 [update 2015 jan 15; cited 2015 jan 15]. Available from: http://nsoms.com.au/procedures/ temporomandibular-joint-disease-treatment/.

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

Ogura N, Kondoh T. Molecular aspects in inflammatory events of temporomandibular joint: Microarray-based identification of mediators. Japanese Dental Science Review. 2014.

Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Free Radical Biology and Medicine. 2006;41(1):106-19.

Okeson JP. Management of temporomandibular disorders and occlusion, 6th ed. Chicago: Quintessence. 2008:105-72.

Olas B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. Clinica Chimica Acta. 2015;439:212-8.

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. European Journal of Pain. 2005;9:87-93.

Oliveira W. Disfunção temporomadibular. In: Paiva HJ. e colaboradores. Noções e conceitos básicos em oclusão, disfunção temporomandibular e dor orofacial. Livraria Santos Editora, 2008:215-28.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1967;70:158-69.

Pálinkás Z, Furtmüller PG, Nagy A, Jakopitsch C, Pirker KF, Magierowski M, Jasnos K, Wallace JL, Obinger C, Nagy P. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. British Journal of Pharmacology. 2015;172:1516-32.

Patterson AM, Schmutz C, Davis S, Gardner L, Ashton BA, Middleton J. Differential binding of chemokines to macrophages and neutrophils in the human inflamed synovium. Arthritis Research. 2002;4:209-14.

Pattison DI, Davies MJ, Hawkins CL. Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. Free Radical Research. 2012;46(8):975-95.

Paul BD, Snyder SH. H_2S signalling through protein sulfhydration and beyond. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2012;13:499-507.

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. British Journal of Pharmacology. 2004;142:331-8.

Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. Carbohydrate Polymers. 2014;105:97-112.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale: Farmacologia 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Rayner BS, Love DT, Hawkins CL . Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. Free Radical Biology and Medicine. 2014;71:240-55.

Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. Physiology and Behavior. 1999;67(5):711-6.

Roveroni RC, Parada CA, Cecília M, Veiga FA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. Pain. 2001;94(2):185-191.

Sachs D, Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginineNOcGMPprotein kinase GATP-sensitive K channel pathway. PNAS USA. 2004;101(10):3680-5.

Satoh K, Ogura N, Akutsu M, Kuboyama N, Kuyama K, Yamamoto H, Kondoh T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in IL-1β-induced synovitis of the temporomandibular joint. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2009;38:584-59.

Schemann M, Grundy D. Role of hydrogen sulfide in the visceral nociception. Gut. 2009;58,744-7.

Schütz TCB, Anderson ML, Tufik S. Effects of COX-2 inhibitor in temporomandibular joint acute inflammation. Journal of Dental Research. 2007;86:475-9.

Seki H, Fukuda M, Lino M, Takahashi T, Yoshioka N. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in synovial tissues from patients with internal

derangement or osteoarthritis of the temporomandibular joint. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2004;33:687-92.

Sen N, Paul BD, Gadalla MM, Mustafa AK, Sen T, Xu R, Kim S, Snyder SH. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions. Molecular Cell. 2012;45:13-24.

Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. Clinical Biochemistry. 2008;41(7-8):538-43.

Sidhapuriwala J, Li L, Sparatore A, Bhatia M, Moore PK. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat. European Journal of Pharmacology. 2007;569:149-54.

Sieghart D, Liszt M, Wanivenhaus A, Bröll H, Kiener H, Klösch B, Steiner G. Hydrogen sulphide decreases IL-1b-induced activation of fibroblast-like synoviocytes from patients with osteoarthritis. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2015;19(1):187-97.

Siqueira JTT. Disfunção temporomandibular: classificação e abordagem. In: Siqueira JTT, Teixeira MJ. Dor orofacial, diagnóstico, terapêutica e qualidade de vida. Curitiba: Editora Maio, 2001: 373-401.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. Journal of Chemical Biology. 1996;271(52):33157-60.

Soares AC, Duarte ID. Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K^+ channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. British Journal of Pharmacology. 2001;134:127-31.

Soares A C, Leite R, Tatsuo M A K F, Duarte I D G. Activation of ATP-sensitive K^+ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. European Journal of Pharmacology. 2000;400:67-71.

Stankovic S, Vlajkovic S, Boskovic M, Radenkovic G, Antic V, Jevremovic D. Morphological and biomechanical features of the temporomandibular joint disc: An overview of recent findings. Archives of Oral Biology. 2013;58:1475-82.

Staurengo-Ferrari L, Zarpelon AC, Longhi-Balbinot DT, Marchesi M, Cunha TM, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Ferreira SH, Casagrande R, Miranda KM, Verri WA Jr. Nitroxyl inhibits overt pain-like behavior in mice: role of cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. Pharmacological Reports. 2014;66(4):691-8.

Stein A, Bailey SM. Redox Biology of Hydrogen Sulfide: Implications for Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. Redox Biology. 2013;1(1):32-9.

Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka- Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P, Smolen JS. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. Rheumatology. 1999;38(3):202-13.

Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of enzymic capacity for cysteine desulpphydration in liver and kidney of the rat. Biochemical Journal. 1982;206:267-77.

Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S, Andersson K E, Hogestatt ED, Zygmunt PM. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. European Urology. 2008;53:391-9.

Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. Cardiovascular Research. 2008;79:632-41.

Takeuchi Y, Zeredo JL, Fujiyama R, Amagasa T, Toda K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. Neuroscience Letters. 2004;354:172-4.

Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. Journal of Dental Research. 2008;87:296.

Tang ML, Haas DA, Hu JW. Capsaicin-induced joint inflammation is not blocked by local anesthesia. Anesthesia Progress. 2004;51(1):2-9.

Tanimoto K, Iwabuchi Y, Tanne Y, Kamiya T, Inubushi T, Kunimatsu R, Mitsuyoshi T, Tanne K. Interleukin-1 beta affects cyclooxygenase-2 expression and cartilage metabolism in mandibular condyle. Archives of Oral Biology. 2011;56(11):1412-8.

Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac S, Müller CT, Riccardi D, Kemp PJ. Hydrogen sulfide inhibits human BK_{Ca} channels. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2009;648:65-72.

Tominaga K, Alstergren P, Kurita H, Kopp S. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint. Journal of Oral Pathology and Medicine. 1999;28(6):268-73.

Tominaga K, Habu M, Sukedai M, Hirota Y, Takahashi T, Fukuda J. IL-1β, IL-1 receptor antagonist and soluble type II IL-1 receptor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. Archives of Oral Biology. 2004;49:493-9.

Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. British Journal of Pharmacology. 2005;145:1123-31.

Turnbull CM, Marcarino P, Sheldrake TA, Lazzarato L, Cena C, Fruttero R. A novel hybrid aspirin-NO-releasing compound inhibits TNF-alpha release from LPS-activated human monocytes and macrophages. Journal of Inflammation (London). 2008;5(12).

Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(Phenylamino)-carbonyl]- 3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine–xanthine oxidase. Analytical Biochemistry. 1997;251:206-9.

Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. Nature Methods. 2013;10(3):211-20.

Wallace JL, Blackler RW, Chan MV, Da Silva GJ, Elsheikh W, Flannigan KL, Gamaniek I, Manko A, Wang L, Motta JP, Buret AG. Anti-Inflammatory and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics. Antioxidants & Redox Signaling. 2015;22(5):398-410.

Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide–releasing diclofenac derivative in the rat. Gastroenterology. 2007;132:261-71.

Wallace JL, Ferraz JGP, Muscará MN. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. Antioxidants & Redox signaling. 2012;17(1).

Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiological Reviews. 2012;92(2):791-896.

Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? The FASEB Journal. 2002;16:1792-8.

Wang XD, Kou XX, Mao JJ, Gan YH, Zhou YH. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. Journal of Dental Research. 2012;91(5):499-505.

Wedmann R, Bertlein S, Macinkovic I, Böltz S, Miljkovic JL j, Muñoz LE, Herrmann M, Filipovic M R. Working with "H_2S": facts and apparent artifacts. Nitric Oxide. 2014;41:85-96.

Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? Journal of Neurochemistry. 2004;90:765-8.

Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;326:794-8.

Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. Antioxidants & Redox Signaling. 2010;12(10):1147-54.

Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. Expert Review of Clinical Pharmacology. 2011;4(1):13-32.

Wu Z, Peng H, Du Q, Lin W, Liu Y. GYY4137, a hydrogen sulfide‐ releasing molecule, inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of nuclear factor‐ kappa B and mitogen‐ activated protein kinases in Coxsackie virus B3‐ infected rat cardiomyocytes. Molecular Medicine Reports. 2015;11(3):1837-44.

Yu XM, Sessle BJ, Vernon H, Hu JW. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. Pain. 1995;60(2):143-9.

Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. The FASEB Journal. 2006;20(12):2118-20.

Zhang H, Zhi L, Moore PK, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 2006;290:L1193-201.

Zhang J, Sio SW, Moochhala S, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. Molecular Medicine. 2010;16(9-10):417-24.

Zhou M, Qin S, Chu Y, Wang F, Chen L, Lu Y. Immunolocalization of MMP‐2 and MMP-9 in human rheumatoid synovium. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2014;7(6):3048-56.