UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

TÂNIA CRISTINA CHICRE ALCÂNTARA DE BRITO

EFEITO DA ATIVAÇÃO LOCAL DO RECEPTOR CAPA OPIÓIDE NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO E MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para obtenção do título de Doutora em Odontologia – Área de Fisiologia Oral.

Orientadora: Prof.ª. Drª. Claudia Herrera Tambeli
Co-orientadora: Prof. Drª. Luana Fisher

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Tânia Cristina Chicre Alcântara de Brito , e orientada pela Professora Doutora Cláudia Herrera Tambeli.

_____

Assinatura do Orientador

PIRACICABA,2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

B77e

Brito, Tânia Cristina Chicre Alcântara de, 1977-
Efeito da ativação local do receptor capa opióide no extravasamento plasmático e migração de neutrófilos na articulação temporomandibular de ratos / Tânia Cristina Chicre Alcântara de Brito. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Claudia Herrera Tambeli
Coorientador: Luana Fisher.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Boca - Fisiologia. 2. Inflamação. 3. Mecanismos. I. Tambeli, Claudia Herrera. II. Fisher, Luana. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effect of local activation of opioid kappa receptors in plasma extravasation and neutrophil migration in the temporomandibular joint in rats

Palavras-chave em Inglês:

Oral fisiology

Inflammation

Mechanisms

Área de concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Claudia Herrera Tambeli [Orientador]

Elaine aparecida Del Bel Belluz Guimarães

Luciane Lacerda Franco Rocha Rodrigues

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

Data da defesa: 29-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 29 de Julho de 2011, considerou a candidata TÂNIA CRISTINA CHICRE ALCÂNTARA DE BRITO aprovada.

Profa. Dra. CLÁUDIA HERRERA TAMBELI

Profa. Dra. ELAINE APARECIDA DEL BEL BELLUZ GUIMARÃES

Profa. Dra. LUCIANE LACERDA FRANCO ROCHA RODRIGUES

Profa. Dra. MARIA CLÁUDIA GONÇALVES DE OLIVEIRA FUSARO

Profa. Dra. MARIA CECILIA FERRAZ DE ARRUDA VEIGA

Dedico este trabalho ao meu esposo Cristiano de Brito Matos, meu presente, sem ele nenhum sonho seria possível ou valeria a pena.

A meus filhos Mariana e Felipe, aos quais dedico minha vida.

Ao meu pai Alberto Alcântara e minha mãe Tânia Alcântara, que um dia sonharam e hoje compartilham este importante momento comigo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradecimento especial faço **à minha orientadora**, **Dra. Claudia Herrera Tambeli**, pessoa agraciada por Deus em intelectualidade e humildade, que só me fez bem.

Quero lhe agradecer por ter acolhido a mim e a minha família como seus filhos, pela paciência que teve comigo, pelos ensinamentos e dicas de pesquisa e pelas horas de leituras e raciocínio gastos no meu trabalho.

Professora Claudia, muito obrigada por tudo e que Deus continue sempre iluminando o seu caminho.

Agradeço também **a minha Co-Orientadora Dra. Luana Fisher**, pela co-orientação, atenção, dedicação e apoio dispensados durante a realização do Curso de Doutorado. Muito obrigada por tudo professora e seja sempre abençoada por Deus.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em especial a **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À **Universidade Estadual de Campinas** por meio do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP,** na pessoa do seu digníssimo Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior** e do Diretor Associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia** pela oportunidade da realização do Programa de Pós-Graduação em Odontológica.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, por todo apoio, carinho e atenção.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury.**

À **Universidade do Estado do Amazonas – UEA**, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. José Aldemir de Oliveira** e da Vice Reitora **Prof.ª Drª Marly Guimarães Fernandes Costa**, pela consolidação do DINTER UEA-UNICAMP em Odontologia e Clínica Odontológica, elevando os conhecimentos científicos e a titulação do corpo docente desta Instituição de Ensino Superior.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM**, pela concessão de bolsa de estudo, sem o apoio dos quais este projeto não teria sido viável.

À Coordenação do Curso de Odontologia da ESA-UEA na pessoa dos seus coordenadores **Prof. Benedito Taveira dos Santos, Profa. Dra. Tânia de Miranda Chicre Alcântara e Prof. Dr. Marcelo Diniz Carvalho**, pelo incentivo e apoio aos docentes do curso.

Ao professor **Dr. Carlos Parada** que sempre me incentivou, com seu jeitinho critico, mas que é um grande exemplo de pesquisador sério e determinado. Muito obrigada pelos momentos de amizade e pelo seu jeito muito alegre de ser e encarar a vida.

Quero agradecer **aos Professores do Doutorado em Odontologia** que se dispuseram a se deslocar de Piracicaba à Manaus para nos apresentar o conhecimento diante das aulas expositivas e práticas e nos estimular a realizar um trabalho realmente científico num estado rico em Biodiversidade, mas que está nascendo para a pesquisa. Muito obrigado professores, pelas aulas, pelas sugestões, pelos conselhos e dicas informais, pelos livros emprestados e pela participação.

Às Professoras **Maria Cecília de Arruda Veiga e Cintia Pereira Machado Tabchoury**, pelos conselhos, paciência, apoio e demonstração de otimismo perante a vida.

Às **minhas colegas de Laboratório**, em especial **a Karla, Nádia, Juliana e Monaliza**, por me receberem tão bem, me ajudarem e participarem direta ou indiretamente deste trabalho.

Ao **Feliciano e a Eliete** pelo companheirismo, amizade e auxílio técnico.

À **minha família** merece poucas palavras, mas aquelas que me são mais caras. Obrigado por vocês existirem. Obrigado por depositarem em mim a

confiança para todas as horas. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido mais uma etapa de minha vida. Mas este orgulho que sentem por mim, converto numa obrigação de a cada dia ser mais digno de representá-los. **Mãe** e **Pai**, obrigado pela minha existência e por tudo o que vocês me proporcionaram e me ensinaram durante todos estes anos. **Manos**, um beijo em cada um de vocês e obrigado pela torcida.

A**o Cris**, meu esposo, que por vezes deve ter detestado a mim e a este trabalho, pois ele sacrificou muitos momentos que poderíamos ter desfrutado juntos, mas sempre incentivou, sempre apoiou e, o melhor de tudo, sempre me cobrou para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos.

Ao **Pe. Delair Sebastião Cuerva**, meu mais novo amigo e irmão que esteve rezando em todos os momentos, torcendo por mim, ensinando sempre a acreditar na misericórdia de Deus por nós e me mostrando que enquanto tudo for impossibilidades sempre existirá espaço para Milagres, muito obrigado padre.

A **minha irmãzinha de coração Maria Vieira** pelas orações, torcida e apoio nos momentos de medo.

Seria injusto não citar **quatro amigas**, sei que cometo injustiça com outros, mas estas acompanharam meu trabalho, **a Claudia, a Cintia, a Adelsilene e a Cristiane** por terem sido como irmãs, sempre presente, sempre apoiando, incentivando e, humildemente, pedindo ajuda quando preciso foi, assim como muitas vezes também o fiz. Vocês são amiga imprescindível na vida de qualquer ser humano.

Aos **colegas de trabalho**, especialistas, mestres e doutores da UEA e UNINORTE que me acompanharam e me deram suporte desde o início do Doutorado e principalmente nos momentos finais.

Não me esqueci da **Dona Josefa** que me ajudou cuidando da minha filha quando estive em Piracicaba realizando o meu experimento. Muito obrigada pelas sopas e pelo carinho em nos acolher.

Ao seu **Amauri** que nos ajudou a alugar, a montar e mobiliar o apartamento para morarmos em Piracicaba. Também nos apresentou os lugares mais agradáveis da cidade e, além disso, torcia para que o experimento e o meu doutorado desse muito certo. Obrigado por sua simpatia e companheirismo.

Aos **meus alunos** que se interessaram e quiseram saber sobre ela e me estimularam a concretizar este sonho.

A todos os autores que li, pelos professores com quem tive aulas na graduação e pós-graduação, pelos colegas de doutorado que me fizeram aprender com as discussões e conversas.

A **todas as pessoas** que se fizeram presentes, que se preocuparam que foram solidárias, que torceram por mim. Mas bem sei que agradecer é sempre difícil. Posso cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Na tentativa de diminuir os efeitos colaterais de ação central associados ao uso dos analgésicos opióides, algumas estratégias têm sido desenvolvidas para que eles atuem especialmente nos receptores opióides periféricos. Nesse contexto, os receptores capa opióides são de grande interesse, uma vez que, em contraste com outros receptores opióides, sua ativação não está associada com efeitos colaterais periféricos significativos. Estudo recente, realizado em nosso laboratório demonstrou que a ativação de receptores capa opióides localizados na região da articulação temporomandibular de ratos reduz significativamente a nocicepção induzida pela administração do agente inflamatório formalina nessa mesma articulação. No entanto, ainda não havia sido investigado até então, se a ativação de receptores capa opióides localizados na região da articulação temporomandibular de ratos também diminuía a inflamação induzida pela formalina nessa mesma articulação. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar se a ativação de receptores capa opióides localizados na região da articulação temporomandibular de ratos diminui o extravasamento plasmático e a migração de neutrófilos induzidos pela administração de formalina na articulação temporomandibular de ratos. A intensidade do extravasamento plasmático foi determinada pela concentração do corante Azul de Evans extravasado no tecido articular e a intensidade de migração de neutrófilos pela avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase. Para avaliar as diferenças significativas entre os grupos de extravasamento plasmático e migração de neutrófilos foi usado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey e o nível de significância estatística foi $p < 0,05$.Os dados estão expressos em valores como média ± S.E.M.

A co- administração de formalina a 1,5% e U50,488 (agonista seletivo de receptor capa opióide) (50µg) reduziu significativamente o extravasamento plasmático (Média± EPM: 23,42 µg/g ± 4,88) de forma dose dependente e reversível quando comparado com os demais grupos de 1,5µg (46,60 µg/g; ± 5,40) e 30µg (37,60 µg/g ±3,64). Quando o U50,488 foi administrado na articulação

temporomandibular contralateral a que recebeu formalina 1,5%, ele não afetou o extravasamento plasmático.

A co- administração de formalina a 1,5% e U50,488 (1,5µg) reduziu significativamente a migração de neutrófilo (1,10 µg/mg ± 0,20) de forma dose dependente quando comparado com os demais grupos de 0,3µg (3,23µg/mg ± 0,56) e 0,75µg (2,4323 µg/mg ± 0,42). Quando o U50,488 foi administrado na articulação temporomandibular contralateral a que recebeu formalina 1,5%, ele não afetou a migração de neutrófilos induzidos pela formalina. Este efeito antiinflamatório foi revertido pela administração prévia, na articulação temporomandibular ipsilateral, mas não contralateral, do antagonista seletivo do receptor capa opióide nor-BNI (cloridrato de nor-Binaltorfimina, 200µg). Este estudo demonstrou que a ativação local de receptores capa opióides na região da articulação temporomandibular reduz significativamente dois parâmetros importantes da inflamação, que são o extravasamento plasmático e a migração de neutrófilos, de uma forma dose-dependente e antagonista reversível. Esse efeito antiinflamatório, em conjunto com o potente efeito antinociceptivo previamente observado desse agonista capa opióide, sugere que drogas que atuem sobre os receptores capa opióides periféricos são promissoras para o tratamento da dor e da inflamação nas articulações temporomandibulares e, provavelmente, para o tratamento de outras condições de dor articular que possua componente inflamatório.

Palavras Chaves: inflamação, receptor capa opioide, articulação temporomandibular.

ABSTRACT

In an attempt to decrease central side effects associated with the use of opioids, some strategies have been developed by targeting peripheral opioid receptors. In this context, kappa opioid receptors are of major interest, since, in contrast to other opioid receptors, their activation is not associated with potent peripheral side effects. We have recently demonstrated that local activation of kappa opioid receptors significantly decreases formalin-induced temporomandibular joint nociception, however, whether it also decreases temporomandibular joint inflammation is not known. To address this issue, we evaluated if the selective kappa opioid receptor agonist, U50,488 (trans-(1S,2S)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl] benzeneacetamide hydrochloride hydrate), administered into the temporomandibular joint decreases formalin-induced plasma extravasation and neutrophil migration. The intensity of plasma extravasation was determined by measuring the concentration of Evan´s blue dye extravasated in the articular tissue and the intensity of leukocyte migration was determined by measuring Myeloperoxidase activity also in the articular tissue. Data were analyzed by ANOVA and Tukey post hoc test ($p \leq 0.05$) and the results are expressed as mean ± EPM. The co-administration of 1.5% formalin with the selective kappa opiod receptor agonist U50,488 at 50 µg significantly reduced the plasma extravasation (Mean±EPM: 23.42 µg/g ± 4.88) compared to the other groups receiving 1.5% formalin plus U50,488 at 1.5µg (46.60 µg/g ± 5,40) and at 30µg (37.60 µg/g ± 3.64). When applied on the contralateral temporomandibular joint, U50,488 had no effect on formalin-induced plasma extravasation. The co-administration of 1.5% formalin with U50,488 at 1.5µg significantly reduced formalin-induced neutrophil migration (1.10 µg/mg ±0.20) compared to the other groups receiving 1.5% formalin plus U50,488 at 0.3µg (3.23µg/mg ± 0.56) and at 0.75µg (2.43 µg/mg ± 0.42). When applied on the contralateral temporomandibular joint, U50,488 had no effect on formalin-induced neutrophil migration. The anti-inflammatory effect of U50,488 was blocked by the ipsilateral, but not contralateral

administration of the selective kapa opioid receptor antagonist nor-BNI (Nor-Binaltorphimine dihydrochloride). This study demonstrates that local activation of kappa opioid receptors decreases two important parameters of temporomandibular joint inflammation, that is, plasma extravasation and neutrophil migration, in a dose-dependent and antagonist-reversible manner. This anti-inflammatory effect taken together with the previously demonstrated potent antinociceptive effect of U50,488, suggest that drugs targeting peripheral kappa opioid receptors are promising for the treatment of inflammatory temporomandibular joint pain and probably, other articular pain conditions with an inflammatory basis.

Key Words: Inflammation, Kappa opioid receptor and temporomandibular joint.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. CAPITULO 1 5
4.CONCLUSÃO 26
5.REFERÊNCIAS 27
6. ANEXOS 29
6.1 FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 29
6.2 PROTOCOLOS 30
6.2.1 Extravasamento Plasmático 30
6.2.2 Determinação da curva de neutrófilo 30
6.2.3 Quantificação da migração leucocitária para ATM 31

1. INTRODUÇÃO

Os analgésicos opióides estão entre as drogas mais efetivas e amplamente utilizadas no tratamento e controle da dor. No entanto, os efeitos colaterais associados ao uso de analgésicos opióides, tais como tonturas, náuseas, vômitos, constipação, sedação, tolerância e dependência, limitam seu uso clínico. Embora sua utilização generalizada seja dificultada por graves efeitos colaterais centrais, os opióides também podem induzir analgesia potente e clinicamente mensurável sem efeitos colaterais centrais atuando sobre receptores opióides periféricos (Tambeli *et al.*, 2009).

Há algumas décadas, as evidências de que os receptores opióides dos subtipos capa, mu e delta, são expressos em neurônios periféricos, células inflamatórias e endoteliais, condrócitos e fibroblastos (Stein *et al.,* 2003) e em células do sistema imune como os macrófagos e linfócitos (Kulkarni-Narla *et al.*, 2001), introduziram a idéia de que o uso de analgésicos opióides com ação periférica poderia ser uma alternativa terapêutica eficaz, pois a maior parte dos efeitos colaterais se deve a ação central dessas drogas. Desde então, o uso de baixas doses locais de opióides convencionais ou a administração sistêmica de opióides com restrita absorção central têm sido utilizadas com sucesso em diferentes condições dolorosas clínicas (Oeltjenbruns & Schafer, 2005) e experimentais (Binder & Walker, 1998; Amarante & Duarte, 2002; Garlicki *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2006). Muitos estudos têm demonstrado que opióides administrados local ou sistemicamente durante a inflamação periférica possuem poder antinociceptivo (Stein, 1995) e efeito anti-inflamatório, incluindo a diminuição do edema de pata (Binder *et al.,* 2001) e do extravasamento plasmático (Green & Levine, 1992) na articulação do joelho. Perifericamente, os receptores opióides são expressos nas fibras sensoriais e em terminais pós-ganglionares simpáticos, onde participam da modulação da informação nociceptiva sob certas condições patológicas.

A dor aguda e crônica está frequentemente associada a dano tecidual, reação imunológica anormal ou injuria neural que resultam em inflamação periférica, condição na qual ocorre aumento na expressão de receptores opióides periféricos e rompimento da barreira perineural que, em condições normais, limita o acesso dos opióides aos seus receptores neuronais (Stein *et al.*, 2003). Recentemente, tem sido demonstrado que além de atenuar a excitabilidade do neurônio nociceptivo primário o que resulta em efeito analgésico direto, o efeito periférico dos opióides também envolve a diminuição da liberação de neuropeptídeos e da expressão de citocinas, mediadores inflamatórios e moléculas de adesão a partir das células inflamatórias (Stein *et al.*, 2001), o que resulta em um potente efeito antiinflamatório. Apesar da maior parte dos estudos avaliarem o efeito periférico de agonistas do receptor opióide mu, recentemente os agonistas dos receptores capa vêm ganhando destaque, especialmente em condições de dor e inflamação articular. O desenvolvimento de agonistas capa opióides de ação periférica é de especial interesse porque ao contrário dos agonistas de outros receptores opióides, eles não estão associados a efeitos colaterais viscerais, tais como espasmo e constipação (Eisenach *et al.,* 2003). Como outros agonistas opióides, os agonistas capa opióides (Gaveriaux *et al.,* 2008; Alebouyeh *et al.,* 2002) também têm efeitos antiinflamatórios (Jimenez *et al.*, 2006; Green & Levine, 1992). Vários estudos demonstraram que agonistas capa opióide atenuam a dor e a progressão da artrite de joelho em modelos experimentais (Walker *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1996; Binder & Walker, 1998; Walker *et al.*, 2000).

As disfunções temporomandibulares (DTMs) são condições de dor crônica envolvendo os músculos da mastigação e a articulação temporomandibular (ATM) (Dworkin *et al.*, 1990) que na maior parte das vezes estão associadas a um importante componente inflamatório (Alstergren & Kopp, 2000; Suzuki *et al.*, 2003). Muitos estudos clínicos em analgesia opióide periférica foram desenvolvidos em pacientes que sofrem de dor articular persistente, um

problema de grande relevância e prevalência. Entre estas condições de dor, a dor da articulação temporomandibular, há muito tempo, tem sido reconhecida como um dos mais difíceis tipos de dor articular para tratar. A inflamação é uma das principais características desta condição dolorosa quando associada à artrite, trauma agudo e desarranjo interno (Alstergren & Kopp, 2000; Suzuki *et al.*, 2003). A aplicação de doses sistemicamente inativas de opiáceos diretamente na articulação é benéfica no tratamento da dor articular (Stein *et al.*, 2006; Ziegler *et al.*, 2010) devido a ausência de efeitos colaterais centralmente mediados. No entanto, a necessidade de injeções repetidas é uma limitação séria deste procedimento. Por essa razão, têm sido envidados esforços para desenvolver novos compostos opióides que não atravessem a barreira hemato-encefálica e que possam ser administrados por via oral ou intravenosa.

O adequado controle e tratamento das DTMs ainda é um grande desafio terapêutico, pois é marcado por um alto índice de insucesso (Shankland, 2004; Herb *et al.*, 2006). Em nosso laboratório, foi desenvolvido um modelo animal para o estudo dos mecanismos envolvidos na dor e inflamação da ATM, utilizando a injeção de formalina na ATM de ratos (Roveroni *et al.*, 2001), um agente inflamatório considerado altamente representativo de condições clínicas associadas a dor e inflamação (Le Bars *et al.*, 2001). Recentemente, demonstramos que a administração do agonista do receptor capa opióide, U50,488, na região da ATM de ratos, reduz significativamente a resposta comportamental nociceptiva (Clemente *et al.*, 2004) induzida pela formalina. Estes resultados sugerem a existência de receptores capa opióides funcionais na região da ATM e evidenciam o potencial terapêutico de agonistas dos receptores capa opióides periféricos no tratamento da dor inflamatória articular. A ativação de receptores capa opióides diminui o extravasamento plasmático, um importante sinal de inflamação aguda, durante a inflamação no intestino (Jimenez *et al.*, 2006) e na articulação do joelho (Green & Levine, 1992). No entanto, não existe um consenso sobre o seu efeito na migração de neutrófilo, um importante evento

relacionado à lesão no tecido (Bastos *et al*., 2011; Qu *et al*., 1993). Apesar da ativação dos receptores capa opióides, localizados na ATM de ratos, reduzirem significativamente a nocicepção induzida pela formalina na ATM (Clemente *et al*., 2004), ainda é desconhecido se ele também diminui a inflamação da ATM. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se a ativação dos receptores capa opióides na região da ATM de ratos diminui a migração de neutrófilos e o extravasamento plasmático induzidos pela administração de formalina na ATM de ratos.

2. CAPITULO 1

Artigo publicado em 2011 na revista "Inflammation"

Local Kappa opioid receptor activation decreases temporomandibular joint inflammation

Tânia C. Chicre-Alcântara a,c, Karla E. Torres-Chávez a, Juliana T. Clemente-Napimoga a, Luana Fischer d, Carlos Amílcar Parada b, Claudia Herrera Tambelia, b

a Department of Physiology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas–

UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brazil

b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of

Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

c State University of Amazon

d Department of Physiology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

Abstract

In an attempt to decrease central side effects associated with the use of opioids, some strategies have been developed by targeting peripheral opioid receptors. In this context, kappa receptors are of major interest, since, in contrast to other opioid receptors, their activation is not associated with potent peripheral side effects. We have recently demonstrated that local activation of kappa opioid

receptors significantly decreases formalin-induced temporomandibular joint nociception, however, whether it also decreases temporomandibular joint inflammation is not known. To address this issue, we evaluated if a specific kappa opioid receptor agonist, U50,488 (trans-(1S,2S)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl] benzeneacetamide hydrochloride hydrate), administered into the temporomandibular joint decreases formalin-induced plasma extravasation and neutrophil migration. Ipsilateral, but not contralateral administration of U50,488 into the temporomandibular joint blocked formalin-induced plasma extravasation and neutrophil migration in a dose dependent manner. This anti-inflammatory effect was reversed by the ipsilateral, but not contralateral administration of the kappa opioid receptor antagonist nor-BNI (Nor-Binaltorphimine dihydrochloride). This study demonstrates that local activation of kappa opioid receptors decreases two important parameters of temporomandibular joint inflammation, that is, plasma extravasation and neutrophil migration, in a dose-dependent and antagonist-reversible manner. This anti-inflammatory effect taken together with the potent antinociceptive effect, suggest that drugs targeting peripheral kappa opioid receptors are promising for the treatment of inflammatory temporomandibular joint pain and probably, other articular pain conditions with an inflammatory basis.

Key words: kappa opioid receptors; inflammation; temporomandibular joint

Introduction

Opioids are the most powerful drugs for pain treatment. Although its widespread use is hampered by serious central side effects, opioids can also induce potent and clinically measurable analgesia without central side effects by acting on peripheral opioid receptors [1]. Many clinical studies on peripheral opioid analgesia have been developed in patients suffering from persistent articular pain, a problem of major relevance and prevalence. Among these pain conditions, temporomandibular joint (TMJ) pain has long been recognized as one of the most difficult types of articular pain to treat. Inflammation is a major feature of this pain condition, especially when associated with arthritis, acute trauma and internal derangement [2-3]. While intra-articular application of systemically inactive doses of opioids is beneficial in articular pain management [4-6] due to absence of centrally mediated side effects, the requirement of repeated intra-articular injections is a serious limitation of this procedure. For this reason, efforts have been made to develop novel opioid compounds that do not pass the blood-brain barrier and that may be orally or intravenously administered. The development of peripherally acting kappa opioid agonists is of special interest because in contrast to agonists of other opioid receptors, they are not associated with visceral side effects, such as spasm and constipation [7] . Like other opioid agonists, [8-9] kappa opioid agonists have also anti-inflammatory effects [10-11]. Kappa opioid receptor activation decreases plasma extravasation, a major sign of acute inflammation, during inflammation in the gut [10] and in the knee joint [11].

However, there is not a consensus about its effect on neutrophil migration, an important event related to tissue injury [12-14]. We have demonstrated that the activation of kappa opioid receptors located in the rat´s TMJ significantly reduces formalin-induced TMJ nociception [15]. However, whether it also decreases TMJ inflammation is presently unknown. To address this issue, we investigated whether the activation of kappa opioid receptors in the rat´s TMJ region decreases formalin-induced plasma extravasation and neutrophil migration in a dose-dependent and antagonist-reversible manner.

Material and Methods

Animals:

Male Wistar rats (150 - 250g) were used. The experiments were in accordance with IASP guidelines for the study of pain in animals [16]. All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the State University of Campinas. The animals were housed in plastic cages with soft bedding (five/cage) on a 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) in a temperature-controlled (±23°C) vivarium. Food and water were available *ad libitum.*

Drugs

Formalin was prepared from commercially (Sigma Chemicals) available stock formalin (an aqueous solution of 37% of formaldehyde) further diluted in 0.9% NaCl to a concentration of 1.5%. The κ-opioid receptor agonist, U50,488 (trans-(1S,2S)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl) cyclohexyl]benzeneacetamide hydrochloride hydrate), and antagonist, Nor-Binaltorphimine dihydrochloride (nor-BNI), were obtained from Sigma (USA) and dissolved in saline (0.9% NaCl).

TMJ injection

Rats were anaesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine (55mg/kg) and xylazine (5.5 mg/kg). Formalin (1.5%) or its vehicle (0.9%

NaCl) was unilaterally injected in the TMJ (30 µl) with a 30-gauge needle introduced into the TMJ at the moment of injection. The needle was inserted in the posteroinferior border of the zigomatic arch and advanced in an anterior direction until contacted the posterolateral aspect of the condyle. This contact was to a depth approx 3mm and was verified by moving the needle and mandible together. A cannula consisting of a polyethylene tube (PE-50; Intramedic, Clay Adams, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was connected to the needle and also to a 50-µl syringe (Hamilton, Reno, NV, USA).

TMJ Plasma extravasation measurement

Immediately after the TMJ injection, the Evans blue dye (Sigma Chemicals, 5 mg/kg), was injected into the right femoral vein. The Evans blue dye binds to plasma protein extravasated in the inflammatory site and therefore, was used as a marker for plasma extravasation [17]. Forty-five minutes after the Evans blue dye injection, animals were perfused transcardially with saline (NaCl 0.9%) to flush the dye from the vasculature. Joint tissues were dissected to a standardize size (30 ± 2 mg) and stored at -30^{o}C until analysis. The dye was extracted by immersing the samples in 1 ml of formamide at 60°C for 24 h. The amount of Evans blue dye (μg) in the tissue sample was determined using a spectrophotometer that measured the absorbance of the formamide solution (v= 620 nm). The concentration of dye was then calculated per gram weight of tissue.

Determination of neutrophil standard curve

Neutrophils collected from peritoneal cavity after injection of 1% oyster glycogen (15ml/ intraperitoneal) were used to obtain the neutrophil standard for myeloperoxidase assay, as described below. Four hours later intraperitoneal injection of oyster glycogen, rats were killed by an overdose of halothane. On a laminar air flow unit, peritoneal cavity cells were harvested by washing the cavity with 5 ml of RPMI-1640 medium (Sigma Chemicals, São Paulo, Brazil). The samples of four animals were pooled and total cells per ml of isolate were counted. The percent of neutrophils in the isolate was determined by taking 100 cells in the total cell population, attaching them to a slide using a cytocentrifuge and then staining with Rosenfeld stain. After staining, neutrophils could be identified and counted within this mixed population and the percentage of neutrophils calculated.

TMJ myeloperoxidase activity measurement

Myeloperoxidase (MPO) is one of the enzymes released from neutrophils and directly associated to tissue injury [18]. Therefore, the measurement of its activity was used as a maker of neutrophil migration to the inflamed TMJ. The MPO kinetic-colorimetric assay was used, as previously described [19]. Forty-five minutes after the TMJ injection of formalin or its vehicle, the TMJ tissue was dissected in standardized size, weighted, quickly frozen by liquid isopentane in dry ice and stored at -70^{o}C. In the assay procedure, each sample was homogenized in 500 µl of buffer 1 (0.1M NaCl, 0.02 M $NaPO_4$, 1.015 M Na EDTA, pH 4.7) followed by centrifugation at 3000 rpm for 15 min. The pellet was ressuspended in 500 µl of

buffer 1 and subjected to hypotonic lyses by the addition of 500 µl of 0.2% NaCl followed 30 s later by addition of 500 µl of 1.6% NaCl in 5% glucose. After a further centrifugation, the pellet was ressuspended in 0.05 M NaPO4 buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide (HTAB). After that, the samples were snap-frozen in liquid nitrogen and defrosted, three times, and centrifuged at 10000 rpm for 15 min. 50 µl of each sample (supernatant) and of 0.08 M NaPO4 were dropped into wells of a 96-well microplate. 25 µl of 3,3′, 3,3′ - Tetramethylbenzidine was added in each well and the reaction was initiated by the addition of 100 µl de H_2O_2. The reaction was stopped 5 min later by the addition of 50 µl of 4M H_2SO_4. The optical density was read at 450 nm using an Anthos 2020. Results were calculated by comparing the optical density of TMJ tissue supernatant with the standard curve of neutrophil (>95% purity). The results were presented as number of neutrophils $x10^6$/mg tissue.

Statistical analysis

To determine if there were significant differences in TMJ plasma extravasation and neutrophil migration between groups one-way ANOVA was used. If there was a significant between-subjects main effect of treatment group following one-way ANOVA, post-hoc contrasts, using *Tukey test*, was performed to determine the basis of the significant difference. The level for statistical significance was $p < 0.05$. Data are expressed in figures as means ± S.E.M.

Results

Formalin (1.5%) plus the kappa opioid receptor agonist U50,488 or its vehicle (0.9% NaCl) was injected into either the ipsilateral TMJ (1.5, 30 or 50µg in plasma extravasation experiments and 0.3, 0.75 or 1.5 µg in neutrophil migration experiments) or the contralateral TMJ (50 µg in plasma extravasation experiments and 1.5 µg in neutrophil migration experiments).

TMJ injection of 1.5% formalin induced a significantly greater plasma extravasation and neutrophil migration than that induced by its vehicle (0.9% NaCl) ($p < 0.05$, t test).

Ipsilateral U50,488 blocked formalin-induced TMJ plasma extravasation (Figure 1A) and neutrophil migration (Figure 1B) ($p < 0.05$, Tukey test) in a dose dependent manner. Contralateral U50,488 had no significant effect, indicating that local kappa opioid receptors mediate the anti-inflammatory effect on ipisilateral TMJ.

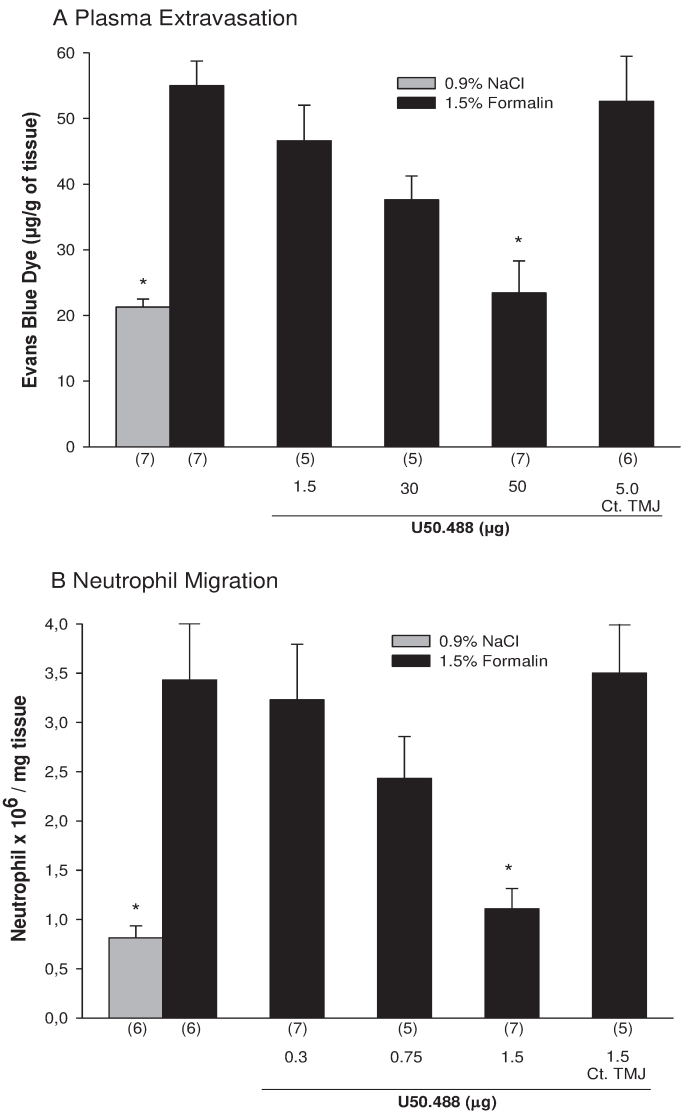


Figure 1

Figure 1: Ipsilateral, but not contralateral administration of the kappa opioid receptor agonist U50,488 dose dependently blocked formalin-induced TMJ plasma extravasation (A) and neutrophil migration (B), as indicated by the symbol * (Tukey test, $p<0.05$). In this and the subsequent figures, data are plotted as mean + SEM and group sample sizes are shown in parentheses. See material and methods for additional details regarding data prese ntation and analysis.

Considering that the anti-inflammatory effect of U50,488 could derivate from a non-specific action, we evaluated the ability of the kappa opioid receptor antagonist nor-BNI to block the anti-inflammatory effect induced by U50,488. Prior ipisilateral, but not contralateral nor-BNI administration reversed the anti-inflammatory effect of U50,488 evaluated on formalin- induced plasma extravasation (Figure 2A) and neutrophil migration (Figure 2B), indicating that U50,488 acts specifically on kappa opioid receptors to decrease formalin-induced TMJ inflammation.

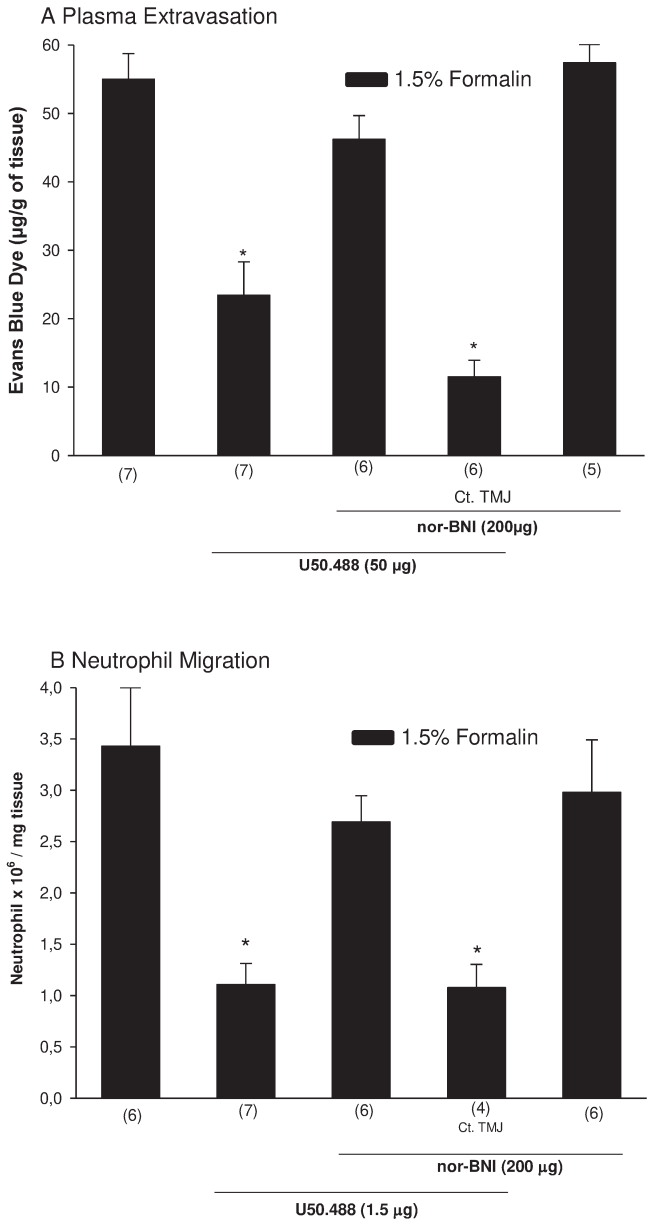


Figure 2

Figure 2: Ipsilateral, but not contralateral administration of the kappa opioid receptor antagonist nor-BNI blocked the effect of U50,488 on formalin-induced TMJ plasma extravasation (A) and neutrophil migration (B), as indicated by the symbol * (Tukey test, $p<0.05$).

Discussion

In this study we provided evidence that activation of kappa opioid receptors located into the TMJ region reduces two important parameters of inflammation, plasma extravasation and neutrophil migration. Intra-TMJ administration of the selective kappa-agonist U50,488 blocked formalin-induced plasma protein extravasation and neutrophil migration in a dose-dependent manner. Moreover, this effect was arguably the result of activation of local kappa opioid receptors since U50,488 injection into the contralateral joint did not reproduce the effect and also because prior injection of the selective kappa-antagonist nor-BNI into the inflamed joint reversed the anti-inflammatory effect of U50,488. These findings support our previous suggestion that functional kappa opioid receptors are present in the rat TMJ [15], which is consistent with the expression of kappa opioid receptor in trigeminal ganglia [20]. These receptors when activated suppress formalin-induced TMJ inflammation and TMJ afferent activity [15], which suggest that drugs targeting peripheral kappa opioid receptors are promising for the treatment of TMJ inflammatory pain conditions and probably other articular pain conditions with an inflammatory basis.

The ability of peripheral kappa opioid receptors in modulating vascular permeability is well known and it has been previously demonstrated in models of neurogenic inflammation [11] and adjuvant arthritis [21], in the knee joint. In the current study we extended these findings by showing their ability in decreasing plasma extravasation also in the temporomandibular joint. In addition, we showed the ability of peripheral kappa opioid receptors in modulating neutrophil migration,

which is consistent with the *in vitro* demonstration that kappa opioid agonists inhibit neutrophil chemotaxis [13]. In contrast, local activation of kappa opioid receptors has been reported to decrease inflammatory reaction by lowering the levels of IL-6 and increasing IL-10 without affecting neutrophil migration in a model of periodontal inflammation [12]. One possible explanation for this apparent discrepancy may be found in the local mechanisms that affect the infiltration of neutrophils into the site of inflammation such as expression of inflammatory mediators at the inflamed tissue. These local mechanisms may differ in different tissues and/or inflammatory conditions. Another possible explanation may lie in the high dose of the kappa agonist U50,488 used in the model of periodontal inflammation, and in the lack of demonstration of a receptor-mediated action of U50,488 with a selective kappa opioid receptor antagonist. In this case, a non-specific action of U50,488 at the dose used cannot be exclude and might explain the divergences between the studies.

The mechanisms underlying the inhibition of plasma extravasation and neutrophil migration induced by the activation of TMJ kappa opioid receptors are presently unknown but are under investigation in our laboratory. They may be triggered by the activation of kappa opioid receptors located on the TMJ nociceptors and on leukocytes, which is consist with the expression of these opioid receptors in the trigeminal ganglia [20] and in neutrophils [13], respectively. Potential mechanisms that may be common or specific to these two parameters of inflammation may involve modulation of the release of neuropeptides, cytokines and other inflammatory mediators, such as nitric oxide, that has been reported to

reduce plasma extravasation in a model of intestinal inflammation [10]. In addition to these potential mechanisms, neutrophil migration may also be inhibited by the activation of kappa opioid receptors expressed in neutrophils. Consistent with this idea, the activation of these receptors has been reported to rapidly modulate chemotaxis of neutrophils by decreasing the expression of proteins involved in neutrophil function, such as β_2-integrin that is involved in neutrophil adhesion, degranulation, and receptor-mediated phagocytosis [13]. One interesting observation of this study was that U50,488 was more potent in inhibiting formalin-induced neutrophil migration than plasma extravasation. While 1.5µg was sufficient to inhibit neutrophil migration, 50µg was necessary to inhibit plasma extravasation. The mechanism underlying this higher potency of U50,488 in inhibiting neutrophil migration is not known. However, it may lie, at least in part, in its direct action on kappa opioid receptors expressed on neutrophils.

In summary, this study demonstrates that the kappa opioid receptor agonist U50,488 inhibits TMJ inflammation by a local, dose-dependent and antagonist-reversible action. Among opioid receptors, kappa receptors are of major interest as targets for new peripherally acting opioids because their activation is not associated with the peripheral side effects attributed to mu agonists [7]. However, despite their well known antinociceptive properties, their ability in decreasing inflammation was unclear. By using the same TMJ nociceptive and inflammatory model, we have demonstrated that local kappa opioid receptor activation inhibits TMJ nociception [15] and two parameters of TMJ inflammation, plasma extravasation and neutrophil migration. These potent antinociceptive and anti-

inflammatory effects, suggest that peripheral kappa opioid receptors are excellent targets for new drugs designed to treat and control articular inflammatory pain conditions.

References

1. Tambeli CH, Fischer L, Parada CA. Chapter 14: Opioid Receptors. In: Cairns B, editor. *Peripheral receptor targets for analgesia*. Wiley; 2009. pp. 347-72.

2. Alstergren P, Kopp S. Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000;58:180-6; discussion 6-8.

3. Suzuki T, Segami N, Nishimura M, Sato J, Nojima T. Bradykinin expression in synovial tissues and synovial fluids obtained from patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *Cranio*. 2003;21:265-70.

4. Stein A, Yassouridis A, Szopko C, Helmke K, Stein C. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. *Pain*. 1999;83:525-32.

5. Stein C. Intra-articular morphine for inflammatory pain. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2006;31:496-7.

6. Ziegler CM, Wiechnik J, Muhling J. Analgesic effects of intra-articular morphine in patients with temporomandibular joint disorders: a prospective, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.68:622-7.

7. Eisenach JC, Carpenter R, Curry R. Analgesia from a peripherally active kappa-opioid receptor agonist in patients with chronic pancreatitis. *Pain*. 2003;101:89-95.

8. Gaveriaux-Ruff C, Karchewski LA, Hever X, Matifas A, Kieffer BL. Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *European Journal of Neuroscience*. 2008;27:2558-67.

9. Alebouyeh M, Pourpak Z, Ahmadiani A. Increase in serum level of interleukin-1 alpha mediates morphine anti-inflammatory effect in carrageenan-induced paw oedema in mice. *Cytokine*. 2002;19:102-5.

10. Jimenez N, Puig MM, Pol O. Antiexudative effects of opioids and expression of kappa- and delta-opioid receptors during intestinal inflammation in mice: involvement of nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;316:261-70.

11. Green PG, Levine JD. Delta- and kappa-opioid agonists inhibit plasma extravasation induced by bradykinin in the knee joint of the rat. *Neuroscience*. 1992;49:129-33.

12. Bastos JV, Queiroz-Junior CM, Caliari MV, Francischi JN, Pacheco CM, Maltos KL. Peripheral kappa opioid receptors activation reduces alveolar bone loss in rats by modulating interleukin-6 and -10. *Archives of Oral Biology*. 2010.

13. Kulkarni-Narla A, Walcheck B, Brown DR. Opioid receptors on bone marrow neutrophils modulate chemotaxis and CD11b/CD18 expression. *European Journal of Pharmacology*. 2001;414:289-94.

14. Qu ZX, Xu J, Hogan EL, Hsu CY. Effect of U-50488h, a selective opioid kappa receptor agonist, on vascular injury after spinal cord trauma. *Brain Research*. 1993;626:45-9.

15. Clemente JT, Parada CA, Veiga MC, Gear RW, Tambeli CH. Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. *Neuroscience Letters*. 2004;372:250-5.

16. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16:109-10.

17. Haas DA, Nakanishi O, MacMillan RE, Jordan RC, Hu JW. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Arch Oral Biol*. 1992;37:417-22.

18. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med*. 1999;133:321-5.

19. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78:206-9.

20. Clemente-Napimoga JT, Pellegrini-da-Silva A, Ferreira VH, Napimoga MH, Parada CA, Tambeli CH. Gonadal hormones decrease temporomandibular joint kappa-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.

21. Binder W, Walker JS. Effect of the peripherally selective kappa-opioid agonist, asimadoline, on adjuvant arthritis. *British Journal of Pharmacology*. 1998;124:647-54.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste estudo foi demonstrado o efeito da ativação de receptores capa opióides localizados na região da articulação temporomandibular na redução de dois parâmetros importantes do processo inflamatório, ou seja, o extravasamento plasmático e a migração de neutrófilos induzidos pelo agente inflamatório formalina. A formalina foi escolhida como agente inflamatório, porque em estudos anteriores realizados através da administração da mesma na ATM de ratos, foi demonstrado que a ativação de receptores capa opióides na região dessa articulação reduz significativamente a resposta nociceptiva (Clemente et. al, 2004, Clemente-Napimoga et al. 2009). Portanto, este estudo, dá continuidade a estudos anteriores realizados pelo grupo da Professora Cláudia Tambeli e sugere que a redução da resposta nociceptiva induzida pela ativação de receptores capa opióides na região da ATM, resulte, pelo menos em parte, de seu efeito anti-inflamatório no tecido articular.

Sabe-se que a prevalência das condições dolorosas da ATM é maior no sexo feminino do que no masculino (Carlsson & LeResche, 1995), até mesmo porque o nível de testosterona endógena, presente no sexo masculino, diminui o risco do mesmo desenvolver dor na ATM (Fischer et al., 2007). No entanto, essa condição dolorosa também afeta o sexo masculino, motivo pelo qual este trabalho inicial foi realizado em machos. Porém, em outro estudo realizado por nosso grupo e ainda não publicado, foi demonstrado que a ativação de receptores capa opióides na região da ATM também reduz significativamente o extravasamento plasmático em fêmeas.

O mecanismo pelo qual a ativação de receptores capa opióides na região da ATM reduz o extravasamento plasmático e a migração de neutrófilos ainda não é conhecido, e é o foco de atuais pesquisas coordenadas pela Profa. Cláudia Tambeli.

Finalmente, em uma perspectiva clinico - terapêutica, os resultados obtidos sugerem que o desenvolvimento de compostos opióides que atuem apenas em

receptores capa opióides periféricos é de grande relevância, uma vez que poderão contribuir também para o controle da dor inflamatória na articulação temporomandibular e possivelmente em outras articulações do corpo.

4.CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que a ativação de receptores capa opióides localizados na região da articulação temporomandibular reduz significativamente dois parâmetros importantes da inflamação temporomandibular, que são o extravasamento plasmático e a migração de neutrófilos, de uma forma dose-dependente e antagonista reversível. Esse efeito antiinflamatório, associado ao efeito antinociceptivo previamente observado, sugere que os receptores capa opióides periféricos são excelentes alvos para novas drogas designadas para o tratamento e controle das condições dolorosas inflamatórias da articulação temporomandibular.

5.REFERÊNCIAS*

Amarante LH, Duarte ID. The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. European journal of pharmacology.2002; 454:19-23.

Binder W, Machelska S, Moura S, Schmitt P J,Riviere J L, Stein C, Shafer M. Analgesic and antiinflammatory effects of two novel Kappa-opioid peptides. Anesthesiology.2001; 94:1034-1044.

Carlsson G, LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders.Seattle, WA 1995.

Dworkin SF, Huggins KH, LeResche L, Von Korff M, Howard J, Truelove E, Sommers E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. J Am Dent Assoc .1990; 120:273-281.

Fischer L, Clemente JT, Tambeli CH .The Protective Role of Testosterone in the Development of Temporomandibular Joint Pain. The Journal of Pain.2007; 8(5):437-442.

Garlicki J, Dorazil-Dudzik M, Wordliczek J, Przewlocka B. Effect of intraarticular tramadol administration in the rat model of knee joint inflammation. Pharmacol Rep .2006; 58:672-679.

Herb K, Cho S, Stiles MA. Temporomandibular joint pain and dysfunction. Current pain and headache reports.2006;10:408-414.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. Pharmacol Rev .2001; 53:597-652.

* De acordo com a norma da UNICAM/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Oeltjenbruns J, Schafer M. Peripheral opioid analgesia: clinical applications. Current pain & headache reports.2005; 9:36-44.

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

Stein C, Machelska H, Schafer M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. Zeitschrift fur Rheumatologie .2001; 60:416-424.

Stein C, Schafer M, Machelska H Attacking pain at its source: new perspectives

Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. N Eng L Med .1995;332:1685-1690.

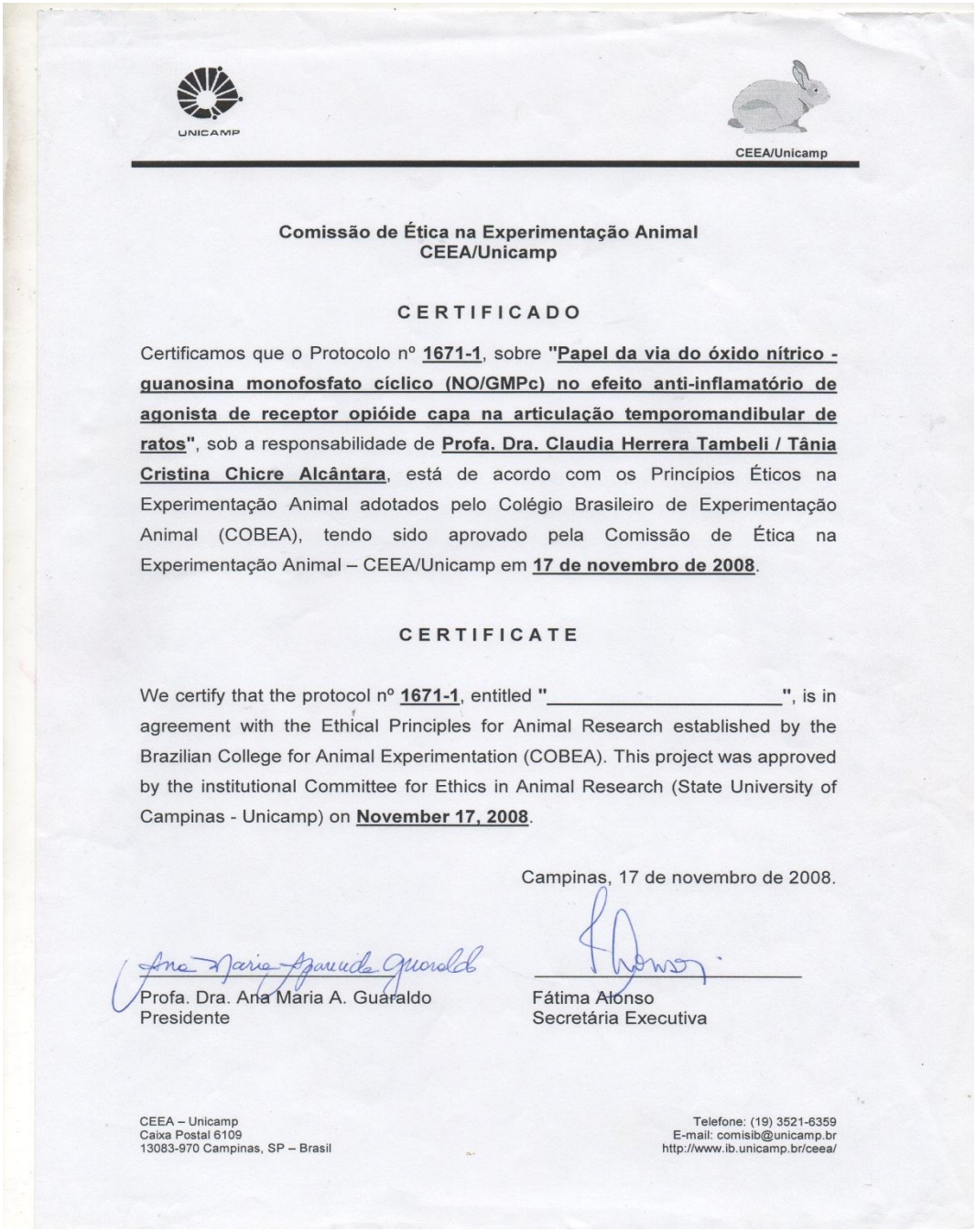
Walker JS, Chandler AK, Wilson JL, Binder W, Day RO. Effect of mu-opioids morphine and buprenorphine on the development of adjuvant arthritis in rats. Inflamm Res.1996; 45:557-563.

Walker JS, Scott C, Bush KA, Kirkham BW. Effects of the peripherally selective kappa-opioid asimadoline, on substance P and CGRP mRNA expression in chronic arthritis of the rat. Neuropeptides.2000;34:193-202.

Wilson JL, Nayanar V, Walker JS. The site of anti-arthritic action of the kappa-opioid, U-50, 488H, in adjuvant arthritis: importance of local administration. British journal of pharmacology.1996; 118:1754-1760.

6. ANEXOS

6.1 FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **1671-1**, sobre **"Papel da via do óxido nítrico - guanosina monofosfato cíclico (NO/GMPc) no efeito anti-inflamatório de agonista de receptor opióide capa na articulação temporomandibular de ratos"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli / Tânia Cristina Chicre Alcântara**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **17 de novembro de 2008**.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **1671-1**, entitled **"_____"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 17, 2008**.

Campinas, 17 de novembro de 2008.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

6.2 PROTOCOLOS

6.2.1 Extravasamento Plasmático

Sob anestesia geral, os animais foram submetidos à canulação da veia femoral esquerda. Imediatamente após a injeção na ATM, o corante azul de Evans foi injetado na veia femoral esquerda (Haas et al., 1992). Como esse corante se liga às proteínas plasmáticas extravasadas, a quantificação do extravasamento plasmático foi realizada através da mensuração da quantidade de corante extravasado no sítio da inflamação. Quarenta e cinco minutos após a injeção na ATM, os animais foram perfundidos com 60ml de solução salina. As amostras do tecido periarticular foram coletadas e armazenadas a -30ºC. Para a análise, as amostras do tecido (30 ± 2 mg) foram imersas individualmente em tubo de eppendorf contendo 1 ml de formamida. Após incubação por 24 horas a 60ºC, o corante que se ligou às proteínas plasmáticas extravasadas foi extraído do tecido para a solução de formamida. A quantidade de corante extravasado no tecido foi determinado em um leitor de microplacas (Anthos 2020, versão 1.2) que mediu a absorbância das diferentes soluções de formamida (v = 620 nm) simultaneamente. Os resultados dessas leituras foram posteriormente comparados com os resultados de leituras correspondentes a soluções com quantidades conhecidas do corante Azul de Evans (curva de calibração com 4µg, 2µg, 1µg, 0,5µg e 0,25µg de corante por ml de formamida). Finalmente, a quantidade de corante extravasada (µg) em cada solução foi dividida pelo peso (g) do respectivo tecido incubado. Dessa forma, o extravasamento foi calculado em micrograma de corante por grama de tecido dissecado.

6.2.2 Determinação da curva de neutrófilo

Após a injeção intraperitoneal de 15 ml de glicogênio de ostra a 1% os neutrófilos foram coletados e usados para obter a curva padrão de neutrófilos para o ensaio da mieloperoxidase. Quatro horas após injeção intraperitoneal de

glicogênio de ostra, os ratos foram sacrificados por uma overdose de halotano. Em uma capela de fluxo laminar, as células da cavidade peritoneal foram colhidas por lavagem da cavidade com 5 ml do meio RPMI-1640 (Sigma Chemicals, São Paulo, Brasil). As amostras de quatro animais foram agrupadas e armazenadas em um único tubo de falcon e o total de células foi contado na câmara de Newbauer com a ajuda de um contador de células e a contagem diferencial foi realizada pelo preparo de esfregaços em citocentrífuga, Citospin, os quais foram corados pela técnica de Rosenfeld e as células diferenciadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x). Após a coloração, os neutrófilos foram identificados e contados dentro desta população mista para calcular a porcentagem de neutrófilos a cada 100 células. Posteriormente à contagem das células, a amostra coletada do peritôneo foi centrifugada a 1200rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Adicionamos 1ml do meio RPMI-1640 e levamos à centrífuga (1200rpm,10 min a 4°C), novamente o sobrenadante foi descartado e adicionamos 2 ml de buffer 2 com H-TAB, agitamos manualmente e as alíquotas das amostras processadas foram armazenadas no freezer a -20°C.

6.2.3 Quantificação da migração leucocitária para ATM

A quantificação da migração leucocitária foi realizada pelo método da mieloperoxidase (MPO), segundo o protocolo descrito por Bradley et al. (1982).

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurofílicos das células polimorfonucleares (PMN), e está envolvida na formação de espécies reativas de oxigênio responsáveis pelo dano tecidual. Como esta enzima é liberada pelas células PMN ativadas, é um marcador da migração dessas células para o sítio de inflamação.

Quarenta e cinco minutos após a injeção na ATM, os animais foram perfundidos com 60 ml de solução salina. As amostras do tecido que circundam a ATM foram coletados e estocados a -70°C em 500µl de buffer 1 (Na_2EDTA 0,015M) em eppendorf de fundo chato. As amostras foram homogeneizadas com

auxilio do Politron® (13000rpm), seguido de centrifugação (15min, 3000rpm) a 4^0C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em solução de buffer 1 (500 µl), posteriormente foi acrescentado 500µl de solução de NaCl 0,2% gelado e após 30s colocamos mais 500µl de solução de NaCl a 1,6% com glicose a 5%gelada. Novamente as amostras foram cetrifugadas por 15min, 3000rpm a 4^0 C, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 500µl de buffer 2 ($NaPO_4$ 0,05M + H-TAB). Finalmente as amostras foram congeladas e descongeladas 3 vezes e centrifugadas por 15 min,10.000rpm a 4^0C.

Cinquenta microlitros do sobrenadante de cada amostra e de 0,08 M NaPO4 foram desprezadas em poços de uma microplaca de 96 poços. Vinte e cinco microlitros de 3,3`,3,3`-tetrametilbenzidina foi adicionado em cada poço,e a reação iniciada pela adição de 100µl de H_2O_2. Após 5 min a reação foi encerrada a partir da adição de 50µl de 4M de H_2SO_4. A densidade óptica foi lida a 450nm usando um Anthos 2020. Os resultados foram calculados através da comparação da densidade óptica do sobrenadante do tecido da ATM com a curva padrão de neutrófilos (>95% de pureza). Os resultados foram apresentados como número de neutrófilos × 10^6/mg tecido.