

MARCO AURÉLIO VIEIRA DE PAULA

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

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão original.

São Paulo

2012

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 A articulação temporomandibular e Desordens

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

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

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

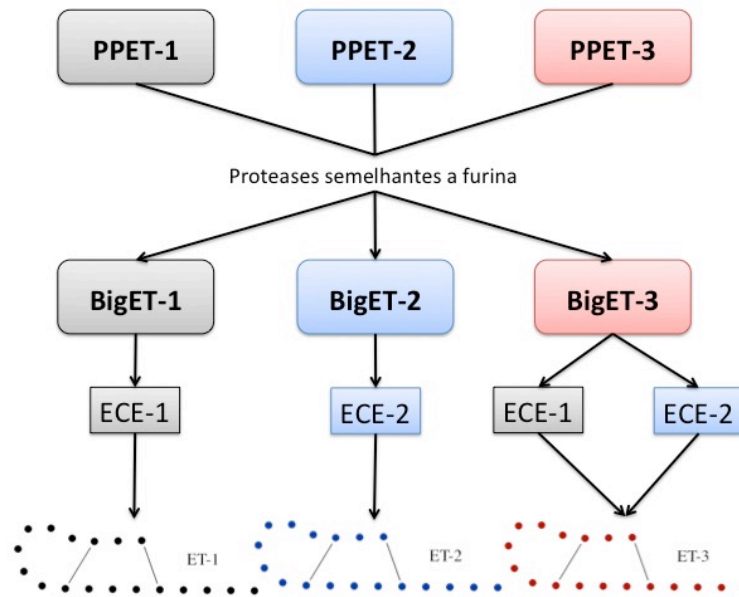
revestimento sinovial e aumento do número de células do tipo A, o qual foi revertido com o desaparecimento do processo inflamatório. Em relação às células do tipo B, estudos baseados em experimentos de histoquímica e imunohistoquímica revelam que estas células secretam diversos tipos de substâncias no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

1.2 Endotelinas e seus receptores

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

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

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



Fonte: Paula (2012)

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

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

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

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

1.3 Papel das endotelinas na dor e inflamação

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

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

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

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

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

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

Em relação à inflamação, as ETs não se mostram atuantes somente na nocicepção, mas elas também parecem apresentar papel importante na formação de edema e migração de neutrófilos. Brandli et al. (1995) mostrou que o antagonista seletivo de receptor ET_B (RO 46-8443), mas não o de receptor ET_A (BQ 123), foi capaz de prevenir o extravasamento de proteína plasmática na dura máter. Além disso, em modelo de artrite induzida por zimosam, Conte et al. (2008) concluíram que a participação das ETs na formação de edema e migração de neutrófilos está ligada à modulação da produção de TNF- α , LTB₄ e quimiocinas derivadas de queratinócitos. Toffoli et al. (2007) em experimentos realizados em culturas de células endoteliais humanas, utilizando neutrófilos e inibidores da enzima conversora de ET (ECE), detectaram uma importante participação das ETs na regulação das funções de neutrófilos, tais como ativação e liberação de LTB₄ e proMMP-9. Além disso, segundo o mesmo grupo, essa regulação pode estar ligada a ação de ET sobre o receptor ET_A, o que foi demonstrado pelo uso de antagonista seletivo ET_A (BQ123), o qual reduziu significativamente os parâmetros analisados.

1.4 Endotelinas e TRPV1 na inflamação e dor

Os mecanismos detalhados dos efeitos citados acima ainda permanecem obscuros, em especial aqueles envolvendo a participação das ETs na dor; porém, diversos trabalhos vem correlacionando as ações induzidas pelas ETs com a ativação de receptores vanilóides do sub-tipo 1 “transient receptor potential vanilloid type 1” ou TRPV-1 (Chichorro et al., 2010; Kawamata et al., 2008, 2009). Desta forma, Kawamata et al. (2009) observaram que a injeção intra-plantar de ET₁ foi capaz de evocar comportamento de dor via receptor ET_A de forma dependente de TRPV-1.

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

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

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

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

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

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

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

5 CONCLUSÕES

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

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

REFERÊNCIAS*

Asada S, Kasuya Y, Sakurai T, Masaki T, Goto K. Endothelin-1-induced downregulation of ETB receptor mRNA: participation of cAMP. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 Suppl 3:S272-5.

Atsü SS, Ayhan-Ardic F. Temporomandibular disorders seen in rheumatology practices: a review. *Rheumatol Int.* 2006;26(9):781-7. Review

Baamonde A, Lastra A, Villazón M, Bordallo J, Hidalgo A, Menéndez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369(2):245-51.

Balonov K, Khodorova A, Strichartz GR. Tactile allodynia initiated by local subcutaneous endothelin-1 is prolonged by activation of TRPV-1 receptors. *Exp Biol Med.* 2006;231(6):1165-70.

Bertelli A, Clerico A, Chicca A, Giovannini L, Gorio A, Romano MA. Role of endothelin-1 in carrageenin-induced inflammation. *Int J Tissue React.* 1992;14(5):225-30.

Brändli P, Löffler BM, Breu V, Osterwalder R, Maire JP, Clozel M. Role of endothelin in mediating neurogenic plasma extravasation in rat dura mater. *Pain,* 1996;64(2):315-22

Chichorro JG, Fiuza CR, Bressan E, Claudino RF, Leite DF, Rae GA. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: role of ETA and ETB receptors. *Brain Res.* 2010;1345:73-83.

Chichorro JG, Zampronio AR, Cabrini DA, Franco CR, Rae GA. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides,* 2009;43(2):133-42

Conte Fde P, Barja-Fidalgo C, Verri WA Jr, Cunha FQ, Rae GA, Penido C, Henriques MG. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. *J Leukoc Biol.* 2008;84(3):652-60.

Davar G, Hans G, Fareed MU, Sinnott C, Strichartz G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. *Neuroreport,* 1998;9(10):2279-83.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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