



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SILVIA ANDRÉIA TESSER VISCAINO

**EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS ISOENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO  
SINTASE NO SUBNÚCLEO CAUDAL DO NÚCLEO ESPINAL DO  
NERVO TRIGÊMEO DURANTE ARTRITE NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DO RATO**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
SILVIA ANDRÉIA TESSER VISCAINO  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Celular e Estrutural  
na área de Anatomia.

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Aparecido Casatti

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**V821e**

Viscaino, Silvia Andréia Tesser

Expressão e atividade das isoenzimas óxido nítrico sintase no subnúcleo caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo durante artrite na articulação temporomandibular do rato / Silvia Andréia Tesser Viscaino. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Cláudio Aparecido Casatti.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Artrite. 2. Óxido nítrico. 3. Articulação temporomandibular. I. Casatti, Cláudio Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Expression and activity of the nitric oxide synthase isoenzymes in the spinal trigeminal subnucleus caudalis following carrageenan-induced arthritis in the rat TMJ.

**Palavras-chave em inglês:** Arthritis, Nitric oxide, Temporomandibular joint.

**Área de concentração:** Anatomia.

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Cláudio Aparecido Casatti, Jair de Campos Soares, José Angelo Camilli, Antônio de Castro Rodrigues, José de Anchieta de Castro e Horta Júnior.

**Data da defesa:** 19/09/2005.

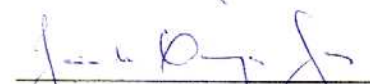
Campinas, 19 de setembro de 2005

**BANCA EXAMINADORA**

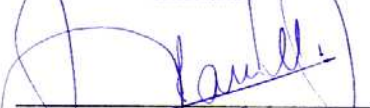
Prof.Dr. Cláudio Aparecido Casatti (Orientador)

  
Assinatura

Prof.Dr. Jair de Campos Soares

  
Assinatura

Prof.Dr. José Angelo Camilli

  
Assinatura

Prof.Dr. Antonio de Castro Rodrigues

  
Assinatura

Prof.Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Junior

  
Assinatura

Profa.Dra. Maria Julia Marques

  
Assinatura

Profa.Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

  
Assinatura

Prof.Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo

  
Assinatura

**À minha Família:** Claudete, Lídio, Alexandre, Jefferson, Juliana, Deane e José, que foram cúmplices e me deram Amor em todos os momentos.

Ao meu marido **Fábio** que há anos faz a balança da minha vida pender para o lado da coragem, da determinação e da felicidade.

Ao meu filho **Cauã** que completou a minha vida.

**Alexandre Denadai Souza**

A ele, o maior e mais sincero agradecimento  
ainda seriam pouco...

Resta-me, então, a promessa de que um dia, em seu  
nome, irei ajudar alguém como ele me ajudou.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

**Ao Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti**

**e**

**Ao Prof. Dr. Oisenyl José Tamega**

**Pela acolhida fraterna, orientação segura e competente, e  
principalmente, pela amizade e confiança depositada em mim.**

## AGRADECIMENTOS

- À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural – Área de Concentração Anatomia, do Instituto de Biologia da UNICAMP;
- À secretária do Programa de Pós-Graduação, Liliam Alves Senne Panagio, que com dedicação e presteza sempre atendeu nossas solicitações;
- Aos Funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu – UNESP e do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, em especial à Sandra Aparecida dos Santos, André Mattos Piedade, Ilda Araújo Teixeira e Lourdes Prando, que contribuíram em algum momento na execução do trabalho de Tese;
- A todos os professores do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu – UNESP e do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pela acolhida fraterna e pelos ensinamentos transmitidos durante o curso;

- Aos estagiários Daniela Sabino Batagello e Francisco Becker Júnior, por todo cuidado com os animais e pela atenção com que sempre me trataram;
- À amiga Ms. Eliandra Rizzi de Oliveira que sempre me acompanhou e que muito me ajudou;
- Ao Prof. Dr. Marcelo N. Muscará, a Dra. Simone Aparecida Teixeira, e aos alunos e estagiários do Laboratório de Farmacologia Bioquímica de Radicais Livres do Departamento de Farmacologia – ICB – USP, pela acolhida, pela ajuda e confiança depositada;
- Ao Prof. Dr. José Angelo Camilli pelo exemplo, amizade, apoio e incentivo que sempre influenciaram em minha formação pessoal e profissional;
- À amiga Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro por estar sempre disponível a ajudar, e acima de tudo, pela amizade sincera;
- Aos amigos, funcionários, professores e diretores do Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, pela ajuda, pela amizade e pela confiança depositada;

- À FAPESP que através do processo de número 99/07846-3 e subsídios provenientes do auxílio à pesquisa 99/12629-1 e 99/10236-2, como também a FUNDUNESP;

Por fim, a Deus que em pequenas intervenções, muitas vezes conhecida como sorte ou escolha certa, tem me auxiliado e me faz ser um pouco mais útil para esse mundo.

## SUMÁRIO

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                                      | <b>03</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                    | <b>05</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                  | <b>07</b> |
| <br>                                                                   |           |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                              | <b>09</b> |
| 1.1. Substratos neurais da articulação<br>temporomandibular .....      | 11        |
| 1.2. Óxido nítrico.....                                                | 13        |
| 1.3. Proto-oncogene c-fos como marcador<br>da atividade neuronal ..... | 19        |
| 1.4. A carragenina na indução da artrite.....                          | 20        |
| 1.5. Métodos de identificação da NOS .....                             | 21        |
| <br>                                                                   |           |
| <b>2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....</b>                             | <b>23</b> |
| <br>                                                                   |           |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                     | <b>27</b> |
| 3.1. Animais .....                                                     | 29        |
| 3.2. Grupos experimentais .....                                        | 30        |
| 3.3. Análise histológica .....                                         | 32        |
| 3.4. Análise Imunoistoquímica .....                                    | 32        |
| 3.5. Atividade enzimática da NOS ex-vivo .....                         | 37        |
| <br>                                                                   |           |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                             | <b>41</b> |
| 4.1. Análise histológica .....                                         | 43        |
| 4.2. Análise imunoistoquímica .....                                    | 44        |

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| 4.3. Atividade enzimática da NOS ex-vivo .....          | 47  |
| 5. DISCUSSÃO.....                                       | 49  |
| 5.1. Considerações técnicas.....                        | 51  |
| 5.2. Carragenina na articulação temporomandibular ..... | 55  |
| 5.3. Expressão e atividade enzimática da nNos.....      | 59  |
| 5.4. Expressão e atividade enzimática da iNOS.....      | 64  |
| 5.5. Nnos e Fos.....                                    | 67  |
| 6. CONCLUSÕES.....                                      | 69  |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                     | 73  |
| 8. FIGURAS E LEGENDAS DO ITEM RESULTADOS.....           | 93  |
| 9. APÊNDICE – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO .....    | 103 |

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

|                                  |                                                                                    |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AG:</b>                       | Aminoguanidina                                                                     |
| <b>AMPc:</b>                     | Adenosina monofosfato cíclica                                                      |
| <b>AMT:</b>                      | Aminotetrapoetina                                                                  |
| <b><math>\alpha</math>-AMPA:</b> | $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato                            |
| <b>ASL:</b>                      | Liase arginino succinato                                                           |
| <b>ASS:</b>                      | Sintase arginino succinato                                                         |
| <b>ATM:</b>                      | Articulação temporomandibular                                                      |
| <b>BH4:</b>                      | Tetrahidrobiopterina                                                               |
| <b>3-Br:</b>                     | 3-bromo-7-nitroindazole                                                            |
| <b>CaM:</b>                      | Calmodulina                                                                        |
| <b>CFA:</b>                      | Adjuvante completo de Freund                                                       |
| <b>CGRP:</b>                     | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina                                        |
| <b>EDTA:</b>                     | Ácido etileno diamino tetra acético                                                |
| <b>EGTA:</b>                     | Ácido etileno glicol- bis ( $\beta$ - amino etil éter) N, N, N', N'- tetra acético |
| <b>eNOS:</b>                     | NOS endotelial                                                                     |
| <b>FAD:</b>                      | Flavina adenina dinucleotídeo.                                                     |
| <b>FMN:</b>                      | Flavina adenina mononucleotídeo                                                    |
| <b>Fos-IR</b>                    | Neurônios imunorreativas a proteína Fos                                            |
| <b>GMPc:</b>                     | Monofosfato cíclico de guanosina                                                   |
| <b>KPBS:</b>                     | Tampão fosfato de potássio em salina                                               |
| <b>L-NAME:</b>                   | N-nitro-L-arginina metil éster                                                     |
| <b>L-NIO:</b>                    | L- $N^{\delta}$ -(1-iminoethyl)-ornitine                                           |

|                 |                                                          |
|-----------------|----------------------------------------------------------|
| <b>LN1:</b>     | L- <i>N</i> -(1iminoetil)-lisina                         |
| <b>LPS:</b>     | Lipopolissacarídeo                                       |
| <b>NADPH:</b>   | Forma reduzida da nicotinamida difosfato                 |
| <b>NADPH-d:</b> | NADPH-diaforase                                          |
| <b>NBT:</b>     | “Nitro blue tetrazolium”                                 |
| <b>NGF:</b>     | Fatores de crescimneto neuronal                          |
| <b>7-NI:</b>    | 7-nitroindazole                                          |
| <b>NMDA:</b>    | N-metil D-aspartato                                      |
| <b>Nnos:</b>    | NOS neuronal                                             |
| <b>NO:</b>      | Óxido nítrico                                            |
| <b>NOS:</b>     | Óxido nítrico sintase                                    |
| <b>PKG:</b>     | Proteína quinase dependente de GMPc                      |
| <b>PMSF:</b>    | Fluoreto de fenil metil sulfonila                        |
| <b>RT-PCR:</b>  | Reação de polimerase transcriptase reversa               |
| <b>RNAm:</b>    | RNA mensageiro                                           |
| <b>SP:</b>      | Substância P                                             |
| <b>Sp5C:</b>    | Subnúcleo caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo     |
| <b>Sp5I:</b>    | Subnúcleo interpolar do núcleo espinal do nervo trigêmeo |
| <b>Sp5O:</b>    | Subnúcleo oral do núcleo espinal do nervo trigêmeo       |
| <b>TRIM:</b>    | 1 (2-trifluorometilfenil) imidazole                      |
| <b>Tris:</b>    | Tris (hidróxi metil) amino etano                         |
| <b>VDCC:</b>    | Canal de $\text{Ca}^{+2}$ voltagem dependente            |

## RESUMO

O óxido nítrico é um radical livre com atividade moduladora no sistema nervoso central. Nos últimos anos, inúmeros trabalhos têm relacionado o óxido nítrico com o mecanismo central da hiperalgesia durante processos inflamatórios desencadeados em órgãos-alvo. No presente estudo, foi analisada, por métodos imunohistoquímicos e de ensaio radiométrico (mensurada pela capacidade de conversão da L-arginina em L-citrulina triciadas), uma possível modulação das isoenzimas óxido nítrico sintases no subnúcleo caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo (Sp5C), durante artrite induzida por carragenina na articulação temporomandibular de rato. A análise imunohistoquímica revelou que o número de perfis neuronais nucleados que exibem imunorreatividade à enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) é elevado nas lâminas superficiais do Sp5C e aumentou bilateralmente nos grupos com artrite aguda, crônica e crônica-agudizada quando comparado com seus respectivos grupos pseudo-operados, entretanto sem diferenças estatisticamente significantes. A análise imunohistoquímica restrita à população de neurônios nNOS ativados durante a artrite, detectados pela expressão da proteína Fos, também não revelou diferenças estatísticas. A expressão da isoenzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) não foi detectada no Sp5C. A atividade da isoenzima NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente aumentou significativamente na fase crônica quando comparada com o seu respectivo grupo pseudo-operado (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e *post-test* de Dunns,  $P < 0,01$ ), com o grupo da fase artrite aguda ( $P < 0,01$ ) e com o grupo da fase crônica-agudizada ( $P < 0,05$ ). A atividade da isoenzima NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -

independente (iNOS) foi insignificante e permaneceu inalterada. Em síntese, os neurônios imunorreativos a nNOS posicionados nas lâminas superficiais do Sp5C do rato devem exercer um importante papel no processamento nociceptivo, em condições de normalidade. Na evolução da artrite, a alteração na atividade da NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente demonstra uma possível influência do óxido nítrico no mecanismo nociceptivo central do Sp5C durante injúrias inflamatórias crônicas que acometem a articulação temporomandibular do rato.

## ABSTRACT

Nitric oxide has been implicated in hyperalgesia modulation accompanying peripheral inflammation. In this study, we analyzed the effects of carrageenan-induced arthritis (CIA) in the unilateral temporomandibular joint (TMJ) on immunoreactivity and activity of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the caudal part of the rat spinal trigeminal nucleus (Sp5C) during the acute, chronic and chronic-active phases. In addition, double immunohistochemistry was used to verify Fos induction in nNOS neurons. The number of nNOS-like immunoreactive (nNOS-LI) neurons in the Sp5C was elevated and we observed a slight bilaterally increase in numbers of these neurons in the acute, chronic and chronic-active phases of CIA when compared to the respective sham groups, although the difference was less than statistically significant. A discrete percentage of nNOS-LI neurons expressed Fos immunoreactivity in all experimental groups. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity in the ipsilateral Sp5C was significantly higher ( $P<0.05$ ) in the chronic phase than in the acute phase, chronic-active phase or in the sham group animals. In conclusion, since there was a large population of nNOS-LI neurons in the rat Sp5C, nitric oxide seems to play an important role in nociceptive processing under normal conditions. Furthermore, changes in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity in chronic arthritis show that NOS may play a role in the Sp5C central nociceptive mechanism during long-term TMJ arthritis.

## **1. INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular é uma articulação sinovial bilateral (bicondilar), que permite amplos movimentos entre a mandíbula e a base do crânio. Essa articulação, associada aos músculos adjacentes, freqüentemente mostra alterações morfo-funcionais denominadas de desordens temporomandibulares. As principais causas das desordens temporomandibulares são doenças infecciosas, inflamatórias, deficiências vitamínicas, alterações hormonais, congênitas, má oclusão dentária e estresse emocional. As desordens temporomandibulares comumente deflagram sintomas dolorosos e conseqüências secundárias tais como hiperalgesia secundária, dor reflexa e alodinia.

## ***1.1. Substratos neurais da articulação temporomandibular***

A articulação temporomandibular é uma das regiões orofaciais que mostra uma densa inervação, representada por fibras sensitivas somáticas gerais e pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático). Os pericários de origem das fibras simpáticas pós-ganglionares estão localizados, principalmente, no gânglio cervical superior, enquanto que os pericários das fibras parassimpáticas estão alojados no gânglio ótico. As fibras nervosas sensitivas são pertencentes ao grupo C e A $\delta$  (Kido *et al.*, 1995), que correspondem respectivamente às fibras nervosas nociceptivas amielínicas ( $\leq 1 \mu\text{m}$  de diâmetro) e mielínicas (1 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro) nociceptivas. Essa inervação sensorial é

proveniente de pericários alojados principalmente no gânglio trigeminal e, em menor número, nos gânglios sensitivos da raiz dorsal de C2 a C5 (Widenfalk e Wiberg, 1990; Uddman et al., 1998; Casatti *et al.*, 1999). Os prolongamentos nervosos centrais dos neurônios alojados no gânglio trigeminal penetram no tronco encefálico na porção lateral da ponte e estabelecem conexões com vários núcleos do tronco encefálico entre eles o núcleo espinal do nervo trigêmeo. Esse núcleo é dividido funcionalmente e anatomicamente em três subnúcleos: subnúcleo oral (Sp5O), que transporta informações nociceptivas reflexa da cavidade oral e nasal, como também informações táteis leve da face e cavidade oral; subnúcleo interpolar (Sp5I), que retransmite impulsos táteis para o tálamo, cerebelo e medula espinal; subnúcleo caudal (Sp5C), que é primariamente responsável pela retransmissão orofacial de informações nociceptivas não-reflexas (Dubner e Bennett, 1983). O subnúcleo caudal (Sp5C) anatomicamente é contínuo com a substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinal, e sua morfologia laminar é homóloga às lâminas da camada superficial do corno dorsal (Gobel, 1975). Embora o Sp5I e o Sp5O tenham sido também implicados na nocicepção, o Sp5C é considerado como a principal estação sináptica do núcleo espinal do nervo trigêmeo envolvido no mecanismo da nocicepção. Em particular, as lâminas superficiais (I e II) do Sp5C estão envolvidas no processamento nociceptivo, enquanto que as lâminas III e IV possuem funções comparáveis aos subnúcleos interpolar e oral (Sessle, 1987). Estudos imunohistoquímicos empregando a expressão do proto oncogene *c-fos*, como marcador de atividade neuronal (Harris, 1998), revelaram que a região ventrolateral na transição entre o Sp5C e Sp5I, as lâminas I e II da porção intermediária do Sp5C, assim como a

região de transição entre este e o segundo segmento cervical da medula espinal (C2) são as principais regiões do sistema trigeminal responsáveis pelo processamento da nocicepção advinda de estímulos aplicados na ATM (Hathaway *et al.*, 1995; Bereiter e Bereiter, 2000).

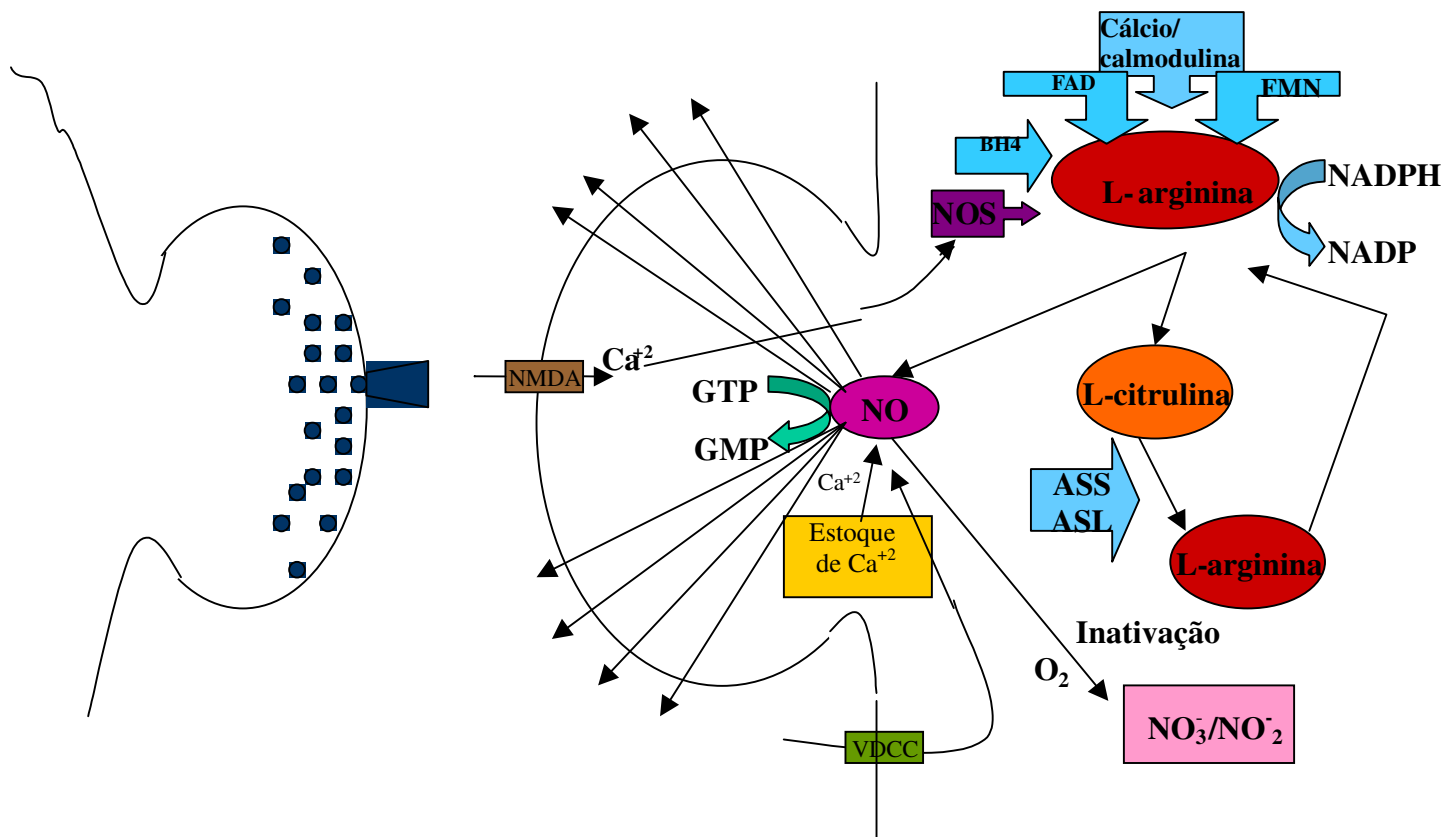
## **1.2. Óxido nítrico**

Alguns estudos têm demonstrado que o óxido nítrico, um radical livre, é um importante neuromodulador do processamento nociceptivo no Sp5C e no corno dorsal da medula espinal (Dhorn *et al.*, 1994; Yeo, 2002). No sistema trigeminal, o Sp5C é a região mais densamente ocupada por neurônios imunorreativos à enzima óxido nítrico sintase neuronal (neurônios nNOS), responsável pela síntese do óxido nítrico de origem neuronal (Dohrn *et al.*, 1994). Assim sendo, existe a possibilidade do óxido nítrico estar relacionado com a modulação da dor no Sp5C, desencadeada por alterações morfo-funcionais na articulação temporomandibular.

A síntese do óxido nítrico (nitric oxide, NO) (Figura 1) ocorre a partir da conversão do substrato L-arginina, por meio da enzima óxido nítrico sintase (“nitric oxide synthase” – NOS) resultando na formação do NO (meia vida de 5 a 10 segundos) e L-citrulina. A atividade da enzima NOS depende de alguns cofatores, tais como: 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (“tetrahidrobiopterin”, BH4); flavina-adenina-dinucleotídeo (“flavin adenine dinucleotide”, FAD), flavina-mononucleotídeo (“flavine mononucleotide”, FMN), incluindo a redução do cofator nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (“nicotinamide adenine dinucleotide phosphate” - NADPH → NADP) e de proteínas ligantes de cálcio (cálcio/calmodulina,

“calmodulin”, CaM), (Knowles *et al.*, 1989; Bredt e Snyder, 1990; Förstermann *et al.*, 1991; Lowenstein *et al.*, 1992). A NOS necessita da NADPH reduzida para ser ativa e possui atividade NADPH-diaforase (NADPH-d) (Norris *et al.*, 1995).

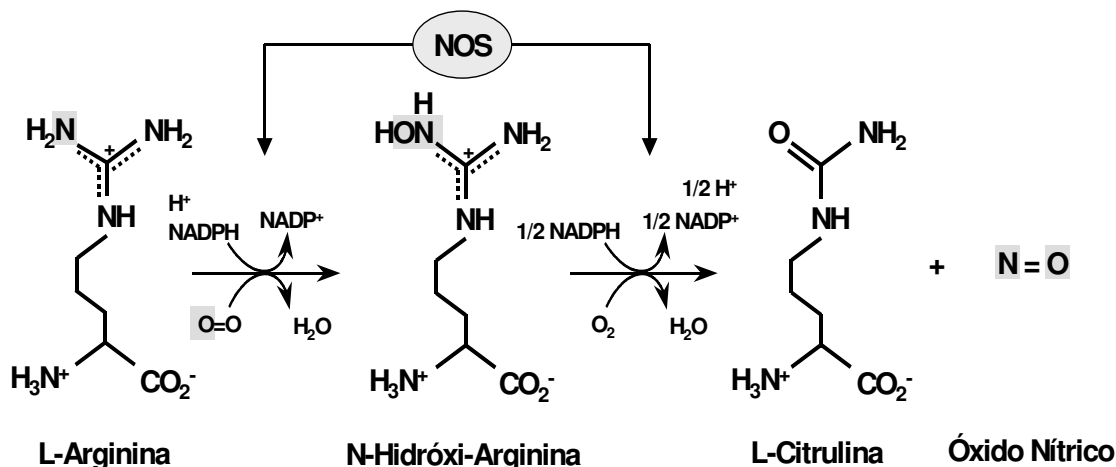
O óxido nítrico é produzido pela reação de oxidação de um dos nitrogênios do grupo guanidino terminal da L-arginina pelo oxigênio molecular (Palmer *et al.*, 1988a, b; Leone *et al.*, 1991). Essa síntese do NO ocorre em duas etapas: na primeira fase da reação, o aminoácido L-arginina é oxidado a N<sup>G</sup>-hidróxi L-arginina pela transferência de dois elétrons (Stuher *et al.*, 1991) (Figura 2). Nessa reação, um equivalente eletrônico é transferido do NADPH para a FAD, que reduz o FMN. Essa reação é acelerada por BH<sub>4</sub> e requer CaM (Stuher *et al.*, 1991; White e Marletta, 1992; Klatt *et al.*, 1993). Na segunda etapa, ocorre a oxidação da N<sup>G</sup>-hidróxi L-arginina a NO e L-citrulina pela transferência de mais três elétrons (Figura 2).



Elemento pré-sináptico glutaminérgico

Elemento pós-sináptico, imunorreativo a nNOS no Sp5C

Figura 1: Esquema da via metabólica para a produção do NO. À esquerda há uma terminação nervosa proveniente do gânglio trigeminal que termina no subnúcleo caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo e, à direita, um neurônio de segunda ordem no referido subnúcleo. A síntese do NO ocorre pela conversão de L-arginina, através da NOS que, por sua vez, depende de cofatores como a nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (BH4), flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), flavina-mononucleotídeo (FMN) e de proteínas ligantes de cálcio (calmodulina) para tornar-se ativa. A conversão do substrato L-arginina resulta na formação de NO e L-citrulina. A L-citrulina pode se difundir na célula ou ser convertida em L-arginina, pela ação das enzimas sintase arginino succinato (ASS) e liase arginino succinato (ASL). O NO parece agir sobre os receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), modificando o fluxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$  para o interior da célula, necessário para ativação da NOS. Além dessa fonte, há estoque de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e o cálcio também pode alcançar o meio intracelular através do receptor VDCC (canal de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem dependente). O NO produzido se difunde livremente pelas membranas celulares e age nos elementos pré e pós-sinápticos. Nos elementos pós-sinápticos, ativa o sistema guanil ciclase, elevando os níveis de GMP cíclico (guanosina 3', 5'- monofosfato) e com isso, resulta em vários efeitos biológicos. O NO que não exerceu atividade sinalizadora é inativado através da conjugação com o oxigênio, resultando em ânions nitritos e nitratos.



**Figura 2.** Representação esquemática das reações catalisadas pelas NOS (esquema modificado de Dawson e Snyder, 1994).

A NOS apresenta as seguintes isoformas, às quais são nomeadas de acordo com a ordem de isolamento e purificação: a) neuronal – nNOS (tipo I); b) induzível – iNOS (tipo II ou macrofágica); c) endotelial – eNOS (tipo III) (Förstermann *et al.*, 1991; Lowenstein *et al.*, 1992; Sessa, 1994; Pollock *et al.*, 1995). Duas delas são consideradas constitutivas, ou seja, presentes em condições fisiológicas e dependentes do  $\text{Ca}^{2+}$ , a nNOS, expressa no sistema nervoso central e periférico (Knowles e Moncada, 1994; Moncada e Higgs, 1995; Moncada *et al.*, 1997) e a eNOS, inicialmente detectada nas células endoteliais (Pollock *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1991). A iNOS induzível, expressa em resposta a processos inflamatórios causados por algumas citocinas ou por lipopolissacarídeos (LPS, presente na parede celular de bactérias gram-negativas), é independente do  $\text{Ca}^{2+}$  e está presente em macrófagos, hepatócitos, neutrófilos e nas células musculares lisas (Marín e Rodríguez-Martínez, 1997). Algumas variáveis das isoformas da nNOS e iNOS têm sido descritas, mas são

necessários estudos para melhor caracterização estrutural, funcional e quanto à distribuição no sistema nervoso central (Wang *et al.*, 1999).

Vários fatos têm comprovado que os neurônios nNOS são pós-sinápticos em relação aos neurônios sensoriais primários glutaminérgicos e dependem da ativação de seus receptores de glutamato associados aos canais de cálcio (ionotrópicos). Entre eles se destaca o de N-metil-D-aspartato (NMDA) e, em menor efetividade, os de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato ( $\alpha$ -AMPA) e os subtipos de kainato (Gally *et al.*, 1990; Garthwaite, 1991). Esses receptores ativados permitem um influxo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  no neurônio, o qual estimula a atividade da nNOS. Em seguida, o NO gerado se difunde por aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  (Gally *et al.*, 1990), atuando nos neurônios e/ou células da glia, estimulando principalmente a formação e acúmulo de 5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Esse mensageiro intracelular, por sua vez, pode agir diretamente em canais iônicos, em proteínas cinases dependentes do GMPc (PKG) e em fosfodiesterases, resultando no aumento ou diminuição dos níveis de 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), entre outros mecanismos. A interação do NO nesses alvos tem como principal consequência a modulação do metabolismo da célula neuronal.

Recentemente foi demonstrado que a nNOS, apesar de ser constitutiva, apresenta elevada plasticidade, podendo ser estimulada ou inibida. Estímulos, tais como deaferenciação, tratamento com fatores de crescimento neuronal ("neural growth factor" – NGF), estímulos nociceptivos, entre outros, alteram a expressão da nNOS e iNOS no sistema nervoso central (Blottner *et al.*, 1995; Whittle *et al.*,

1995; Krukoff e Khalili, 1997; Zhu e Herbert, 1997; Rodella *et al.*, 1998). A indução da artrite na articulação do joelho do rato utilizando adjuvante de Freund completo (“complete Freund’s adjuvant”, CFA) resultou em um aumento da imunoreatividade da nNOS e iNOS na medula espinal, sendo a iNOS limitada as células ependimárias ao redor do canal central (Lam *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998). A indução de inflamação periférica através de injeções na pata do rato e do camundongo com formalina, CFA, capsaicina e zimozan também tem aumentado a imunoreatividade para a nNOS no corno dorsal da medula espinal (Lam *et al.*, 1996; Yonehara *et al.*, 1997; Maihöfner *et al.*, 2000). Por outro lado, há estudos que relatam uma diminuição dos neurônios imunorreativos a nNOS na medula espinal de ovelhas com mastite crônica espontânea (Dolan *et al.*, 2000). Finalmente, também tem sido demonstrada ausência de diferenças estatísticas em neurônios imunorreativos a nNOS na medula espinal depois de inflamação induzida por carragenina e CFA na pata traseira de rato (Traub *et al.*, 1994; Goff *et al.*, 1998). Há poucos trabalhos enfocando a modulação da nNOS no sistema trigeminal durante processos inflamatórios induzidos ou não na região orofacial (Yonehara *et al.*, 1997; 1999). No núcleo do espinal do nervo trigêmeo, foi observado um aumento da imunoreatividade da nNOS após lesão do nervo alveolar inferior e injúria dental (Yonehara *et al.*, 2002; 2003).

### **1.3. Proto-oncogene *c-fos* como marcador da atividade neuronal**

O proto-oncogene *c-fos* (gene de expressão imediata “immediate early gene” - IEG) é um homólogo, em mamíferos, do oncogene *v-fos* encontrado em sarcoma osteogênico infectado com vírus. O *c-fos* codifica uma fosfoproteína nuclear denominada Fos, que apresenta sítio de ligação no DNA (Sambucetti e Curran, 1986). A proteína Fos atua como um terceiro mensageiro envolvido na transdução de sinais extracelulares de curta duração em alterações em longo prazo no metabolismo celular, através da regulação da expressão de genes específicos (Curran e Morgan, 1985). A expressão da Fos tem sido largamente empregada para mensurar a atividade neuronal (Bullitt, 1989; Harris, 1998), desencadeada principalmente por estímulos nociceptivos (Menétrey *et al.*, 1989). A tradução e a síntese da proteína Fos pode ser detectada logo após a aplicação do estímulo apropriado (Greenberg *et al.*, 1986). A detecção da proteína Fos nos cortes histológicos do tecido nervoso se faz por métodos imunohistoquímicos, sendo que o número de neurônios exibindo imunorreatividade à proteína Fos (Fos-IR) e a intensidade dessa marcação estão relacionados à duração, intensidade do estímulo e ao tempo decorrido entre o início da estimulação e o sacrifício do animal (Takemura *et al.*, 2000).

O emprego da dupla marcação imunohistoquímica para evidenciar nNOS e a proteína Fos revelou que os neurônios nNOS no sistema trigeminal e na medula espinal não foram consideravelmente ativados quando a formalina e o óleo de mostarda foram aplicados na face ou na pata do rato, respectivamente (Yeo, 1997; Nazli *et al.*, 2001).

#### **1.4. A carragenina na indução da artrite**

Várias substâncias têm sido empregadas para induzir processos inflamatórios tanto na articulação como em outros órgãos periféricos, mencionados anteriormente. A carragenina tem sido demonstrada como uma substância eficiente para indução de inflamação na articulação, caracterizada inicialmente por uma inflamação aguda até 24 horas, seguida por inflamação crônica que persiste por mais de oito semanas (Radhakrishnan *et al.*, 2003). A carragenina (lambda carragenina - tipo IV) é um polissacarídeo hidrossolúvel derivado de algas marinhas (*Gigartina aciculaire* e *Gigartina pistillata*), que causa inflamação e hiperalgesia quando injetada, mas não durante a aplicação tópica ou na ingestão de quantidade razoável (Nicklin e Miller, 1984). O mecanismo da inflamação aguda induzida pela carragenina e sua subsequente hiperalgesia tem sido estudado extensivamente (Schaible e Grubb, 1993). O processo inflamatório agudo é caracterizado pelo acúmulo de neutrófilos no espaço perivascular (Diehl *et al.*, 1988), que é acompanhado pela liberação local de glutamato, prostaglandina, histamina e serotonina (Neil *et al.*, 1987; Guilbaud *et al.*, 1989; Nantel *et al.*, 1999; Lawand *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2002). Essas substâncias nociceptivas diminuem o limiar das terminações nervosas nociceptivas induzindo a hiperalgesia primária (Schaible e Schmidt, 1985, 1988; Hargreaves *et al.*, 1988) e também resultam em alterações neuroplásticas no sistema nervoso central que culminam na hiperalgesia secundária (Sluka, 2002). A administração intraplantar de carragenina na pata do rato foi capaz de induzir aumento da produção do óxido

nítrico no corno da medula espinal, detectado por um método voltimétrico (Rivot *et al.*, 2002). O emprego de inibidores da NOS tem revertido ou atenuado os efeitos da carragenina aplicada na pata do rato e do camundongo, tais como hiperalgesia secundária mecânica e térmica (Meller *et al.*, 1994; Lawand *et al.*, 1997; Handy e Moore, 1998; Osborne e Coderre, 1999).

### **1.5. Métodos de identificação da NOS**

Existem alguns métodos laboratoriais para verificar a presença de neurônios capazes de sintetizar o óxido nítrico. Um dos primeiros métodos empregados foi o da nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase (“nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase”, NADPH-d), que consistia em revelar a atividade da NADPH presente na nNOS através de reação histoquímica, utilizando o cromógeno nitroblue tetrazolium (NBT) e o cofator  $\beta$ -NADPH redutase. Entretanto, há algumas áreas do sistema nervoso central, como exemplo na medula espinal de ratos, em que o número de neurônios que estão expressando NADPH-d é maior que aqueles que contêm a nNOS (Lukácova *et al.*, 1999). O método imunohistoquímico, empregando anticorpo anti-nNOS, tem sido um dos métodos mais utilizados e específico para identificação dos neurônios que produzem o NO. Dentre outros métodos, o “Northern blot” e “Southern Blot”, os quais evidenciam a presença e intensidade do RNAm e DNA da nNOS, respectivamente, além do “Western blot”, que analisa a presença da proteína nNOS e o emprego do RT-PCR para avaliar a expressão gênica da nNOS,

também têm sido utilizados (Chakder *et al.*, 1997; Kovacs *et al.*, 2001). Por outro lado, recentemente a análise do comportamento funcional da NOS, mensurada pelo método do ensaio radiométrico que analisa a eficiência da conversão da L-arginina em L-citrulina triciadas, tem fornecido informações relevantes e complementares aos demais métodos (Förstermann *et al.*, 1990; Lukáková *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2002). Interessantes observações têm advindo quando se utilizam e são comparados os métodos imunohistoquímico e da atividade enzimática, como exemplo, a quantificação dos neurônios imunorreativos a nNOS e a atividade catalítica da nNOS, medida pelo ensaio radiométrico, empregadas para avaliar a alteração da NOS no cerebelo durante o envelhecimento (Yu *et al.*, 2000). A comparação dos resultados obtidos através desses métodos mostrou que quando ocorria uma queda no número de neurônios nNOS, paralelamente, a atividade catalítica da nNOS aumentava significativamente, evidenciando uma resposta compensatória da atividade enzimática da nNOS nesse modelo experimental (Yu *et al.*, 2000).

## **2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS**

## 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Tendo em vista que:

- ✓ A articulação temporomandibular é um dos principais territórios orofaciais que são acometidos por processos inflamatórios associados com nocicepção e seus efeitos secundários, tais como hiperalgesia secundária, dor reflexa e alodinia;
- ✓ O subnúcleo caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo (Sp5C) é uma das principais estações sinápticas para o qual convergem informações nociceptivas do território orofacial, inclusive da articulação temporomandibular. Além disso, tal subnúcleo aloja uma substancial população de neurônios que produzem o NO;
- ✓ As isoenzimas NOS responsáveis pela síntese do NO, em particular a nNOS e a iNOS, têm sido correlacionadas com o processamento nociceptivo central em condições de normalidade e durante processos inflamatórios;
- ✓ A proteína Fos é extremamente utilizada como marcador da atividade neuronal, podendo ser associada com a identificação simultânea de neuromediadores em estudos de dupla marcação imunohistoquímica, como exemplo a nNOS e Fos;
- ✓ A carragenina é uma substância amplamente utilizada como irritante tecidual, também empregada como indutor de artrite localizada;

A proposição do presente trabalho foi desenvolver um extensivo estudo para verificar uma possível modulação na expressão e atividade das nNOS e iNOS no Sp5C durante a evolução da artrite induzida pela carragenina na articulação

temporomandibular do rato. Para tais propósitos, foram empregadas as seguintes metodologias:

a) análise imunohistoquímica da nNOS e iNOS no Sp5C durante indução de artrite, na articulação temporomandibular do rato, pela carragenina nas fases aguda, crônica e crônica-agudizada;

b) análise imunohistoquímica simultânea da nNOS e Fos no Sp5C durante indução de artrite, na articulação temporomandibular do rato, pela carragenina nas fases aguda, crônica e crônica-agudizada;

c) análise funcional das enzimas NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente e NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -independente no Sp5C durante indução de artrite, na articulação temporomandibular do rato, pela carragenina nas fases aguda, crônica e crônica-agudizada.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

No presente trabalho, foram utilizados 200 ratos (Wistar), machos adulto-jovens, com peso corporal médio de 300 g, provenientes do Biotério Central de Botucatu – Unesp. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura e umidade controladas ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $50\pm 10\%$ , respectivamente), alimentação constituída de ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações do “*Guide to the care and use of experimental animals of the Canadian Council on Animal Care*”. Os protocolos experimentais foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA, do Instituto de Biociências – UNESP – Câmpus de Botucatu e Araçatuba. Todos os animais foram anestesiados com injeções de hidrato de cloral (0,4 g/kg i.p., Carlo Erba, Rodano, Italia) para os procedimentos da indução da artrite e pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p., Hypnol, Cristália, Itapira - SP, Brasil) para o sacrifício por perfusão, de acordo com as normas de anestesia para experimentação animal.

### **3.2. Grupos experimentais**

Neste estudo foram analisadas três diferentes fases da artrite induzida por carragenina: a) fase aguda (24 horas); b) fase crônica (15 dias); c) fase crônica-agudizada (15 dias/ 24 horas). A indução da artrite foi obtida pela deposição unilateral de 5 µl de carragenina na forma de gel ( $\lambda$ -carrageenan, type IV, C3889, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 10% diluída em solução fisiológica estéril. A deposição da carragenina foi conseguida por injeção transcutânea de agulha gengival (30G curta, Becton Dickinson, BD, Juiz de Fora, MG, Brasil) acoplada a uma seringa Hamilton com capacidade máxima de 10 µl (Hamilton Becton Dickinson, BD, USA). Para cada fase da artrite foi delineado um grupo pseudo-operado, um grupo controle anestésico, além de um único grupo controle total para todas as fases. Desta forma, o presente estudo constou de dez grupos experimentais, descritos a seguir:

**Grupo artrite – Fase aguda, 24 horas (n=5):** os animais foram submetidos a injeção intra-articular de 5 µl de carragenina e perfundidos transcardiacamente 24 horas após.

**Grupo pseudo-operado, 24 horas (n=5):** os animais foram submetidos a injeção intra-articular de 5 µl de solução fisiológica estéril, pH 7,2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e perfundidos transcardiacamente 24 horas após.

**Grupo controle anestésico, 24 horas (n=5):** os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e submetidos à perfusão transcardíaca, 24 horas após.

**Grupo artrite – Fase crônica, 15 dias (n=5):** os animais foram submetidos a injeção intra-articular de 5 µl de carragenina e perfundidos transcardiacamente 15 dias após.

**Grupo pseudo-operado, 15 dias (n=5):** os animais foram submetidos a injeção intra-articular de 5 µl de solução fisiológica estéril, pH 7,2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e perfundidos transcardiacamente 15 dias após.

**Grupo controle anestésico, 15 dias (n=5):** os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e submetidos à perfusão transcardíaca 15 dias após.

**Grupo artrite, fase crônica-agudizada, 15 dias/ 24 horas (n=5):** os animais foram submetidos a injeção intra-articular de 5 µl de carragenina e após 15 dias, novamente submetidos à deposição de carragenina e perfundidos transcardiacamente 24 horas após.

**Grupo pseudo-operado, 15 dias/24 horas (n=5):** os animais foram submetidos a injeção intra-articular de 5 µl de solução fisiológica estéril, pH 7,2, após 15 dias novamente submetidos à deposição de solução fisiológica e perfundidos transcardiacamente 24 horas após.

**Grupo controle anestésico, 15 dias/24 horas (n=5):** os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e após 15 dias novamente submetidos a anestesia e perfundidos transcardiacamente 24 horas após.

**Grupo controle total (n=5):** os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico para a perfusão transcardíaca.

### **3.3. Análise histológica**

Vinte ratos (dois ratos por grupo) foram anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg i.p.) e sacrificados por perfusão transcardíaca, via aorta, com solução salina (cerca de 100 ml), seguida de 700 ml de solução fixadora de paraformaldeído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 4% em tampão tetraborato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 0,1M em pH 9,5, a 4°C. As articulações temporomandibulares ipsilateral e contralateral foram coletadas, pós-fixadas na mesma solução fixadora a 4°C, por 24 horas e descalcificadas em solução EDTA 10% (ácido etileno-diamino-tetra-acético, E9884; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato de sódio (PB) 0,1M, pH 7,4 a 4°C, sob agitação, durante vinte dias de acordo com a rotina laboratorial. Em prosseguimento, as articulações foram submetidas ao processamento histológico de rotina em parafina e cortes com 5 µm de espessura foram corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (H.E.). Os cortes histológicos foram examinados em microscópio de luz para caracterização histopatológica qualitativa.

### **3.4. Análise Imunohistoquímica**

Para esta análise foram utilizados 50 animais divididos nos dez grupos experimentais previamente descritos.

### **3.4.1. *Perfusão transcardíaca e obtenção dos cortes histológicos***

Os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca no período da manhã das 9h às 11h, pois neste intervalo há menor oscilação da atividade e concentração da proteína NOS (Ayers et al., 1996). Inicialmente, foram perfundidos com solução salina (100 ml), seguida de 700 ml de solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão tetraborato de sódio, 0,1M, pH 9,5, a 4°C. O tronco encefálico de cada animal foi dissecado com o auxílio de um microscópio cirúrgico estereoscópico (MC-A199 – D. F. Vasconcellos S/A, São Paulo, Brasil) e crioprotetidos em solução de tampão fosfato de potássio em salina (KPBS) 0,1M, pH 7,4, acrescido de 30% de sacarose, durante período de 12 horas, a 4°C. Em seguida, o tronco encefálico, situado no segmento de -13,8 mm a -15,3 mm a partir do ponto craniométrico bregma, foi crio-seccionado com 16 µm de espessura em micrótomo de congelação (Leica SM2000R, Nussloch, Alemanha). Todos os cortes histológicos foram coletados em placas de cultura (quatro séries de seis poços) com solução anti-congelante e armazenados em freezer a -20°C. Duas séries de cortes histológicos foram separadas para o processamento imunohistoquímico, uma para identificação da nNOS e outra para dupla marcação imunohistoquímica para nNOS/Fos. Uma terceira série foi submetida à coloração de Nissl, para referência citoarquitetônica.

### **3.4.2. *Processamento imunohistoquímico***

Os cortes histológicos foram submetidos às seguintes etapas de incubação, a 60 rpm: a) duas lavagens de 10 minutos cada em KPBS, 0.02 M, pH 7,4, a temperatura ambiente; b) inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 0,3%, durante 30 minutos; c) duas lavagens de 10 minutos cada em KPBS, a temperatura ambiente; d) bloqueio da marcação inespecífica com solução de incubação constituída de KPBS, triton X-100 (T9284, Sigma) e 3% de soro normal de cabra (S-100, Vector Laboratories, CA, USA), sob agitação, a 4°C, durante 12 horas; e) incubação durante 48 horas com anticorpo primário policlonal anti-nNOS (1:300, epitopo corresponde a seqüência 1414-1429 da nNOS do rato, k-20/sc 1025, Santa Cruz Biotechnology., San Diego, CA, USA) diluído na solução de incubação descrita, sob agitação a 4°C; f) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; g) incubação com anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de coelho gerado em cabra (1:500, BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluído na solução de incubação durante 60 minutos a temperatura ambiente; h) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; i) incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (1:166, PK-6100, Vecstain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 60 minutos a temperatura ambiente; j) duas lavagens de 10 minutos em Tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,6, a temperatura ambiente; l) revelação em solução contendo 10 ml de Tris-HCl, 5 mg de diaminobenzidina (DAB, D8001, Sigma) e 3 µl de peróxido de hidrogênio a 33%; m) duas lavagens de 10 minutos cada em KPBS. Em prosseguimento, os cortes histológicos foram coletados em lâminas de

vidro gelatinizadas, desidratadas, deslipidificadas e montados com meio de montagem (PermOUNT, Fisher Scientific, CA, USA) e lâminas de vidro.

Uma série de cortes histológicos foi submetida à dupla marcação imunohistoquímica para identificação das proteínas Fos e nNOS. Para tal propósito, os cortes histológicos foram incubados primeiramente com solução contendo anticorpo primário policlonal anti-Fos (1:10.000, epitopo corresponde a sequência 4-17 dos aminoácidos do c-fos humano, Oncogene Res. Products, San Diego, CA, USA) por 48 horas a 4°C, anticorpo secundário biotinizado anti-IgG de coelho obtido em cabra (1:1.000, BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), por 90 minutos a temperatura ambiente e incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (1:500, PK-6100, Vecstain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 60 minutos a temperatura ambiente. A revelação foi obtida em uma solução constituída de 20 mg de  $\beta$ -D-glicose (Sigma), 4mg de cloreto de amônio (Sigma), 5 mg DAB e 0,15 mg de glicose oxidase (Sigma), diluídos em 5 ml de sulfato de níquel amônio (Sigma) e 5 ml de KPBS, resultando na marcação negra do núcleo neuronal. Em sequência, os mesmos cortes histológicos foram submetidos a incubação com anticorpo primário policlonal anti-nNOS (1:300) e processados como descrito no parágrafo anterior, resultando em marcação castanha do citoplasma. Finalmente os cortes histológicos foram coletados em lâminas de vidro gelatinizadas, desidratadas, deslipidificadas e montados com meio de montagem (PermOUNT, Fisher Scientific, CA, USA) e lâminas de vidro. Em paralelo a cada reação de imunoperoxidase, foi realizado

controle da reação imunohistoquímica pela omissão dos referidos anticorpos primários.

Alguns cortes histológicos (dois poços de uma determinada série) foram selecionados para serem incubados com anticorpo primário monoclonal anti-iNOS (1:50-200, epitopo corresponde a uma determinada seqüência da iNOS do camundongo, 610329, BD Transduction Laboratories, CA, USA) de rato obtido em camundongo por 48 horas a 4°C. Em prosseguimento, incubados com anticorpo secundário anti-camundongo obtido em cabra (1:500, BA-9200, Vector Laboratories), complexo ABC e revelado como mencionado no método de imunoperoxidase da nNOS. Alguns cortes histológicos de alvéolo dentário com reparo tecidual também foram submetidos a imunohistoquímica da iNOS como controle positivo.

### ***3.4.3. Análise microscópica e estatística***

Os cortes histológicos do tronco cerebral foram observados em microscopia de luz (Jenamed 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha Oriental) para análise do padrão qualitativo e quantitativo das reações de imunoperoxidase. Para quantificação dos neurônios imunorreativos no Sp5C foram considerados para contagem apenas aqueles com núcleo visível e a quantificação obtida revela um valor estimado da população neuronal referida. Portanto, os neurônios imunorreativos serão citados no presente texto como perfis neuronais nucleados ou mesmo perfis neuronais. A quantificação da imunohistoquímica para nNOS foi

realizada quanto aos perfis neuronais nucleados nNOS de 13 cortes histológicos eqüidistantes 112  $\mu\text{m}$  um do outro de uma série de cortes histológicos. Enquanto que para a quantificação dos perfis neuronais nucleados da imunohistoquímica para a nNOS/Fos foram selecionados aleatoriamente cinco cortes histológicos de uma segunda série de cortes histológicos. A quantificação foi realizada sem que o observador tivesse conhecimento a qual grupo experimental pertencia a lâmina histológica com a seqüência de cortes histológicos do tronco cerebral. Após essa quantificação, um segundo colaborador esclarecia ao observador a qual grupo experimental pertencia os espécimes analisados e quantificados.

Os dados obtidos, com relação ao número de perfis neuronais nucleados nNOS e/ou Fos dos lados ipsilateral e contralateral do Sp5C provenientes dos diferentes grupos experimentais, foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post test* de Dunns, considerando  $P < 0,05$  como significativo.

### **3.5. Atividade enzimática da NOS ex-vivo**

No ensaio da atividade da NOS foram utilizados 150 animais divididos nos dez grupos experimentais citados previamente. Para cada grupo experimental foram usadas cinco amostras do Sp5C, subdivididas em lados ipsilateral e contralateral. Cada amostra, por sua vez, foi constituída de três espécimes do Sp5C. Portanto, em cada grupo experimental foram utilizados 15 animais.

### **3.5.1. Coleta do Sp5C**

Nos animais previamente anestesiados, o tronco cerebral foi removido no período das 9h às 11h, dissecado no segmento situado entre -13,8 a -15,3 mm, a partir do ponto bregma, subdivididos em lados ipsilateral e contralateral, coletados em tubos criogênicos, pesados, rapidamente congelados em gelo seco e mantidos em freezer -86°C.

### **3.5.2. Medida da atividade enzimática da NOS**

O método utilizado foi o descrito por Förstermann *et al.* (1990) e está baseado na conversão da [<sup>3</sup>H]L-arginina para [<sup>3</sup>H]L-citrulina. Os protocolos experimentais tinham sido previamente padronizados para amostras do sistema nervoso central (Teixeira *et al.*, 2002). As amostras do tronco encefálico foram homogeneizadas (Homogeneizador H-100, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF (inibidor de proteases, Sigma) e 1 mM de L-citrulina (Sigma). Um volume de 50 µl de cada homogenato foi incubado na presença de 1 mM de NADPH (Sigma), 2 mM de CaCl<sub>2</sub> (Sigma) e 10 µM de L-arginina (Sigma) contendo 100.000 dpm de [2,3,4,5-<sup>3</sup>H]L-arginina mono hidrocloreto (Amersham Life Science, Inglaterra) em um volume final de 100 µl a temperatura ambiente (25 - 27°C) durante 30 minutos. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (com exceção do

PMSF e da L-citrulina). Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM (Sigma), pH 5,4, contendo 1 mM de EGTA (Sigma) e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, durante cinco minutos (Eppendorf) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8, Sigma Chem. Co., EUA). Os eluatos foram recolhidos em tubos de cintilação (Amersham). As colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados aos anteriores. Após a adição de 10 ml de líquido de cintilação, a radioatividade foi medida durante 1 minuto em espectrômetro de cintilação (Beckman – EUA).

Em cada ensaio foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistiram na omissão do  $\text{CaCl}_2$  e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS quanto à dependência da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de incubação), ou na adição de 1 mM de L-NAME (inibição específica para as NOS; Sigma). As contagens foram corrigidas por subtração do “branco” (em que o homogenato de tecido foi adicionado após o tampão HEPES) e da contagem obtida pelos tubos que contém L-NAME correspondente de cada amostra. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à contagem total, e os conteúdos destes tubos receberam  $[2,3,4,5\text{-}^3\text{H}]\text{L-arginina}$  mono hidrocloreto diretamente nos vials de cintilação, pela fórmula descrita a seguir, em que 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (em minutos):

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times ((\text{cpm}_{\text{amostra}} - \text{cpm}_{\text{branco}}) - \text{cpm}_{\text{L-NAME}}) / \text{cpm}_{\text{totais/30}}$$

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado pelo método de Bradford (1976) e a atividade da NOS foi expressa em pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína. A atividade da NOS  $\text{Ca}^{+2}$  - dependente foi obtida pela subtração da atividade da  $\text{Ca}^{+2}$  -independente, que possuía EGTA no meio de incubação da atividade total.

### **3.5.3. Análise estatística**

Os dados obtidos no ensaio radiométrico provenientes dos lados ipsilateral e contralateral do Sp5C dos diferentes grupos experimentais foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e submetidos à análise ANOVA e *post test* de Tukey-Kramer, considerando  $P < 0,05$  como significativo.

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### ***4.1. Análise Histopatológica***

A análise dos cortes histológicos frontais da ATM, corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (H.E.), possibilitou uma avaliação histopatológica que caracterizou o processo inflamatório em suas diferentes fases, além de permitir verificar se os animais dos grupos controle se mostravam em condições adequadas de normalidade.

Os animais dos grupos controle total (Figura 3A-B), controle anestésico e pseudo-operado (Figura 3C-D) apresentaram padrão histológico normal da articulação temporomandibular. Entretanto, ocasionalmente, no grupo pseudo-operado foi observado acúmulo de macrófagos em áreas restritas da membrana sinovial, mas não caracterizando um processo inflamatório. No grupo com artrite aguda, foi notado intenso infiltrado inflamatório, constituído por neutrófilos e alguns leucócitos mononucleados localizados na membrana sinovial, tecido subsinovial e principalmente no espaço articular supradiscal (Figura 3E-F), caracterizando um processo artrítico na fase aguda. No grupo com artrite crônica, foi evidenciado um moderado infiltrado inflamatório caracterizado pela elevada quantidade de leucócitos mononucleados, distribuídos em todas as regiões da articulação (Figura 3G-H). A camada íntima da membrana sinovial apresentou espessura aumentada em decorrência do acúmulo de macrófagos (Figura 3H). O tecido conjuntivo subsinovial foi infiltrado principalmente por macrófagos e em menor quantidade

por linfócitos e plasmócitos. No espaço articular supradiscal, foram notados aglomerados de macrófagos formando estruturas que se assemelham morfológicamente a grãos de arroz, rotineiramente conhecidos como “rice bodies”, além da presença de inúmeras vilosidades sinoviais, típicas de um processo artrítico crônico (Figura 3G-H). No grupo com artrite crônica-agudizada, a articulação temporomandibular demonstrou exuberante inflamação aguda no espaço supradiscal, com abundância de neutrófilos polimorfonucleares, além de acúmulos de macrófagos na camada sinovial e subsinovial, remanescentes do processo crônico, caracterizando o processo artrítico na fase crônica-agudizada (Figura 3I-J). É importante mencionar que o processo inflamatório foi restrito ao compartimento da articulação temporomandibular, não se estendendo para territórios adjacentes, tais como músculos estriados esqueléticos (masseter, temporal, pterigóideo lateral e medial), nervos (nervo auriculotemporal, nervo mandibular, nervo masseter), glândula parótida e pele da região parotídea.

## **4.2. Imunohistoquímica**

### **4.2.1. nNOS e iNOS**

Os perfis neuronais nucleados nNOS no Sp5C demonstraram imunorreatividade citoplasmática tanto no pericário assim como nos dendritos e axônios (Figura 4B-D). Estes neurônios nNOS estavam distribuídos preferencialmente na lâmina superficial (II) e em menor número nas lâminas profundas (Figura 4A-D) de toda extensão rostro-caudal do Sp5C, com uma clara

preponderância na parte média e caudal desse subnúcleo. Os perfis neuronais nNOS nas lâminas superficial e profunda apresentaram principalmente morfologia oval e fusiforme, respectivamente (Figura 4B-D). Os cortes histológicos do Sp5C, que foram incubados sem o anticorpo primário anti-nNOS não revelaram indício de marcação inespecífica.

A quantificação dos perfis neuronais nucleados nNOS revelou uma média de  $44 \pm 6$  a  $48 \pm 6$  neurônios em cada Sp5C por corte histológico no grupo controle total (Tabela 1). Os valores obtidos de neurônios nNOS não se alteraram nos diferentes grupos controle, entretanto, foi observado um discreto aumento nos grupos com artrite (Tabela 1). Uma vez que não foi observada diferença estatística entre os grupos controle (grupos controle total, pseudo-operado e anestésico), os dados da quantificação dos perfis neuronais nNOS nos grupos com artrite foram comparados com seus respectivos grupos pseudo-operados, em termos de porcentagem. Tal comparação permitiu avaliar somente a influência da artrite induzida por carragenina nos perfis neuronais nNOS no Sp5C. Dessa maneira, a porcentagem de perfis nNOS no Sp5C aumentou bilateralmente (entre 13% a 16%) nos grupos com artrite, quando comparada com seus respectivos grupos pseudo-operados, mas essas diferenças não foram estatisticamente significantes (Figura 5). Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas quando a comparação foi efetuada entre os grupos com artrite.

A análise imunohistoquímica para identificação da iNOS não revelou qualquer indício de sua expressão no Sp5C. Entretanto, cortes histológicos

controle advindos de alvéolo dentário de ratos em reparo tecidual demonstraram presença da iNOS associada a macrófagos e estruturas vasculares.

#### **4.2.2. nNOS e Fos**

A porcentagem de perfis neuronais nucleados nNOS no Sp5C que exibiam imunorreatividade à proteína Fos foi analisada através do método de dupla marcação imunohistoquímica. O número de perfis neuronais nucleados imunorreativos a Fos aumentou significativamente nos grupos com artrite aguda ( $44\pm 6\%$ ,  $P<0,001$ ), crônica ( $20\pm 6\%$ ,  $P<0,01$ ) e crônica-agudizada ( $45\pm 5\%$ ,  $P<0,001$ ), quando comparado com o grupo controle total e com os seus respectivos grupos pseudo-operados. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controles (pseudo-operado, anestésico e total). Os perfis neuronais Fos foram observados bilateralmente tanto nas lâminas superficiais (I-II) como nas profundas (III-VI) nos grupos com artrite. Os perfis neuronais nNOS/Fos foram identificados pela nítida coloração do citoplasma em castanho (nNOS) e do núcleo em negro (Fos) (Figura 4E-F), localizados preferencialmente nas lâminas superficiais (II). Entretanto, apesar do aumento significativo no número de perfis neuronais Fos nos grupos com artrite, a porcentagem do número total de neurônios nNOS que exibem Fos (perfis neuronais nNOS/Fos) foi discreta ( $4\pm 10\%$ ) e não alterou significativamente quando comparada com os seus respectivos grupos controle.

### **4.3. Atividade enzimática da NOS ex-Vivo**

A atividade catalítica das NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente e  $\text{Ca}^{+2}$ -independente foi mensurada nas amostras dos lados ipsilateral e contralateral do Sp5C de todos os grupos experimentais (Tabela 2). Os dados da atividade foram expressos por pmol L-citulina/mg proteína/minuto (Tabela 2).

#### **4.3.1. Atividade enzimática das NOS $\text{Ca}^{+2}$ -dependente**

A comparação dos dados advinda dos grupos controle não revelou diferenças estatísticas. Desse modo, os dados advindos dos grupos com artrite foram comparados com seus respectivos grupos pseudo-operados e as diferenças expressas em porcentagens. Nessa análise, foi detectado aumento estatisticamente significativo no lado ipsilateral do Sp5C do grupo com artrite crônica ( $34,8 \pm 6,8\%$ ,  $P < 0,05$ ) quando comparado com seu respectivo grupo pseudo-operado (Figura 6). Além disso, também foi notado aumento estatístico quando o lado ipsilateral do Sp5C do grupo com artrite crônica foi comparado com o mesmo lado nos grupos com artrite aguda ( $42,1 \pm 4,4\%$ ,  $P < 0,01$ ) e crônica-agudizada ( $36,2 \pm 12,4\%$ ,  $P < 0,05$ ) (Figura 6).

#### **4.3.2. Atividade enzimática da NOS $\text{Ca}^{+2}$ -independente**

A atividade catalítica da NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -independente permaneceu extremamente baixa (de  $0,06 \pm 0,02$  a  $0,22 \pm 0,04$  pmol L-citrulina/mg proteína/minuto) e, ocasionalmente, não detectada nas amostras dos grupos experimentais, mesmo com adição de cofatores exógeno CaM ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), FAD ( $10 \mu\text{M}$ ), e BH4 ( $100 \mu\text{M}$ ) (dados não demonstrados). A comparação entre os diferentes grupos com artrite em relação aos seus respectivos grupos controle não revelou diferença estatisticamente significativa.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou a expressão e a atividade de algumas isoenzimas (nNOS e iNOS) envolvidas na produção do óxido nítrico na parte caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo (Sp5C) durante artrite unilateral induzida por carragenina na articulação temporomandibular de rato. Para tais propósitos, foram empregados os métodos imunohistoquímico e do ensaio radiométrico. Os neurônios expressaram nNOS no Sp5C em todos os grupos experimentais e não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes. A iNOS não mostrou indícios de sua expressão no Sp5C. A atividade das enzimas  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente exibiram um aumento estatístico significativo no grupo com artrite crônica, enquanto a atividade das enzimas  $\text{Ca}^{+2}$ -independente foram desprezíveis.

### ***5.1. Considerações técnicas***

Alguns detalhes metodológicos foram respeitados para evitar resultados não condizentes e, conseqüentemente, interpretações errôneas. Um desses detalhes metodológicos estava relacionado a cronobiologia da NOS, principalmente quanto a sua concentração e atividade no sistema nervoso central. Desse modo, as amostras do Sp5C foram sempre coletadas no mesmo intervalo de tempo entre as 9h e 11h da manhã. É sabido que a atividade e concentração da proteína NOS são dependentes de um ritmo circadiano (Ayers *et al.*, 1996). Essas variáveis da NOS no sistema nervoso central do rato são maiores no

período das 3h às 9h da manhã e menor às 3h da tarde (Ayers *et al.*, 1996). As amostras analisadas nesses dois períodos de intervalo de tempo mostram diferentes concentrações da NOS que podem ser significantes; por exemplo, o conteúdo da NOS citosólica é de aproximadamente 35 e 25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  no tronco cerebral às 9h da manhã e às 3h da tarde, respectivamente (Ayers *et al.*, 1996).

No presente estudo, o segmento do Sp5C analisado foi idêntico para todos os métodos empregados. No método imunohistoquímico foram analisados cortes histológicos transversais do Sp5C no tronco encefálico, situado entre -13,8 mm e -15,3 mm do ponto bregma. Esse segmento corresponde à principal região do Sp5C no qual convergem impulsos sensoriais da articulação temporomandibular (Hathaway *et al.*, 1995; Beretier e Beretier, 2000); além disso, aloja a maior parte dos neurônios nNOS no núcleo espinal do nervo trigêmeo (Dohrn *et al.*, 1994). No método do ensaio radiométrico, o mesmo segmento do tronco cerebral foi dissecado e subsequente o Sp5C foi rapidamente delimitado para essa análise. Por essa razão, os resultados obtidos pelo método do ensaio radiométrico referem-se à mesma região do Sp5C analisada pelo método imunohistoquímico.

Os grupos experimentais delineados foram constituídos pelos grupos com artrite (aguda, crônica e crônica-agudizada) e grupos controle (pseudo-operado, anestésico e total). Dessa maneira, foi possível observar se os procedimentos de injeção intra-articular e anestesia foram capazes de modificar a expressão e atividade da NOS no Sp5C. Uma vez que essas variáveis da NOS não se alteraram nos grupos controle, é possível concluir que possíveis modificações na NOS observadas nos grupos com artrite, quando comparados

com seus respectivos grupos pseudo-operados, devem ser decorrentes apenas da artrite induzida pela carragenina na articulação temporomandibular. Alguns estudos que analisaram os efeitos inflamatórios na expressão da NOS não delinearam todos os possíveis grupos controle e, por essa razão, alterações detectadas nesses estudos podem ser devidas ao agente anestésico e ao modelo de indução do processo inflamatório adotados. Além disso, outras variáveis, tais como, substância inflamatória empregada, órgão-alvo e o segmento do sistema nervoso central analisado podem resultar em dados conflitantes e impossibilitar a comparação entre os estudos que enfocam o efeito da inflamação periférica na expressão da NOS no sistema nervoso central, como discutido em um trabalho de revisão sobre este assunto (Calsen-Cencic *et al.*, 1999).

As características histológicas da articulação temporomandibular do rato revelam que este órgão-alvo é susceptível ao extravazamento do indutor inflamatório, dependendo da quantidade injetada, para estruturas anatômicas adjacentes, com características morfo-funcionais distintas da articulação. Essas estruturas adjacentes, tais como músculos da mastigação (músculos masseter, temporal, pterigóideo medial e lateral), glândula parótida, nervos (nervo mandibular e suas ramificações), gânglios nervosos (trigeminal e ótico) e pele facial da região parotídea podem desenvolver sinais de inflamação quando da deposição da substância inflamatória na articulação temporomandibular do rato. O desenvolvimento de processo inflamatório nestes territórios, adjacentes da articulação temporomandibular, deve ser potencialmente capaz de modular a expressão de óxido nítrico no sistema trigeminal. Alguns estudos têm demonstrado que a estimulação nociceptiva do músculo esquelético e nervos é

capaz de modular a expressão do óxido nítrico no sistema nervoso central. A miosite induzida por carragenina nos músculos gastrocnêmio-sóleos resultou na diminuição do número de neurônios na medula espinal que exibem atividade NADPH-diaforase, um marcador inespecífico da produção do óxido nítrico (Mense *et al.*, 1996). Em outro estudo, tem sido observado que a estimulação das fibras nervosas do tipo C no nervo isquiático, associada com artrite induzida no joelho, potencializou a liberação de vários aminoácidos, prostaglandina e citrulina (indicador da produção de óxido nítrico) na medula espinal do rato (Sorkin e Moore, 1996). Além disso, neurite desencadeada por baixas doses de zimozan no nervo isquiático resultou em hiperalgesia mecânica ipsilateral, que pode tornar-se bilateral, dependendo da dose (Chacur *et al.*, 2001). Aparentemente, a hiperalgesia associada à neurite pode ser mediada pela liberação de óxido nítrico na medula espinal (Chacur *et al.*, 2001). No presente trabalho, a substância inflamatória empregada para induzir artrite limitada à articulação temporomandibular do rato foi a carragenina na forma de gel e dose de 0,01 mg (5 $\mu$ l a 10%). O volume depositado é discreto quando comparado com outros estudos que induziram artrite na articulação temporomandibular do rato, os quais empregaram de 20 a 70  $\mu$ l de carragenina ou de outras substâncias inflamatórias (Hutchins *et al.*, 2000; Harper *et al.*, 2000). A deposição de discreta quantidade de carragenina (5  $\mu$ l) reduz a possibilidade de extravazamento da substância inflamatória para os territórios adjacentes que potencialmente podem interferir na modulação da NOS no sistema nervoso central, desencadeado exclusivamente pela artrite.

A quantificação dos perfis neuronais nucleados nNOS nos animais do grupo controle total ( $44 \pm 6$  e  $48 \pm 6$  nos lados ipsilateral e contralateral, respectivamente) no presente trabalho, demonstram diferença significativa em relação a um estudo extensivo no núcleo espinal do nervo trigêmeo (Dohrn *et al.* 1994). Esses autores relatam média de 14 e 21 perfis neuronais nucleados nNOS e NADPH-diaforase, respectivamente, para cada hemi-seção do Sp5C (Dohrn *et al.*, 1994). A discrepância na média de perfis neuronais observadas entre os estudos pode ser decorrente de diferenças metodológicas. Aparentemente, no trabalho de Dohrn *et al.* (1994), os cortes histológicos foram obtidos em vibrátomo com espessura de 40  $\mu\text{m}$ , a solução fixadora utilizada constituída por paraformaldeído a 4%, glutaraldeído a 0,2% e ácido pícrico a 0,2% (pH 7,4) e pós-fixação. Neste estudo, foram empregados cortes histológicos com 16  $\mu\text{m}$  de espessura, e solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão tetraborato de sódio 0,1M, pH 9,5, sem pós-fixação. Sabe-se que a espessura do corte histológico é inversamente proporcional à eficiência da marcação imunohistoquímica. Além disso, soluções fixadoras com pH alcalino freqüentemente proporcionam marcação mais eficiente de neuromediadores no sistema nervoso central (Berod *et al.*, 1981).

## **5.2. Carragenina na articulação temporomandibular**

A carragenina, um polissacarídeo sulfatado derivado de algas marinhas, tem sido amplamente utilizada para induzir inflamação local e hiperalgesia em

articulações (Nicklin e Miller, 1984). Primeiramente, a carragenina ativa células inflamatórias a liberar seus mediadores químicos, tal como glutamato, serotonina, histamina e prostaglandina, as quais são as principais substâncias capazes de desencadear a hiperalgesia primária (Schaible e Schmidt, 1985, 1988). Em seguida, é observada uma sensibilização dos neurônios espinais associados com a sensibilidade aumentada dos receptores nociceptivos presentes na articulação, resultando em hiperalgesia secundária (Sluka e Westlund, 1993).

A carragenina induz a ativação e diminuição do limiar de excitabilidade das fibras aferentes primárias amielínicas e mielinicas de pequeno diâmetro presentes na pele e no músculo (Kocher *et al.*, 1987; Diehl *et al.*, 1988, 1993). Enquanto, na articulação temporomandibular do rato, que apresenta somente terminações nervosas livres provenientes de fibras C e A $\delta$ , a carragenina assim como a kaolina são capazes de induzir um aumento na excitabilidade dessas terminações nervosas, principalmente, em relação a estímulos térmicos (Kido *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 2004).

No presente estudo, os dados histológicos demonstram que carragenina a 10%, injetada na articulação temporomandibular do rato, induziu artrite aguda (24 horas) e crônica (15 dias), classificadas pela presença de células inflamatórias típicas de cada fase. Estes dados histológicos e temporais corroboram com aqueles obtidos quando carragenina a 3% foi injetada na articulação do joelho do rato (Radhakrishnan *et al.*, 2003). Os sinais da inflamação aguda são observados entre 4 a 8 horas após indução pela carragenina na articulação do joelho do rato, e persistem até 24 horas, enquanto que os sinais da inflamação crônica são

observados a partir de duas semanas e persistem até oito semanas após a indução (Radhakrishnan *et al.*, 2003). A fase aguda da inflamação pode-se estender além das 24 horas, uma vez que existem dados demonstrando que a carragenina pode persistir por até 48 horas sem ser removida da articulação do joelho do rato (Santer *et al.*, 1983). A artrite crônica na ATM induzida por carragenina apresentou como características adicionais à ocorrência de aglomerado de macrófagos, denominados de “rice bodies” e um aumento das vilosidades sinoviais, predominantes em artrite crônica (Henderson e Edwards, 1987).

Um aspecto interessante no presente trabalho foi a reprodução de um modelo de artrite crônica-agudizada, na qual a carragenina foi depositada duas vezes na articulação temporomandibular, 15 dias e 24 horas antes do sacrifício por perfusão dos animais. O grupo com artrite crônica-agudizada é importante, uma vez que a articulação temporomandibular de humanos apresenta uma considerável prevalência de sintomatologia crônica com períodos de agudização (Donaldson, 1995; Okeson, 1992). A articulação temporomandibular do rato no grupo com artrite crônica-agudizada apresentou infiltrado inflamatório nitidamente mais intenso, apesar de não quantificado, em relação aos demais grupos com artrite. Tal observação é coerente, uma vez que na articulação permaneceu uma considerável quantidade de células envolvidas com a resposta inflamatória recrutadas da primeira indução da artrite e, certamente, essa população de células remanescente deve liberar uma elevada quantidade de substâncias pro-inflamatórias em decorrência da segunda indução da artrite. Assim sendo, pode ser sugerido que os estímulos nociceptivos deflagrados durante a artrite crônica-

agudizada poderiam ser mais potentes em induzir possíveis alterações no metabolismo do óxido nítrico no sistema trigeminal, visto que ocorreu uma amplificação da inflamação produzida na articulação temporomandibular do rato.

A análise da articulação temporomandibular contralateral do rato em todos os grupos com artrite induzida por carragenina não demonstrou sinais de processos inflamatórios. Esses resultados estão de acordo com o trabalho no qual a carragenina foi depositada no joelho do rato, não induzindo artrite contralateral (Radhakrishan *et al.*, 2003). Por outro lado, existem dados na literatura que mencionam sinais de artrite sistêmica quando foi empregada dose elevada de adjuvante completo de Freund (Philippe *et al.*, 1997; Decaris *et al.*, 1999).

É sabido que a carragenina a 3% é capaz de induzir hiperalgesia secundária ipsilateral tanto para estímulos mecânicos como térmicos aplicados no joelho do rato, tornando-se bilateral após duas semanas, mesmo não tendo sido observado sinais de inflamação contralateral (Radhakrishan *et al.*, 2003). Com base nessas características algógenas da carragenina, pode-se sugerir que a artrite na articulação temporomandibular do rato induzida com carragenina a 10% deve inicialmente desencadear uma hiperalgesia primária mecânica e térmica, enquanto persistir o indutor na articulação. Seguindo este período, é plausível sugerir que uma hiperalgesia secundária bilateral tanto para estímulos mecânicos e térmicos possa ser estabelecida na articulação temporomandibular do rato, análogo aos achados obtidos por Radhakrishan *et al.* (2003). A capacidade da carragenina em induzir hiperalgesia mecânica e térmica, além de injúria inflamatória foi vantajosa para o presente trabalho, uma vez que tem sido demonstrado que o emprego de inibidores da NOS tem revertido ou atenuado esta

hiperalgesia (Meller *et al.*, 1994; Lawand *et al.*, 1997; Handy e Moore, 1998; Osborne e Coderre, 1999).

É interessante mencionar que, experimentos realizados em nosso laboratório também observaram nos animias dos diferentes grupos com artrite uma perda de peso destes animais nos primeiros 15 dias após a indução da artrite e que os mesmos recuperam o peso, atingindo peso semelhante aos animais controles até 30 dias após a indução.

### **5.3. Expressão e atividade enzimática da nNOS**

A distribuição dos perfis neuronais nucleados nNOS estava principalmente restrita na lâmina II e mais discretamente posicionados nas lâminas profundas do Sp5C, de acordo com estudo prévio (Dohrn *et al.*, 1994). A predominância da população de neurônios nNOS na lâmina II, conduz a ponderar sobre uma possível função do óxido nítrico na nocicepção trigeminal. Os neurônios nNOS no Sp5C parecem estar envolvidos na modulação local, atuando como interneurônios entre as várias partes do sistema trigeminal (internuclear) ou mesmo no próprio Sp5C (intranuclear), como demonstrado por métodos combinados de traçamento neuronal e imunohistoquímico (Dohrn *et al.*, 1994). Existem vários estudos demonstrando que os neurônios nNOS no Sp5C e na medula espinal têm ação pró-nociceptiva e que esta ação pode ser exercida por vários mecanismos. Estes neurônios nNOS recebem sinapse excitatória de aferentes glutaminérgicos, por exemplo, aferentes primários de fibras nervosas do tipo C, os quais induzem a ativação de receptores NMDA nos neurônios nNOS, aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, geração de GMPc, seguido de PKG (proteína

quinase dependente de GMPc), a qual poderá estimular a fosforilação de proteína de membrana dos neurônios nNOS. Esses neurônios nNOS sensibilizados podem modular a sua expressão gênica. Além disso, o NO gerado nos neurônios nNOS pode se difundir extracelularmente e agir nos terminais pré-sinápticos das fibras nervosas aferentes do tipo C, aumentando a produção de glutamato e neuropeptídeos nesses aferentes, tais como SP e CGRP, o que facilitaria o processo de hiperalgesia. O NO também pode se difundir e modular os neurônios contíguos de projeções talâmicas (Dohrn *et al.*, 1994; Sluka *et al.*, 1998). O NO pode modificar a atividade das células da glia, que por sua vez podem sintetizar e secretar prostaglandinas e citocinas, alterando a atividade dos neurônios nociceptivos locais. Finalmente, também tem sido demonstrado que o NO tem um efeito tônico depressivo na atividade dos neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinal, em condições de normalidade (Hoheisel *et al.*, 2000). Dessa maneira, o NO proveniente da população de neurônios nNOS no Sp5C pode exercer sua atividade por vários mecanismos para manter as condições fisiológicas locais dos neurônios nociceptivos tanto no processamento nociceptivo de um órgão-alvo em condições de normalidade ou durante processos inflamatórios.

O presente trabalho foi o primeiro que descreveu a influência da artrite induzida pela carragenina na articulação temporomandibular na expressão da nNOS e iNOS no Sp5C. Assim sendo, foi observado um discreto aumento na porcentagem de neurônios imunorreativos a nNOS no Sp5C durante o processo artrítico, entretanto, esse aumento não mostrou diferença estatisticamente significativa. Em animais com poliartrite induzida por deposição subcutânea de

CFA foi evidenciada uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) no número de neurônios que expressam o RNAm para a nNOS nas lâminas I e II da medula espinal de rato. Essa redução somente foi observada em longo prazo, 20 dias após a indução (Pozza *et al.*, 1998). Por outro lado, CFA injetado na articulação do joelho do rato resultou em significativo aumento da imunoreatividade da nNOS nas lâminas superficiais da medula espinal, analisada pela densidade óptica local (Wu *et al.*, 1998). Os dados do presente trabalho não podem ser comparados com estes estudos que empregaram o indutor inflamatório CFA, uma vez que esse possui diferentes mecanismos de indução do processo inflamatório em relação a carragenina. Entretanto, algumas considerações podem ser discutidas. Primeiramente, o emprego de CFA para indução de poliartrite não deve ser apropriado para estudar os mecanismos nociceptivos de um determinado órgão-alvo devido à sua difusão sistêmica como mencionado por outros autores (Haak *et al.*, 1996; Decaris *et al.*, 1999; Lorton *et al.*, 2000; Radhakrishnan *et al.*, 2003). Além disso, o considerável aumento na densidade óptica da imunoreatividade da nNOS na medula espinal, notada por Wu *et al.* (1998), pode ser também consequente do aumento da imunoreatividade dos aferentes primários dos neurônios nNOS alojados no gânglios sensitivos da raiz dorsal que suprem a articulação do joelho com artrite. Tal consideração pode ser apropriada, visto que a artrite induzida por CFA no joelho de rato aumenta significativamente a expressão de nNOS nos neurônios dos gânglios sensitivos da raiz dorsal (Pozza *et al.*, 1998). Outros estudos que analisaram os neurônios imunorreativos a nNOS no corno dorsal durante indução de inflamação periférica por formalina, capsaicina, CFA ou zimozan injetado na pata de rato e camundongo mostraram que tal população de

neurônios nNOS apresentou um aumento significativo (Lam *et al.*, 1996; Yonehara *et al.*, 1997; Maihöfner *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001). Além disso, também tem sido relatada diminuição da imunoreatividade dos neurônios nNOS na medula espinal em ovelhas durante mastite crônica de evolução espontânea (Dolan *et al.*, 2000). Finalmente, corroborando nossos resultados, há trabalhos mostrando não existirem diferenças estatísticas na quantidade de neurônios nNOS na medula espinal quando utilizaram carragenina ou CFA como indutor de inflamação na pata de rato (Traub *et al.*, 1994; Goff *et al.*, 1998). É interessante mencionar que experimentos realizados em nosso laboratório também não observaram alterações na expressão gênica da nNOS mensurada através da análise densitométrica semi-quantitativa da reação de polimerase transcriptase reversa (RT-PCR), de acordo com os dados imunohistoquímicos. Conseqüentemente, parece existir uma correlação direta entre os dados obtidos da expressão gênica e da imunorreatividade da nNOS no Sp5C durante a artrite induzida por carragenina na articulação temporomandibular do rato.

A análise da atividade da enzima  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente no Sp5C durante artrite induzida por carragenina revelou um aumento estatisticamente significativo no lado ipsilateral do grupo com artrite crônica quando comparada com seu respectivo grupo pseudo-operado. Esse aumento estatístico também foi significativo quando o grupo artrite crônica foi comparado com os grupos artrite aguda e com artrite crônica-agudizada. Esses resultados foram interessantes porque demonstraram que há mudanças funcionais na enzima NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente, apesar da ausência de alterações protéicas e gênicas, mostradas pelos métodos imunohistoquímico e de RT-PCR, respectivamente. Os resultados

da atividade da enzima NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente foram diferentes daqueles obtidos quando a atividade foi elevada na medula espinal de rato, durante a fase aguda (2 a 24 horas) da inflamação induzida por carragenina depositada na planta do pé de camundongos (Tao *et al.*, 2004). Esses resultados contrastantes não devem ser relevantes, visto que existem diferenças essenciais entre o nosso estudo e aquele desenvolvido por Tao *et al.* (2004), tais como o órgão-alvo submetido ao processo inflamatório, segmento do sistema nervoso central analisado e a espécie animal adotada.

Os dados advindos da utilização de inibidores específicos da nNOS em estudos comportamentais reforçam a tese da importância da nNOS no processamento nociceptivo. Assim sendo, o emprego de inibidores específicos da nNOS [7-nitroindazole, 7-NI; 1 (2-trifluorometilfenil) imidazole, TRIM; 3-bromo-7-nitroindazole, 3-Br] foi eficiente na inibição da hiperalgesia térmica e/ou mecânica induzida pela carragenina na pata de rato e camundongo (Handy e Moore, 1998; Osbone e Coderre, 1999; Tao *et al.*, 2004). O emprego de camundongos com deleção gênica da nNOs (“knouckout”) mostrou que a hiperalgesia térmica induzida pela carragenina permaneceu intacta na fase inicial, mas atenuada na fase tardia, demonstrando que outros neuromediadores também devem ser significantes na fase inicial da hiperalgesia térmica (Tao *et al.*, 2004).

A atividade da enzima  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente detectada pelo ensaio radiométrico pode ser decorrente tanto da atividade funcional da nNOS como da eNOS, visto que ambas são  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente. A eNOS é expressa pelas células endoteliais, astrócitos e por alguns tipos de neurônios, por exemplo células piramidais do hipocampo. Entretanto, existe um estudo demonstrando que o emprego de

inibidor seletivo da eNOS [L- $N^5$ -(1-iminoethyl)-ornitine, L-NIO] não alterou a hiperalgesia térmica induzida pela carragenina em camundongos selvagens (Tao *et al.*, 2004). Uma possível ação da eNOS na hiperalgesia somente foi detectada quando o modelo animal usado foi camundongo com deleção gênica da nNOS (“knockout”) (Tao *et al.*, 2004). Aparentemente, a eNOS deve ser significativa para gerar NO nas vias nociceptivas, durante inflamação periférica, como um mecanismo compensatório em animais na qual a nNOS se apresenta alterada sem exercer qualquer atividade efetiva. Desse modo, no presente estudo, as alterações detectadas na atividade da enzima NOS  $Ca^{+2}$ -dependente no grupo artrite crônica podem ser decorrentes de modificações da atividade da nNOS e não da eNOS.

#### **5.4. Expressão e atividade enzimática da iNOS**

No presente estudo, o método imunohistoquímico foi incapaz de detectar iNOS nas células posicionadas no Sp5C. Aparentemente, a iNOS está presente em células endoteliais, astrócitos, macrófagos, células perivasculares e em neurônios no sistema nervoso central, principalmente durante intensa injúria tecidual, por exemplo, causada por lipopolissacarídeos (LPS), citocinas e outros indutores inflamatórios agindo diretamente no sistema nervoso central (Stuehr *et al.*, 1985; Minc-Golomb *et al.*, 1994; Galea *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2000). Em contraste a nNOS e eNOS, a iNOS é rapidamente expressa e libera alta concentração de NO (iNOS,  $\mu$ molar, enquanto nNOS e eNOS,  $p$ molar), sustentada a longo prazo que frequentemente resultam em danos teciduais irreparáveis ao hospedeiro.

A expressão da iNOS tem sido detectada pelo método imunohistoquímico em células endoteliais da medula espinal, e essas células demonstraram uma aumentada imunorreatividade durante inflamação periférica induzida por CFA depositado na articulação do joelho de rato (Wu *et al.*, 1998). Entretanto, há um estudo mostrando que a iNOS não foi detectada na medula espinal após injeção de CFA na pata do rato (Goff *et al.*, 1998). Em outro estudo, foi observado que somente os astrócitos na medula espinal do rato foram capazes de expressarem iNOS, 168 horas após a inflamação periférica induzida por zimozan na pata (Maihörner *et al.*, 2000). O RNAm da iNOS também foi detectado através do método da RT-PCR na medula espinal, 24 horas após injeção de carragenina na pata de camundongo, mas não em qualquer outro período de tempo (Tao *et al.*, 2003), embora não se saiba se tal expressão foi induzida nos astrócitos, células endoteliais ou outro tipo de células (Tao *et al.*, 2003). É interessante mencionar que experimentos realizados em nosso laboratório também não observaram expressão gênica da iNOS através do emprego do método de RT-PCR, de acordo com os dados imunohistoquímicos.

Há vários estudos que utilizaram inibidores seletivos da iNOS [aminoguanidina, AG; aminotetrapoetina, AMT; L-N-(1-iminoetil)-lisina, LN-1], depositados intratecalmente na medula espinal de rato e camundongos, mostrando que os estímulos nociceptivos induzidos pelo zimozan, capsaicina e carragenina na pata foram atenuados (Meller *et al.*, 1994; Osborn e Coderre, 1999; Wu *et al.*, 2001, Tao *et al.*, 2003). O pré-tratamento com LN-1 não tem efeito na fase inicial (2-6 horas) da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina, mas atenuou significativamente na fase tardia (24 horas) em camundongo selvagem

(Tao *et al.*, 2003). Por outro lado, pré-tratamento com um inibidor seletivo da nNOS foi efetivo na atenuação da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina, na fase inicial e tardia, em camundongos com deleção gênica da iNOS (Tao *et al.*, 2003). Em conclusão, tem sido sugerido que a iNOS somente pode ser importante na fase tardia da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina, entretanto não essencial (Tao *et al.*, 2003).

Os resultados da atividade da enzima NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -independente, ou seja, da iNOS no Sp5C dos grupos com artrite e controle demonstrou que essa atividade foi insignificante. Os valores da atividade da enzima NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -independente foram extremamente baixos, ocasionalmente ausentes, podendo supor que tal atividade seja decorrente da leitura basal inespecífica. Portanto, sem importância biológica no modelo experimental adotado no presente trabalho.

Não há estudos que analisaram, individualmente, a atividade das enzimas NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente e  $\text{Ca}^{+2}$ -independente no sistema nervoso central, durante artrite para possíveis comparações com os nossos resultados. Aparentemente, a indução da iNOS no sistema nervoso central depende de vários aspectos, tais como o tempo de análise após a aplicação do estímulo nociceptivo e/ou inflamatório, natureza do estímulo nociceptivo e/ou inflamatório, órgão-alvo e a região do sistema nervoso central analisadas.

Desse modo, a nNOS e a iNOS podem ser importantes na geração de NO no processamento nociceptivo no sistema nervoso central durante injúria tecidual periférica. Entretanto, somente a nNOS parece ser crucial no processamento nociceptivo no Sp5C durante artrite induzida pela carragenina na articulação temporomandibular do rato.

### 5.5. nNOS e Fos

O presente estudo revelou que durante a artrite unilateral induzida pela carragenina na articulação temporomandibular de rato, houve um aumento bilateral no número de perfis neuronais nucleados que exibiam imunorreatividade à proteína Fos no Sp5C. Estes dados estão de acordo com estudos prévios, que mostram que o Sp5C é um dos principais reles de expressão de Fos durante aplicação de estímulos nociceptivos na articulação temporomandibular do rato (Hathaway *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1999; Bereiter e Bereiter, 2000). Um considerável número de neurônios Fos estava distribuído nas lâminas profundas do Sp5C, enquanto tem sido relatada uma predominância na lâmina superficial (Hathaway *et al.*, 1995). Entretanto, nesse último estudo, os animais foram sacrificados 2 a 5 horas após injeção de óleo de mostarda, enquanto em nosso estudo os animais foram sacrificados 24 horas, 15 dias e 15 dias/24horas depois da injeção de carragenina. Em corroboração aos nossos achados, tem sido demonstrado que 4 horas após deposição de carragenina na pata do rato, a expressão de Fos é observada principalmente em neurônios concentrados na lâmina profunda do corno dorsal da medula espinal (Honore *et al.*, 1995). Análise em longo prazo, após injeção de adjuvante completo de Freund na articulação temporomandibular do rato, também mostrou um significativo aumento de neurônios Fos nas lâminas profundas do Sp5C e uma menor proporção nas lâminas superficiais (Bereiter e Bereiter, 2000). Somente uma discreta porcentagem (cerca de 4% a 14%) dos perfis neuronais nucleados nNOS exibiram Fos não alterando nos grupos com artrite induzida por carragenina. Aplicação de estímulos químicos nociceptivos na face (Leong *et al.*, 2000; Yeo *et al.*, 2002) ou

na superfície plantar também resultaram em um discreto número de neurônios que exibiam simultaneamente nNOS e Fos (um máximo de 14%), sem diferença estatística em comparação com o controle (Nazli *et al.*, 2001). Similarmente, discreto aumento de neurônios nNOS/Fos foi obtido no tronco encefálico após estímulo nociceptivo induzido pela injeção de formalina no lábio (Pardutz *et al.*, 2000).

Alguns estudos utilizando L-NAME, um inibidor da NOS não específico, revelou que tal tratamento bloqueou o aumento do número de neurônios Fos no corno dorsal da medula espinal, induzido pela aplicação de estímulo nociceptivo (Roche *et al.*, 1996). Administração sistêmica de nitroglicerina, um doador de óxido nítrico, produziu um aumento significativo no número de neurônios que exibem nNOS ou Fos. É interessante salientar que esse aumento foi estabelecido em duas populações distintas de neurônios, aqueles nNOs e aqueles Fos, não sendo observado um aumento na população de neurônios nNOS/Fos (Wu *et al.*, 2000). A administração intravenosa de MK-801, um antagonista do receptor NMDA, reduziu o número de neurônios Fos somente nas lâminas superficiais (I-II) do Sp5C em animais com artrite induzida pelo óleo de mostarda depositado na articulação temporomandibular do rato (Bereiter e Bereiter, 2000). Esses dados permitem especular que os neurônios nNOS localizados exatamente na lâmina superficial do Sp5C, cuja ativação pode ser mediada pelo receptor NMDA, são importantes para a modulação de neurônios que exibem a proteína Fos durante processamento nociceptivo.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que o óxido nítrico é um importante neuromediador no Sp5C do rato em condições de normalidade. A expressão da nNOS não alterou durante o desenvolvimento da artrite induzida por carragenina na articulação temporomandibular. Entretanto, a atividade da enzima  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente alterou significativamente no grupo com artrite crônica, mostrando que o óxido nítrico pode exercer uma importante ação no processamento nociceptivo no Sp5C em injúrias crônicas que acometem a articulação temporomandibular do rato.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYERS, N.A.; KAPAS, L.; KRUEGER, J.M. Circadian variation of nitric oxide synthase activity and cytosolic protein levels in rat brain. **Brain Res**, v.707, p.127-130, 1996.
- BEREITER, D.A.; BEREITER, D.F. Morphine and NMDA receptor antagonism reduce c-fos expression in spinal trigeminal nucleus produced by acute injury to the TMJ region. **Pain**, v.85, p.65-77, 2000.
- BEROD, A.; HARTMAN, B.K.; PUJOL, J.F. Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. **J Histochem Cytochem**, v.29, p.844-850, 1981.
- BLOTTNER, D.; GROZDANOVIC, Z.; GOSSRAU, R.; Histochemistry of nitric oxide synthase in the nervous system. **Histochem J**, v.27, p.785-811, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci**, v.87, p.682-685, 1990.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu Rev Biochem**, v.63, p.175-195, 1994.
- BULLITT, E. Induction of c-fos-like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. **Brain Res**, v.493, p.391-397, 1989.

CALLSEN-CENCIC, P.; HOHEISEL, U.; KASKE, A.; MENSE, S.; TENSCHERT, S.

The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or downregulated? **Cell Tissue Res**, v.295, p.183-194, 1999.

CASATTI, C.A.; FRIGO, L.; BAUER, J.A. Origin of sensory and autonomic innervation of the rat temporomandibular joint: a retrograde axonal tracing study with the fluorescent dye fast blue. **J Dent Res**, v.78, p.776-783, 1999.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E.D.; GAZDA, L.S.; ARMSTRONG, C.; WANG, H.; TRACEY, K.J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. **Pain**, v.94, p.231-244, 2001.

CHAKDER, S.; BANDYOPADHYAY, A.; RATTAN, S. Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v. 273, p.1868-1875, 1997.

CURRAN, T.; MORGAN, J.I. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. **Science**, v.229, p.1265-1268, 1985.

DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci**, v.14, p.5147-5159, 1994.

DECARIS, E.; GUINGAMP, C.; CHAT, M.; PHILIPPE, L.; GRILLASCA, J.P.; ABID, A.; MINN, A.; GILLET, P.; NETTER, P.; TERLAIN, B. Evidence for neurogenic transmission inducing degenerative cartilage damage distant from local inflammation. **Arthritis Rheum**, v.42, p.1951-1960, 1999.

- DIEHL, B.; HOHEISEL, U.; MENSE, S. Histological and neurophysiological changes induced by carrageenan in skeletal muscle of cat and rat. **Agents Actions**, v.25, p.210-213, 1988.
- DIEHL, B.; HOHEISEL, U.; MENSE, S. The influence of mechanical stimuli and of acetylsalicylic acid on the discharges of slowly conducting afferent units from normal and inflamed muscle in the rat. **Exp Brain Res**, v.92, p.431-440, 1993.
- DOHRN, C.S.; MULLETT, M.A.; PRICE, R.H.; BEITZ, A.J. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive interneurons in the spinal trigeminal nucleus. **J Comp Neurol**, v.346, p.449-460, 1994.
- DOLAN, S.; FIELD, L.C.; NOLAN, A.M. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. **Pain**, v.86, p.311-320, 2000.
- DONALDSON, K.W. Rheumatoid diseases and the temporomandibular joint: a review. **Cranio**, v.13, p.264-269, 1995.
- DUBNER, R.; BENNETT, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu Rev Neurosci**, v.6, p.381-418, 1983.
- FORSTERMANN, U.; SCHMIDT, H.H.; POLLOCK, J.S.; SHENG, H.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; NAKANE, M.; MURAD, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem Pharmacol**, v.42, p.1849-1857, 1991.
- FORSTERMANN, U.; GORSKY, L.D.; POLLOCK, J.S.; SCHMIDT, H.H.; HELLER, M.; MURAD, F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v.168, p.727-732, 1990.

- GALEA, E.; REIS, D.J.; FOX, E.S.; XU, H.; FEINSTEIN, D.L. CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. **J Neuroimmunol**, v.64, p.19-28, 1996.
- GALLY, J.A.; MONTAGUE, P.R.; REEKE, G.N. Jr.; EDELMAN, G.M. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc Natl Acad Sci**, v.87, p.3547-3551, 1990.
- GARRY, M.G.; WALTON, L.P.; DAVIS, M.A. Capsaicin-evoked release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from the spinal cord is mediated by nitric oxide but not by cyclic GMP. **Brain Res**, v.861, p.208-219, 2000.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci**, v.14, p.60-67, 1991.
- GOBEL, S. Golgi studies in the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. **J Comp Neurol**, v.162, p.397-415, 1975.
- GOFF, J.R.; BURKEY, A.R.; GOFF, D.J.; JASMIN, L. Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. **Neuroscience**, v.82, p.559-574, 1998.
- GREENBERG, M.E.; ZIFF, E.B.; GREENE, L.A. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. **Science**, v.234, p.80-83, 1986.
- GUILBAUD, G.; BENOIST, J.M.; ESCHALIER, A.; GAUTRON, M.; KAYSER, V. Evidence for peripheral serotonergic mechanisms in the early sensitization after carrageenin-induced inflammation: electrophysiological studies in the

- ventrobasal complex of the rat thalamus using a potent specific antagonist of peripheral 5-HT receptors. **Brain Res**, v.502, p.187-197, 1989.
- HAAK, T.; DELVERDIER, M.; AMARDEILH, M.F.; OSWALD, I.P.; TOUTAIN, P.L. Pathologic study of an experimental canine arthritis induced with Complete Freund's Adjuvant. **Clin Exp Rheumatol**, v.14, p.633-641, 1996.
- HANDY, R.L.; MOORE, P.K. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v.37, p.37-43, 1998.
- HARGREAVES, K.M.; TROULLOS, E.S.; DIONNE, R.A.; SCHMIDT, E.A.; SCHAFER, S.C.; JORIS, J.L. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. **Clin Pharmacol Ther**, v.44, p.613-621, 1988.
- HARRIS, J. A. Using c-fos as a neural marker of pain. **Brain Res Bull**, v.45, p.1-8, 1998.
- HARPER, R.P.; KERINS, C.A.; TALWAR, R.; SPEARS, R.; HUTCHINS, B.; CARLSON, D.S.; MCINTOSH, J.E.; BELLINGER, L.L. Meal pattern analysis in response to temporomandibular joint inflammation in the rat. **J Dent Res**, v.79, p.1704-1711, 2000.
- HATHAWAY, C.B.; HU, J.W.; BEREITER, D.A. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. **J Comp Neurol**, v.356, p.444-456, 1995.
- HENDERSON, B; EDWARDS, J.C.W. The synovial lining in health and disease. London, Chapman and Hall, 1987. 375p.

- HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. A block of spinal nitric oxide synthesis leads to increased background activity predominantly in nociceptive dorsal horn neurones in the rat. **Pain**, v.88, p.249-257, 2000.
- HONG, S.K.; HAN, J.S.; MIN, S.S.; HWANG, J.M.; KIM, Y.I.; NA, H.S.; YOON, Y.W.; HAN, H.C. Local neurokinin-1 receptor in the knee joint contributes to the induction, but not maintenance, of arthritic pain in the rat. **Neurosci Lett**, v.322, p.21–24, 2002.
- HONORE, P.; BURITOVA, J.; BESSON, J.M. Carrageenan-evoked c-Fos expression in rat lumbar spinal cord: the effects of indomethacin. **Eur J Pharmacol**, v.272, p.249-259, 1995.
- HUTCHINS, B.; SPEARS, R.; HINTON, R.J.; HARPER, R.P. Calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in rat trigeminal ganglia and brainstem following adjuvant-induced inflammation of the temporomandibular joint. **Arch Oral Biol**, v.45, p.335-345, 2000.
- KIDO, M.A.; KIYOSHIMA, T.; IBUKI, T.; SHIMIZU, S.; KONDO, T.; TERADA, Y.; TANAKA, T. A topographical and ultrastructural study of sensory trigeminal nerve endings in the rat temporomandibular joint as demonstrated by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP). **J Dent Res**, v.74, p.1353-1359, 1995.
- KLATT, P.; SCHMIDT, K.; URAY, G.; MAYER, B. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. **J Biol Chem**, v.268, p.14781-14787, 1993.

- KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci**, v.86, p.5159-5162, 1989.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J**, v.298, p.249-258, 1994.
- KOCHER, L.; ANTON, F.; REEH, P.W.; HANDWERKER, H.O. The effect of carrageenan-induced inflammation on the sensitivity of unmyelinated skin nociceptors in the rat. **Pain**, v.29, p.363-373, 1987.
- KOVACS, K.J.; CAI, Y.; LARSON, A.A. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA is down-regulated, and constitutive NOS enzymatic activity decreased, in thoracic dorsal root ganglia and spinal cord of the rat by a substance P N-terminal metabolite. **Eur J Neurosci**, v.14, p. 577-584, 2001.
- KRUKOFF, T.L.; KHALILI, P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. **J Comp Neurol**, v.377, p.509-519, 1997.
- LAM, H.H.; HANLEY, D.F.; TRAPP, B.D.; SAITO, S.; RAJA, S.; DAWSON, T.M.; YAMAGUCHI, H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. **Neurosci Lett**, v.210, p.201-204, 1996.
- LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. **Neuroreport**, v.8, p.895-899, 1997.
- LAWAND, N.B.; MCNEARNEY, T.; WESTLUND, K.N. Amino acid release into the knee joint: key role in nociception and inflammation. **Pain**, v.86, p.69-74, 2000.

- LEONE, A.M.; PALMER, R.M.; KNOWLES, R.G.; FRANCIS, P.L.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. **J Biol Chem**, v.266, p.23790-23795, 1991.
- LEONG, S.; LIU, H.; YEO, J. Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection. **Brain Res**, v.855, p.107-115, 2000.
- LORTON, D.; LUBAHN, C.; ENGAN, C.; SCHALLER, J.; FELTEN, D.L.; BELLINGER, D.L. Local application of capsaicin into the draining lymph nodes attenuates expression of adjuvant-induced arthritis. **Neuroimmunomodulation**, v.7, p.115-125, 2000.
- LOWENSTEIN, C.J.; GLATT, C.S.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. **Proc Natl Acad Sci**, v.89, p.6711-6715, 1992.
- LUKÁCOVÁ, N.; CIZKOVÁ, D.; MARSALA, M.; JALC, P.; MARSALA, J. Segmental and laminar distributions of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase-expressing and neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons versus radioassay detection of catalytic nitric oxide synthase activity in the rabbit spinal cord. **Neuroscience**, v.94, p.229-237, 1999.
- MAIHÖFNER, C.; EUCHENHOFER, C.; TEGEDER, I.; BECK, K.F.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISSLINGER, G. Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse

- spinal cord following nociceptive stimulation. **Neurosci Lett**, v.290, p.71-75, 2000.
- MARIN, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol Ther**, v.75, p.111-134, 1997.
- MAYER, B.; JOHN, M.; HEINZEL, B.; WERNER, E.R.; WACHTER, H.; SCHULTZ, G.; BOHME, E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. **FEBS Lett**, v.288, p.187-191, 1991.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.; GRZYBYCKI, D.; MURPHY, S.; GEBHART, G.F. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology**, v.33, p.1471-1478, 1994.
- MENETREY, D.; GANNON, A.; LEVINE, J.D.; BASBAUM, A.I. Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. **J Comp Neurol**, v.285, p.177-195, 1989.
- MENSE, S.; HOHEISEL, U.; REINERT, A. The possible role of substance P in eliciting and modulating deep somatic pain. **Prog Brain Res**, v.110, p.125-135, 1996.
- MINC-GOLOMB, D.; TSARFATY, I.; SCHWARTZ, J.P. Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. **Br J Pharmacol**, v.112, p.720-722, 1994.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J**, v.9, p.1319-1330, 1995.

- MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacol Rev**, v.49, p.137-142, 1997.
- NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br J Pharmacol**, v.128, p.853-859, 1999.
- NAZLI, M.; HISMIOGULLARI, E.S.; THIPPESWAMY, T.; MORRIS, R. How central is nitric oxide (NO) to the activation of c-fos in spinal neurones following noxious peripheral stimulation in the rat? **Brain Res**, v.888, p.172-175, 2001.
- NEIL, A.; BENOIST, J.M.; KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Initial nociceptive sensitization in carrageenin-induced rat paw inflammation is dependent on amine autacoid mechanisms: electrophysiological and behavioural evidence obtained with a quaternary antihistamine, thiazinamium. **Exp Brain Res**, v.65, p.343-351, 1987.
- NICKLIN, S.; MILLER, K. Effect of orally administered food-grade carrageenans on antibody-mediated and cell-mediated immunity in the inbred rat. **Food Chem Toxicol**, v.22, p.615-621, 1984.
- NORRIS, P.J.; CHARLES, I.G.; SCORER, C.A.; EMSON, P.C. Studies on the localization and expression of nitric oxide synthase using histochemical techniques. **Histochem J**, v.27, p.745-756, 1995.
- OSBORNE, M.G.; CODERRE, T.J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v.126, p.1840-1846, 1999.

OKESON, J.P. Management of Temporomandibular Disorders and Occlusion (Management of Temporomandibular Disorders & Occlusion), Mosby-Year Book, 3<sup>rd</sup> edition, 1992.

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, p.664-666, 1988a.

PALMER, R.M.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.153, p.1251-1256, 1988b.

PARDUTZ, A.; KRIZBAI, I.; MULTON, S.; VECSEI, L.; SCHOENEN, J. Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. **Neuroreport**, v.11, p.3071-3075, 2000.

PHILIPPE, L.; GEGOUT-POTTIE, P.; GUINGAMP, C.; BORDJI, K.; TERLAIN, B.; NETTER, P.; GILLET, P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. **Am J Physiol**, v.277, p.R1550-R1556, 1997.

POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; SCHMIDT, H.H.; NAKANE, M.; MURAD, F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci**, v.88, p.10480-10484, 1991.

POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; TRACEY, W.R.; NAKANE, M. Nitric oxide synthase isozymes antibodies. **Histochem J**, v.27, p.738-744, 1995.

- POZZA, M.; BETTELLI, C.; MAGNANI, F.; MASCIA, M.T.; MANZINI, E.; CALZA, L. Is neuronal nitric oxide involved in adjuvant-induced joint inflammation? **Eur J Pharmacol**, v.359, p.87-93, 1998.
- RADHAKRISHNAN, R.; MOORE, S.A.; SLUKA, K.A. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain**, v.104, p.567-577, 2003.
- RIVOT, J.P.; MONTAGNE-CLAVEL, J.; BESSON, J.M. Subcutaneous formalin and intraplantar carrageenan increase nitric oxide release as measured by in vivo voltammetry in the spinal cord. **Eur J Pain**, v.6, p.25-34, 2002.
- ROCHE, A.K.; COOK, M.; WILCOX, G.L.; KAJANDER, K.C. A nitric oxide synthesis inhibitor (L-NAME) reduces licking behavior and Fos-labeling in the spinal cord of rats during formalin-induced inflammation. **Pain**, v.66, p.331-341, 1996.
- RODELLA, L.; REZZANI, R.; AGOSTINI, C.; BIANCHI, R. Induction of NADPH-diaphorase activity in the rat periaqueductal gray matter after nociceptive visceral stimulation. **Brain Res**, v.793, p.333-336, 1998.
- SAMBUCETTI, L.C.; CURRAN, T. The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. **Science**, v.234, p.1417-1419, 1986.
- SANTER, V.; SRIRATANA, A.; LOWTHER, D.A. Carrageenin-induced arthritis: V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. **Semin Arthritis Rheum**, v.13, p.160-168, 1983.

- SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. **J Neurophysiol**, v.54, p.1109-1122, 1985.
- SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. **J Physiol**, v.403, p.91-104, 1988.
- SCHAIBLE, H.G.; GRUBB, B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**, v.55, p.5-54, 1993.
- SCHUMAN, E.M.; MADISON, D.V. Nitric oxide and synaptic function. **Annu Rev Neurosci**, v.17, p.153-183, 1994.
- SESSA, W.C. The nitric oxide synthase family of proteins. **J Vasc Res**, v.31, p.131-143, 1994.
- SESSLE, B.J. The neurobiology of facial and dental pain: present knowledge, future directions. **J Dent Res**, v.66, p.962-981, 1987.
- SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N. Spinal cord amino acid release and content in an arthritis model: the effects of pretreatment with non-NMDA, NMDA, and NK1 receptor antagonists. **Brain Res**, v.627, p.89-103, 1993.
- SLUKA, K.A.; BAILEY, K.; BOGUSH, J.; OLSON, R.; RICKETTS, A. Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. **Pain**, v.77, p.97-102, 1998.
- SLUKA, K.A. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. **J Neurosci**, v.22, p.5687-5693, 2002.

- SORKIN, L.S.; MOORE, J.H. Evoked Release of Amino Acids and Prostanoids in Spinal Cords of Anesthetized Rats: Changes During Peripheral Inflammation and Hyperalgesia. **Am J Ther**, v.3, p.268-275, 1996.
- STANFA, L.C.; MISRA, C.; DICKENSON, A.H. Amplification of spinal nociceptive transmission depends on the generation of nitric oxide in normal and carrageenan rats. **Brain Res**, v.737, p.92-98, 1996.
- STUEHR, D. J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci**, v.82, p.7738-7742, 1985.
- STUEHR, D.J.; KWON, N.S.; NATHAN, C.F.; GRIFFITH, O.W.; FELDMAN, P.L.; WISEMAN, J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **J Biol Chem**, v.266, p.6259-6263, 1991.
- TAKEMURA, M.; SHIMADA, T.; SUGIYO, S.; NOKUBI, T.; SHIGENAGA, Y. Mapping of c-Fos in the trigeminal sensory nucleus following high- and low-intensity afferent stimulation in the rat. **Exp Brain Res**, v.130, p.113-123, 2000.
- TAKEUCHI, Y.; ZEREDO, J.L.; FUJIYAMA, R.; AMAGASA, T.; TODA, K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. **Neurosci Lett**, v.354, p.172-174, 2004.
- TAO, F.; TAO, Y.X.; MAO, P.; ZHAO, C.; LI, D.; LIAW, W.J.; RAJA, S.N.; JOHNS, R. A. Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Neuroscience**, v.120, p.847-854, 2003.

TAO, F.; TAO, Y.X.; ZHAO, C.; DORE, S.; LIAW, W.J.; RAJA, S.N.; JOHNS, R.A.

Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. **Neuroscience**, v.128, p.421-430, 2004.

TEIXEIRA, S.A.; CASTRO, G.M.; PAPES, F.; MARTINS, M.L.; ROGERIO, F.;

LANGONE, F.; SANTOS, L.M.; ARRUDA, P.; DE NUCCI, G.; MUSCARA, M.N. Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. **Brain Res Mol Brain Res**, v.99, p.17-25, 2002.

TRAUB, R.J.; SOLODKIN, A.; GEBHART, G.F. NADPH-diaphorase histochemistry

provides evidence for a bilateral, somatotopically inappropriate response to unilateral hindpaw inflammation in the rat. **Brain Res**, v.647, p.113-123, 1994.

UDDMAN, R.; GRUNDITZ, T.; KATO, J.; SUNDLER F. Distribution and origin of

nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. **Anat Embryol**, v.197, p.273-282, 1998.

WANG, T.; FITZGERALD, T.J.; HAREGEWOIN, A. Differential expression of nitric

oxide synthases in EGF-responsive mouse neural precursor cells. **Cell Tissue Res**, v.296, p.489-497, 1999.

WHITE, K.A.; MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type

hemoprotein. **Biochemistry**, v.31, p.6627-6631, 1992.

WHITTLE, B.J. Nitric oxide in physiology and pathology. **Histochem J**, v.27,

p.727-737, 1995.

- WIDENFALK, B.; WIBERG, M. Origin of sympathetic and sensory innervation of the temporomandibular joint. A retrograde axonal tracing study in the rat. **Neurosci Lett**, v.109, p.30-35, 1990.
- WU, L.; LIN, Q.; LU, Y.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. **Exp Brain Res**, v.118, p.457-465, 1998.
- WU, J.; FANG, L.; LIN, Q.; WILLIS, W.D. Fos expression is induced by increased nitric oxide release in rat spinal cord dorsal horn. **Neuroscience**, v.96, p.351-357, 2000.
- WU, J.; FANG, L.; LIN, Q.; WILLIS, W.D. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. **Pain**, v.94, p.47-58. 2001.
- YEO, J.F.; TANG, F.R.; LEONG, S.K. Ultrastructural study of NADPH-d positive neurons in laminae I and II of the rat caudal spinal trigeminal nucleus. **Int J Neurosci**, v.91, p.29-43, 1997.
- YEO, J. F. Does nitric oxide plays a role in orofacial pain transmission? **Ann N Y Acad Sci**, v.962, p.151-60, 2002.
- YONEHARA, N.; TAKEMURA, M.; YOSHIMURA, M.; IWASE, K.; SEO, H.G.; TANIGUCHI, N.; SHIGENAGA, Y. Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant-induced hyperalgesia. **Jpn J Pharmacol**, v.75, p.327-35, 1997.
- YONEHARA, N.; YOSHIMURA, M. Effect of nitric oxide on substance P release from the peripheral endings of primary afferent neurons. **Neurosci Lett**, v.271, p.199-201, 1999.

- YONEHARA, N.; AMANO, K.; KAMISAKI, Y. Involvement of the NMDA-nitric oxide pathway in the development of hypersensitivity to tactile stimulation in dental injured rats. **Jpn J Pharmacol**, v.90, p.145-155, 2002.
- YONEHARA, N.; KUDO, C.; KAMISAKI, Y. Involvement of NMDA-nitric oxide pathways in the development of tactile hypersensitivity evoked by the loose-ligation of inferior alveolar nerves in rats. **Brain Res**, v.963, p.232-243, 2003.
- YU, W.; JUANG, S.; LEE, J.; LIU, T.; CHENG, J. Decrease of neuronal nitric oxide synthase in the cerebellum of aged rats. **Neurosci Lett**, v.291, p.37-40, 2000.
- ZHOU, Q.; IMBE, H.; DUBNER, R.; REN, K. Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. **J Comp Neurol**, v.412, 276-291, 1999.
- ZHU, B.; HERBERT, J. Angiotensin II interacts with nitric oxide-cyclic GMP pathway in the central control of drinking behaviour: mapping with c-fos and NADPH-diaphorase. **Neuroscience**, v.79, p.543-553, 1997.

## **8. FIGURAS E LEGENDAS DO ITEM RESULTADOS**

Figura 3. Fotomicrografia em microscopia de luz de cortes histológicos frontais da articulação temporomandibular do rato dos diferentes grupos experimentais, com 5  $\mu$ m de espessura, corados pelo método do H.E. A-B: articulação do grupo controle total. Observar ausência de processo inflamatório no espaço supradiscal. B: Ampliação da área retangular destacada em A. Observar a espessura habitual da membrana sinovial normal (seta) e a ausência de leucócitos no espaço articular. C-D: articulação do grupo pseudo-operado. Observar a semelhança histológica com a articulação do grupo controle total. E-F: articulação do grupo artrite aguda, 24 horas após indução da artrite pela carragenina. Observar a presença do infiltrado inflamatório no espaço articular supradiscal aumentado (seta). F: Ampliação da área retangular destacada em E. Observar que a membrana sinovial não revela a típica camada íntima (cabeças de setas) em decorrência da intensa migração de leucócitos e proteínas plasmáticas para o espaço articular (seta e asterisco). G-H: articulação do grupo artrite crônica, 15 dias após a indução pela carragenina. Notar a presença de “rice bodies” (setas) e uma vilosidade sinovial no espaço articular supradiscal. H: Ampliação da área retangular destacada em G. Observar que o infiltrado inflamatório consiste de leucócitos mononucleados, principalmente macrófagos dispostos no “rice bodies” (seta). A camada íntima da vilosidade sinovial exibe um espessamento celular (cabeças de setas). I-J: articulação do grupo artrite crônica-agudizada, 15 dias/24 horas após a indução por carragenina. Observar a presença de intenso infiltrado inflamatório no espaço articular supradiscal expandido (setas e asteriscos). J: Ampliação da área retangular destacada em I. Observar a superfície da membrana sinovial (linha pontilhada) e a intensa presença de leucócitos (neutrófilos polimorfonucleares) e proteínas plasmática no espaço articular supradiscal da articulação (setas e asteriscos). Abreviações: DA, disco articular; LI, ligamento intra-articular; EI, espaço articular infradiscal; CM, côndilo da mandíbula; ES, espaço articular supradiscal; OT, osso temporal.

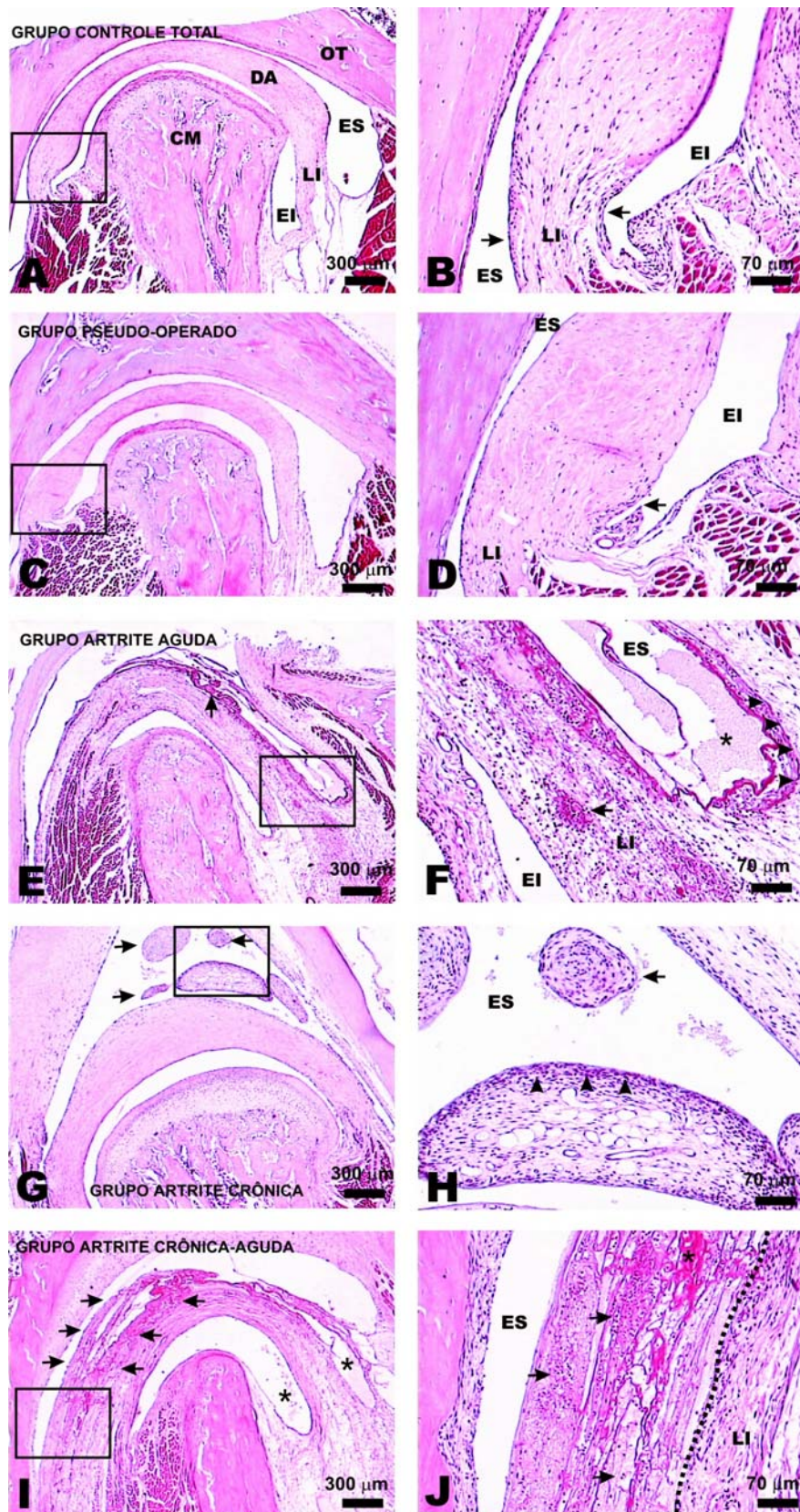


Figura 4. Fotomicrografia em microscopia de luz de cortes histológicos frontais da parte caudal do núcleo espinal do trigêmeo (Sp5C) submetido ao método imunoistoquímico para evidenciar perfis neuronais imunorreativos a nNOS (A-D) e nNOS/Fos (E-F) de animais com artrite unilateral induzida por carragenina na articulação temporomandibular do grupo crônico-agudizado (15 dias/24 horas). A: observar o padrão de marcação imunoistoquímico para nNOS no Sp5C. B: porção dorsomedial do Sp5C ilustrando o elevado número de neurônios nNOS principalmente localizado na lâmina II. C: ampliação das lâminas profundas do Sp5C mostrada em B. Observar que os neurônios nNOS são fusiformes e multipolares (cabeça de seta) com projeções (setas pequenas) para as lâminas superficiais do Sp5C. D: porção ventrolateral do Sp5C, ilustrando neurônios nNOS nas lâminas superficiais do Sp5C. Observar que a maior parte dos neurônios nNOS exibe morfologia oval na lâmina II e, ocasionalmente, fusiforme (cabeça de seta) na lâmina I. E-F: Dupla marcação imunoistoquímica evidenciando perfis neuronais nas lâminas superficiais do Sp5C. Observar os neurônios imunorreativos a nNOS/Fos (setas grandes), nNOS (cabeças de setas) e Fos (setas pequenas). Abreviações: CU, núcleo cuneiforme; Cuf, fascículo cuneiforme; DMX, núcleo motor dorsal do nervo vago; grf, fascículo grácil; MDRNd, núcleo reticular medular, parte dorsal; MDRN, núcleo reticular medular, parte ventral; NTS, núcleo do trato solitário; Pyd, trato piramidal; rust, trato rubrospinal; Sp5C, parte caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo; spt5, trato espinal do nervo trigêmeo; tsp, trato espino-talâmico.

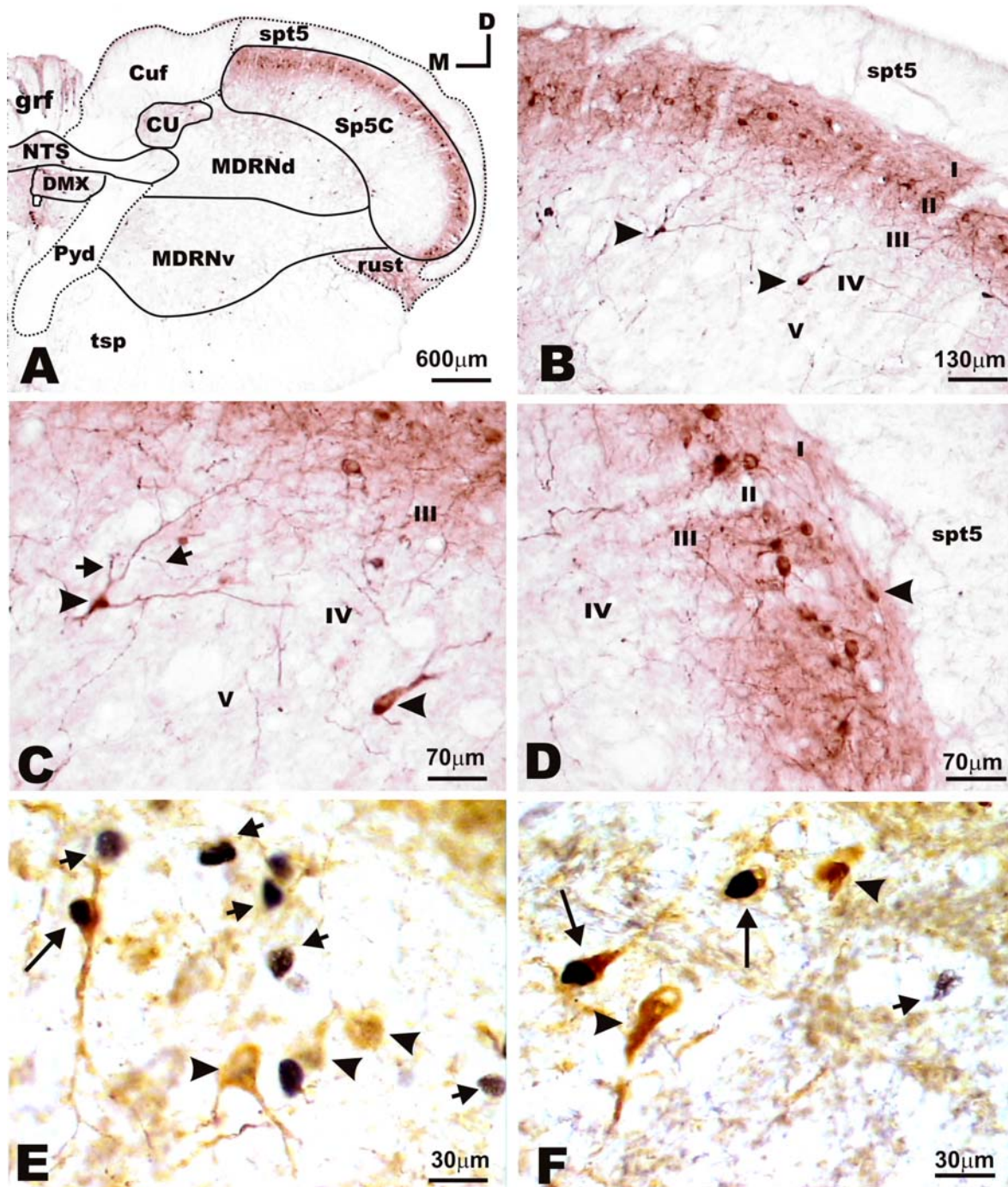


Figura 5. Gráfico da porcentagem (média e erro padrão) de perfis neuronais nucleados nNOS no Sp5C de ratos (n=5) dos grupos com artrite (aguda, crônica e crônica-agudizada) unilateral induzida na articulação temporomandibular do rato, em relação aos seus respectivos grupos pseudo-operados. Observar que em todas as fases da artrite houve um discreto aumento bilateral na porcentagem de perfis neuronais nNOS, mas sem diferença estatística. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, submentido ao *post test* de Dunns, considerando  $P < 0,05$  como significante.

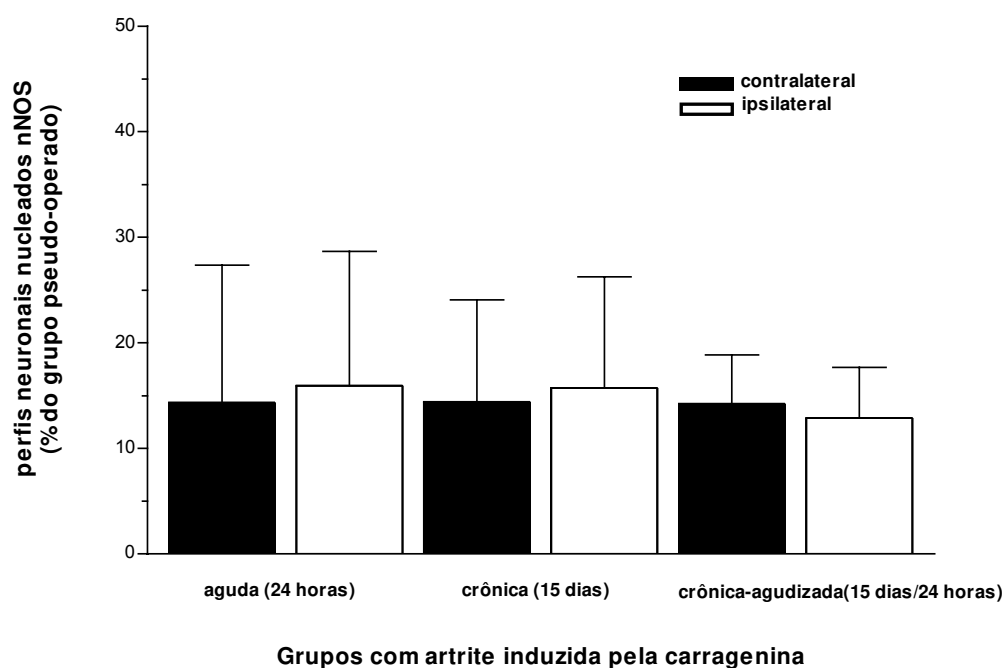
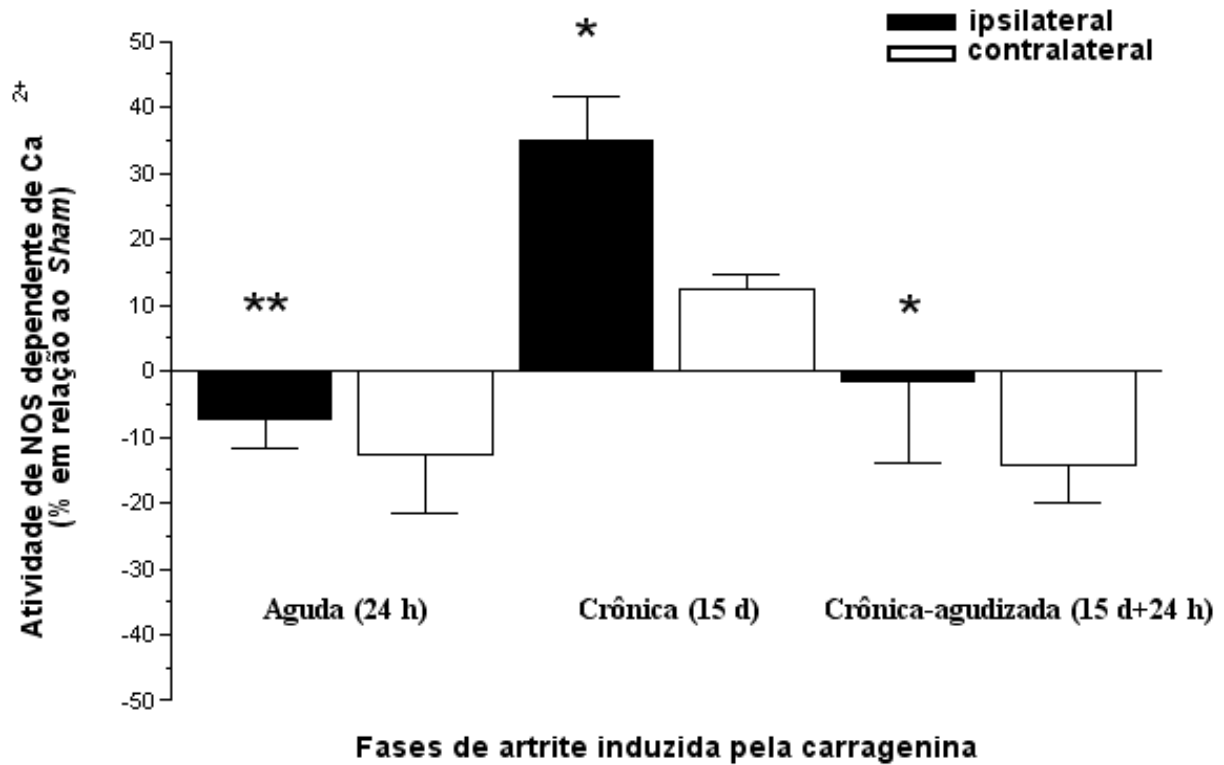


Figura 6. Gráfico da porcentagem (média e erro padrão) das atividades enzimáticas da NOS  $\text{Ca}^{+2}$ -dependente mensuradas nos lados ipsilateral e contralateral do Sp5C do rato nos grupos com artrite unilateral induzida por carragenina na articulação temporomandibular (aguda, crônica e crônica-agudizada) em relação aos seus respectivos grupos pseudo-operados. Observar que no lado ipsilateral do Sp5C no grupo crônico houve um aumento estatisticamente significativo na atividade da NOS quando comparado com os grupos com artrite aguda (\*\*,  $P < 0,01$ ) e crônica-agudizada (\*,  $P < 0,05$ ), além do seu respectivo grupo pseudo-operado (\*,  $P < 0,05$ ). Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, seguido de *post-test* de Tukey-Kramer, considerando  $P < 0,05$  como significativo.



## GRUPOS EXPERIMENTAIS

|            | AGUDO    |         |         | CRÔNICO  |         |         | CRÔNICO-AGUDO |         |         | CT      |
|------------|----------|---------|---------|----------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|
|            | C        | PO      | CA      | C        | PO      | CA      | C             | PO      | CA      |         |
| POR CORTE  |          |         |         |          |         |         |               |         |         |         |
| IPSI       | 55±6     | 48±4    | 47±2    | 62±5     | 53±2    | 55±5    | 60±2          | 52±6    | 48±2    | 44±6    |
| CONTRA     | 56±6     | 50±3    | 48±4    | 61±6     | 53±2    | 54±0    | 58±3          | 51±4    | 47±4    | 48±6    |
| TOTAL      | 111±5    | 98±3    | 95±3    | 119±5    | 104±4   | 118±5   | 119±4         | 105±5   | 93±4    | 96±5    |
| POR ANIMAL |          |         |         |          |         |         |               |         |         |         |
| IPSI       | 703±80   | 615±55  | 629±33  | 790±67   | 690±22  | 627±99  | 775±32        | 679±51  | 596±36  | 616±11  |
| CONTRA     | 727±80   | 626±25  | 628±40  | 788±72   | 681±26  | 615±88  | 759±32        | 672±41  | 580±47  | 648±52  |
| TOTAL      | 1361±141 | 1238±78 | 1256±68 | 1632±130 | 1371±36 | 1421±60 | 1535±58       | 1351±92 | 1176±82 | 1277±72 |

Tabela 1. Média e erro padrão da quantidade de perfis neuronais nucleados imunoativos a nNOS por corte histológico do Sp5C e por animal dos grupos com artrite (aguda, crônica e crônica-agudizada) unilateral induzida pela carragenina (C) na articulação temporomandibular do rato, além de seus grupos controle (PO, pseudo-operado; CA, controle anestésico; CT, controle total). Os dados foram coletados de 13 cortes histológicos do Sp5C (-13,8 a -15,3, coordenada estereotóxica usando o bregma como ponto de referência) provenientes de 5 animais por grupo experimental.

| GRUPOS EXPERIMENTAIS |         |         |         |         |         |         |               |         |         |         |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|
| AMOSTRAS             | AGUDO   |         |         | CRÔNICO |         |         | CRÔNICO-AGUDO |         |         | CT      |
|                      | C       | PO      | CA      | C       | PO      | CA      | C             | PO      | CA      | CT      |
|                      | C       | PO      | CA      | C       | PO      | CA      | C             | PO      | CA      | CT      |
| IPSI                 | 3.9±0.2 | 4.3±0.1 | 4.2±0.2 | 5.5±0.3 | 4.3±0.2 | 4.7±0.4 | 4.8±0.6       | 4.4±0.2 | 3.0±0.1 | 4.5±0.2 |
| CONTRA               | 3.6±0.4 | 4.1±0.1 | 3.7±0.3 | 4.9±0.1 | 4.3±0.1 | 4.5±0.2 | 4.0±0.3       | 4.4±0.8 | 3.4±0.1 | 4.4±0.2 |

Tabela 2. Média e erro padrão dos valores absolutos da atividade da NOS Ca<sup>+2</sup>-dependente medidas nos lados ipsilateral e contralateral do Sp5C do ratc grupos com artrite unilateral na articulação temporomandibular (aguda, crônica e crônica-agudizada) e nos grupos controles (PO, pseudo-operado; anestésico; CT, controle total). Foram utilizadas cinco amostras, cada uma constituída por três espécimes do Sp5C (n=15) para cada grupo experime

**APÊNDICE – TEXTO DO ARTIGO SUBMETIDO  
PARA PUBLICAÇÃO**

**Expression and activity of nitric oxide synthase isoenzymes in the spinal trigeminal subnucleus caudalis following carrageenan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint**

Silvia A. Tesser Viscaino<sup>a,b</sup>, Alexandre Denadai-Souza<sup>c, e</sup>, Simone A. Teixeira<sup>e</sup>,  
Edilson Ervolino<sup>c,d</sup>, Oisenyl J. Tamega<sup>f</sup>; Roelf J. Cruz-Rizzolo<sup>c</sup>; Marcelo N.  
Muscará<sup>e</sup>, Cláudio A. Casatti<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, 13084-971.*

*Campinas – São Paulo, Brazil*

<sup>b</sup>*Central Paulista University Center - UNICEP, 13563-470. São Carlos – São Paulo, Brazil*

<sup>c</sup>*Department of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, State University of São Paulo - UNESP, 16015-050, Araçatuba – São Paulo, Brazil*

<sup>d</sup>*Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo - USP, 05508-900, São Paulo – São Paulo, Brazil*

<sup>e</sup>*Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo – USP, 05508-900, São Paulo – São Paulo, Brazil*

<sup>f</sup>*Department of Anatomy, Institute of Biosciences, São Paulo State University - UNESP, 18618-000, Botucatu – São Paulo, Brazil*

**Total number of pages: 50**

**Total number of tables and figures: 7**

**Correspondence and reprint requests to:**

Dr. Claudio A. Casatti

Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Universidade Estadual de São Paulo – UNESP

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça

16015-050, Araçatuba, São Paulo, SP, Brasil

Phone: +55 (18) 6203308; fax: +55 (18) 6244890

e-mail: ccasatti@foa.unesp.br

**Keywords:** Arthritis; Immunohistochemistry; Nitric-Oxide Synthase; Radiometry; Trigeminal Caudal Nucleus; Temporomandibular Joint.

**Abstract**

Nitric oxide has been implicated in hyperalgesia modulation accompanying peripheral inflammation. We analyzed the effects of carrageenan-induced arthritis (CIA) in the unilateral temporomandibular joint (TMJ) on immunoreactivity, gene expression and activities of nitric oxide synthases (nNOS, iNOS and eNOS) in the caudal part of the rat spinal trigeminal nucleus (Sp5C) during the acute, chronic and chronic-active phases. Double immunohistochemistry was used to determine the percentage of Fos induction in nNOS neurons. Numbers of nNOS-like immunoreactive (nNOS-LI) neurons in the Sp5C were elevated, being slightly higher, bilaterally, in the acute, chronic and chronic-active phases of CIA when compared to the respective sham groups, although the difference was less than statistically significant. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed nNOS and eNOS expressions, without noticeable differences

among the groups. A discrete percentage of nNOS-LI neurons expressed Fos immunoreactivity in all experimental groups. No iNOS-LI neurons were detected in the Sp5C by either immunohistochemistry or RT-PCR.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity in the ipsilateral Sp5C was significantly higher ( $P<0.05$ ) in animals in the chronic phase than in those in the acute phase, chronic-active phase or in the sham group. In conclusion, since there is a large population of nNOS-LI neurons in the rat Sp5C under normal conditions and during arthritis in the TMJ, nitric oxide seems to play an important role in nociceptive processing. In addition, changes in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity in chronic arthritis show that nitric oxide may play a role in the central nociceptive mechanism occurring in Sp5C during long-term TMJ arthritis.

## **1. Introduction**

Temporomandibular disorders are referred to as usual dysfunctions associated with the craniomandibular articulation, which is a complex synovial system, bilaterally composed of the temporomandibular joint (TMJ) and neighboring masticatory muscles (Okeson, 2002). Pathological alterations of the TMJ often cause primary hyperalgesia and subsequent effects such as secondary hyperalgesia, allodynia and referred pain, suggesting that central and peripheral neural mechanisms are involved in this painful process (Sessle et al., 2000). Nociceptive inputs from the TMJ region converge mainly in the caudal part of the spinal trigeminal nucleus (Sp5C), which is the largest subdivision of the trigeminal brainstem sensory nuclear complex (Bereiter et al., 2000; Sessle, 2000).

In the Sp5C and spinal dorsal horn, there is a substantial population of neurons that produce the free radical nitric oxide (NO), a molecule thought to be an important neuromediator of nociceptive processing (Dun et al., 1993; Dhorn et al., 1994; Yeo, 2000). Generated during the oxidation of L-arginine to L-citrulline, NO is mediated by a group of enzymes known as the NO synthase (NOS) family. Neuronal and endothelial NOS (nNOS and eNOS, respectively) isoenzymes are  $\text{Ca}^{2+}$  dependent and constitutively expressed, whereas the inducible NOS (iNOS) isoenzyme is  $\text{Ca}^{2+}$  independent (Bredt and Snyder, 1994). Studies dealing with induced peripheral inflammation have revealed that NOS expression in the central nervous system is differentially regulated, depending on the target organ and the pro-inflammatory agent employed (Calsen-Cencic et al., 1999). There have only been a few studies analyzing NOS isoenzyme expression in the central nervous system during arthritis, and those have been controversial. Polyarthritis induced in rats by subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant (CFA) resulted in a slight decrease in the number of neurons expressing nNOS mRNA in the superficial layers of the dorsal horn (Pozza et al., 1998). Arthritis induced by CFA injection into the knee joint has been shown to result in increased immunoreactivity of both nNOS and iNOS, respectively, in neurons and ependymal cells of the rat spinal cord (Wu et al., 1998). In addition, the use of double-label immunohistochemistry for nNOS and Fos protein has revealed that, in the trigeminal system and spinal dorsal horn, nNOS neurons are not significantly activated when formalin or mustard oil are injected into the rat face or paw, respectively (Nazli et al., 2001; Leong et al., 2000; Yeo, 2000).

In the present study, in order to evaluate the possible modulation of NO production in the Sp5C after carrageenan-induced unilateral TMJ arthritis in rats, we analyzed nNOS, iNOS and eNOS expression and activity by using immunohistochemistry, radiometric assay and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), as well as double-label immunohistochemistry for nNOS and Fos during the acute, chronic and chronic-active phases of the inflammatory process.

## **2. Methods**

### **2.1. Animals**

Male Wistar rats (250-300 g) were housed five animals per cage, maintained on a 12-h light/12-h dark cycle in a temperature-controlled environment ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $50\pm 10\%$  relative humidity) and given food and water *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Research and Animal Care of the School of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University (UNESP). The animals were anesthetized with chloral hydrate (0.4 g/kg i.p.) prior to the experimental procedures, and all animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.) prior to sacrifice.

### **2.2. Experimental groups**

Arthritis was induced by unilateral intra-articular injection of 5  $\mu\text{l}$  of a 10% carrageenan gel formulation (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) into the left TMJ. Animals in the various groups were sacrificed at different time points. Carrageenan-induced arthritis (CIA) was analyzed at 24 h (acute phase), 15 days

(chronic phase) and 24 h after a second carrageenan injection on day 14 (chronic-active phase). Sham (injected with 5  $\mu$ l of sterile saline, pH 7.2) and anesthesia control groups were sacrificed and analyzed at parallel time points. One naïve group (comprising animals not submitted to any experimental procedure prior to sacrifice) was also included.

### **2.3. Histological analysis**

Two animals from each experimental group were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and sacrificed by transcardiac perfusion, via the aorta, with 100 ml of 0.9% saline followed by 700 ml of a fixative solution containing 4% formaldehyde buffered in 0.1 M sodium tetraborate, pH 9.5, at 4°C (Sigma). The ipsilateral and contralateral TMJ were collected, postfixed overnight in the same fixative solution at 4°C, and decalcified with a 10% EDTA solution in PBS at 4°C for 20 days. The TMJs were submitted to routine histological procedures for paraffin embedding and 5- $\mu$ m thick sections were stained with hematoxylin and eosin for observation under light microscopy.

### **2.4. Immunohistochemistry**

Five animals from each experimental group were anesthetized and perfused as described above, always in the same time of the day (between 9 am and 11 am). The brainstems were removed and cryoprotected overnight in a solution containing 30% sucrose in 0.1 M potassium PBS (KPBS), pH 7.4, at 4°C. Four series of coronal sections (16- $\mu$ m thick) were cut on a freezing microtome (SM2000R; Leica

Instruments, Nussloch, Germany) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in antifreeze solution. One series of sections from the Sp5C were submitted to immunohistochemistry using the immunoperoxidase method. These sections were rinsed with 0.1 M KPBS, pH 7.4, and pretreated with 0.3% hydrogen peroxide in order to inactivate endogenous peroxidase. After several rinses with KPBS (in order to clear bubbles), the sections were incubated with a rabbit polyclonal anti-nNOS antibody (1:300, k-20/sc 1025, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 48 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . The sections were rinsed and incubated with a biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG 1:1.000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 90 min at room temperature, followed by incubation with the avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (1:500, Vector Laboratories) for 1 h at room temperature and reaction with 3,3'-diaminobenzidine and 0.3% hydrogen peroxide. The sections were mounted on glass slides, dehydrated and coverslipped.

Additional series were submitted to double labeling for nNOS and Fos protein. In brief, the sections were incubated with rabbit polyclonal anti-Fos antibody (1:10,000; Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA) for 48 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , a secondary biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:1.000, Vector Laboratories) for 90 min at room temperature and ABC system (1:500, Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. The reaction product was visualized using the DAB nickel-enhanced glucose oxidase method, as described by Leman and Sequeira (2002), which results in black nuclear staining. The same sections were then processed for nNOS detection as previously described except for the reaction product visualization, which was performed without nickel-

enhancement, thus resulting in brown cytoplasmic staining. Subsequently, the sections were mounted, dehydrated and coverslipped.

Some sections were also incubated with a mouse monoclonal anti-iNOS primary antibody (1:50-200, 610329; BD Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA) for 48 h at 4°C, followed by the species-specific secondary antibody, and developed as previously described for nNOS. The efficiency of the anti-iNOS antibody was determined in sections obtained during the healing process that followed tooth extractions in other animals. Parallel to each immunoperoxidase reaction, the protocol described above was performed in an identical manner except for the omission of the primary antibodies.

The quantification of nNOS-like immunoreactive (nNOS-LI) and nNOS-/Fos-like immunoreactive (Fos-LI) nucleated neuronal profiles in the Sp5C was carried out under light microscopy in sections located between the stereotaxic coordinates -13.8 and -15.3 (13 nNOS-LI sections and 5 nNOS-/Fos-LI sections), using bregma as the reference point. These counts were performed by an observer blinded to the origin of the samples. Since a stereological approach was not used in this study, the actual number of neurons designated as nucleated neuron profiles may have been over- or underestimated.

## **2.5. Measurement of *ex-vivo* NOS activity**

Samples from the ipsilateral and the contralateral Sp5C were obtained from each experimental group, always collected at approximately the same time of the day (between 9 am and 11 am). The samples were weighed and homogenized (pooling 3 tissue samples per homogenate) with 5 mL of 50 mM Tris buffer, pH 7.4, containing 1 mM L-citrulline, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL soybean trypsin

inhibitor, 2 µg/mL aprotinin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The NOS activity was estimated by the rate of conversion of [<sup>3</sup>H]L-arginine to [<sup>3</sup>H]L-citrulline in the presence of NADPH, as previously described (Faria et al., 1997). Pharmacological controls of the enzyme activity were performed in parallel and consisted of either the omission of CaCl<sub>2</sub> and addition of 1 mM EGTA or the addition of 1 mM L-NAME to the incubation medium. To characterize the dependence of NOS isoenzymes on cofactors, Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent NOS activities were measured in the presence of exogenously-added 10 µM flavin adenine dinucleotide, 10 µg/ml calmodulin and 100 µM tetrahydrobiopterin, as described in a previous study (Hiki et al., 1992).

## **2.6. RT-PCR for nNOS, iNOS and eNOS**

Samples from the ipsilateral and the contralateral Sp5C were obtained from three rats of each experimental group, and total RNA was extracted by the TRIZOL reagent method according to the manufacturer protocol (GIBCO-BRL, USA). In addition, cDNA was synthesized from 10 µg of total RNA using Superscript II (Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) according to the manufacturer protocol. The cDNA samples were stored at -20°C until use. The primers employed for nNOS and iNOS were based on the nucleotide sequences previously reported, respectively, by Swain et al. (1997) and Ferraz et al. (1997), which resulted in products of 560 bp and 651 bp, respectively. The PCR reactions were performed according to the protocol previously described by Teixeira et al. (2002), using GAPDH as an internal control. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gels, and the ethidium bromide-stained bands

were visualized under UV light. The images were captured and digitalized using a Chemilmager 5500 system (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). In order to determine the relative degree of expression of the NOS isoforms, the band intensities were measured by densitometry.

## **2.7. Statistical Analysis**

The total number of ipsilateral and contralateral nNOS-LI and nNOS-LI/Fos-LI nucleated neuron profiles counted for each group, as well as the data from *ex-vivo* NOS activity quantification, are expressed as mean  $\pm$  SEM. The immunohistochemical data was analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test, considering *P* values  $<0.05$  as statistically significant. *Ex-vivo* NOS activity data were analyzed by ANOVA, followed by the Tukey-Kramer post-test, in which the level of statistical significance was also set at  $P<0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1. Histological analysis**

Analysis of TMJ sections showed that, in naïve (Figures 1A and 1B), anesthetized and sham (Figures 1C and 1D) groups, there was a normal histological pattern, without any inflammatory process. In the acute group, there was an intense inflammatory infiltrate composed mainly of polymorphonuclear neutrophils in the connective tissue and supradiscal articular space (Figures 1E and 1F), characteristic of the acute phase of arthritis. In the chronic group, there was a

moderate inflammatory infiltrate consisting of mononuclear cells distributed throughout TMJ regions (Figures 1G and 1H). There was an increase in the thickness of the synovial intima, caused by a large number of macrophages (Figures 1G and 1H). The subsynovial connective tissue was infiltrated primarily by macrophages but also by lymphocytes and plasma cells. In the supradiscal articular space, an agglomeration of macrophages, known as “rice bodies”, was observed, together with an increase in the quantity of synovial villi (Figures 1G and 1H), typical of chronic arthritis. In the chronic-active group, the TMJ showed pronounced acute inflammation in the supradiscal space, with an abundance of polymorphonuclear neutrophils, as well as an agglomeration of macrophages in the synovial and subsynovial layers (Figures 1I and 1J), characteristic of the chronic-active phase of arthritis. It is of note that the inflammatory process was restricted to the TMJ compartment, and did not spread to adjacent territories, such as muscles, nerves (auriculotemporal nerve, mandible nerve and masseteric nerve), the parotid gland and facial skin.

### **3.2. Immunohistochemistry**

The nNOS-LI nucleated neuron profiles (nNOS-LI neurons) in the Sp5C showed cytoplasmic immunoreactivity in the cell body, dendrites and axons (Figure 2). These nNOS-LI neurons were widely distributed throughout the superficial lamina (II) and were present in smaller numbers in the deeper lamina (Figure 2). In the superficial lamina, these neurons exhibited mainly oval morphology, whereas they were primarily fusiform in the deeper lamina (Figure 2). In all experimental groups, nNOS-LI neurons were distributed throughout the entire rostrocaudal extension of the Sp5C, with a clear preponderance in the medial and caudal parts of this

subnucleus. For each Sp5C hemisection obtained from naïve group animals,  $44 \pm 6$  to  $48 \pm 6$  nNOS-LI neurons were counted (Table 1). We observed homogenous distribution of nNOS-LI neurons in the various control groups and slightly higher nNOS-LI neuron numbers in the CIA groups (Table 1). No statistically significant differences were observed among the control groups (naïve, sham and anesthetized groups). This suggests that anesthesia and surgical procedures had no effect on the number of nNOS-LI neurons in the Sp5C. Therefore, data relating to nNOS-LI neurons in the CIA groups were compared with those from the respective sham groups, since such comparison allowed us to evaluate, in isolation, the influence of CIA on nNOS-LI neurons in the Sp5C. When this approach was adopted, the percentage of nNOS-LI neurons in the Sp5C was greater ipsilaterally (14%) and contralaterally (from 13% to 16%) in the CIA groups than in their respective sham groups, although the differences were less than statistically significant (Figure 3). In addition, no statistically significant differences were observed over the course of arthritis evolution, when such comparisons were made among the CIA groups. Using immunohistochemistry, no iNOS was detected in the Sp5C cells from any experimental group.

In order to determine whether nNOS-LI neuron profiles in the Sp5C also exhibited Fos-LI, we employed double-label immunohistochemistry. The number of Fos-LI neuron profiles was significantly higher in the acute ( $44 \pm 6\%$ ,  $P < 0.05$ ) and chronic-active groups ( $45 \pm 5\%$ ,  $P < 0.05$ ) than in the chronic group ( $25 \pm 6\%$ ,  $P < 0.05$ ) than in the respective sham groups. The control groups showed no significant change in the number of Fos-LI neurons in relation to the sham groups. In the CIA groups,

the Fos-LI neuron profiles were bilaterally distributed in the superficial lamina (I-II), although most were observed in the deeper lamina (III-VI). The nNOS-LI/Fos-LI neuron profiles exhibited unmistakable black nuclear and brown cytoplasmic staining (Figure 2) and were located in the superficial lamina (II-III). In spite of the considerably higher numbers of Fos-LI neuron profiles in the CIA groups, the percentage of nNOS-LI neuron profiles that exhibited Fos-LI was discrete (from 3% to 14%). No statistically significant differences in the percentage of nNOS-LI/Fos-LI neuron profiles were observed among the CIA and sham groups.

### **3.3. *Ex-vivo* NOS activity quantification**

We measured the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent NOS activity in ipsilateral and contralateral Sp5C samples following the induction of acute, chronic and chronic-active CIA in the left TMJ. Activity levels, expressed as pmol L-citrulline/mg of protein/min, were then compared to the respective control groups. In comparison to data from the respective sham groups, the values of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity remained virtually unchanged in the acute and chronic-active phases and were higher bilaterally in the chronic phase of CIA (Table 2). When values of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity in the different phases of CIA were expressed as percent of sham data, the values for the acute and chronic-active phases of arthritis were comparable to those for the respective sham groups. In contrast, an increase was observed in the chronic phase ( $34.8 \pm 6.8\%$  and

12.4±2.3%, ipsilateral and contralateral, respectively). There was a statistically significant difference between the ipsilateral activity seen in the chronic phase and that observed in the acute ( $P<0.01$ ) and chronic-active phases ( $P<0.05$ ) (Figure 4). The  $\text{Ca}^{2+}$ -independent NOS activity remained extremely low (or even undetectable) in many samples, ranging from 0.06±0.02 to 0.22±0.04 pmol L-citrulline/mg protein/min in the different phases of CIA, without significant differences in relation to the respective control groups, even when the NOS cofactors CaM (10 µg/ml), FAD (10 (M) and BH4 (100 (M) were exogenously added (data not shown).

#### **3.4. RT-PCR analysis of nNOS, iNOS and eNOS gene expression**

The use of RT-PCR for nNOS shows mRNA expression in both ipsi- and contralateral Sp5C samples obtained from animals in all phases of CIA as well as those obtained from control animals (Figure 5 shows only the analysis of the ipsilateral samples). In addition, discrete expression of penile nNOS (PnNOS) mRNA variant can also be observed in all the experimental groups. However, the semi-quantitative densitometric analysis of nNOS and PnNOS mRNA expression revealed no significant difference among the different groups (data not shown). The eNOS mRNA expression was detected in all samples but its expression also not changed during the arthritis (data not shown).

No iNOS mRNA expression was detected in ipsilateral or contralateral Sp5C samples from any experimental group. In contrast, the method employed clearly allowed the detection of iNOS mRNA expression in lung tissue samples obtained

from lipopolysaccharide-treated rats (positive control) (Figure 5). Expression of GAPDH mRNA (loading control) was not significantly different in the various CIA phases when compared to the respective control groups (Figure 5).

## **4. Discussion**

### **4.1. Technical considerations**

In order to avoid potential inaccuracies in our data, various precautions were taken. First, since it is known that NOS activity and protein levels are circadian rhythm-dependent (Ayers et al., 1996), the Sp5C samples were always collected at approximately the same time of the day (between 9 am and 11 am). Second, the specific portion of Sp5C analyzed was always systematically dissected, regardless of the method used. It is noteworthy that only the Sp5C portion was dissected for RT-PCR and radiometric NOS activity assay. Third, the experimental set was composed of arthritic groups and several control groups. This approach allowed us to determine whether the general anesthesia and intra-articular injection procedures modulated NOS in the Sp5C samples from control groups. Since NOS levels were comparable among control groups, we can assume that the alterations observed in Sp5C samples from the arthritic groups are attributable to TMJ arthritis. An additional methodological consideration that it is worth mentioning is that, in order to avoid diffusion to neighboring structures, only 5  $\mu$ l of carrageenan gel was used to induce inflammation, thereby guaranteeing its restriction to the TMJ. The use of greater quantities of carrageenan can increase the risk of leakage of the inflammatory inductor from rat TMJ to adjacent structures such as the

masticator muscles and nerve trunk, which can modulate the NOS expression in the Sp5C. Previous studies have shown that carrageenan-induced myositis in the gastrocnemius-soleus muscle reduces numbers of NADPH diaphorase-expressing neurons (Hoheisel et al., 1995), and that the stimulation of C-fibers in the sciatic nerve accompanied by arthritis in the knee joint intensifies the release of citrulline in the rat dorsal horn (Sorkin and Moore, 1996).

#### **4.2. Carrageenan and the TMJ**

Carrageenan has a high potential to induce local inflammation and hyperalgesia in joints (Radhakrishnan et al., 2003). The histological data collected in the present study show that 10% carrageenan injected into the rat TMJ induced arthritis in the acute (24-h), chronic (15-day) and chronic-active (15-day/24-h) phases. These data corroborate the results obtained by Radhakrishnan et al. (2003), who injected 3% carrageenan into the rat knee joint, demonstrating signs of acute inflammation within the first 24 h and chronic inflammation at 1-8 weeks. In one of our models, carrageenan was injected twice prior to sacrifice, mimicking the chronic-active phase of arthritis. Having a model of the chronic-active phase was interesting because rheumatic disease and arthritis present a chronic evolution with some acute episodes in human TMJ (Kamelchuk and Major, 1995; Donaldson, 1995). The analysis of the contralateral TMJ during unilateral CIA showed no signs of inflammation, thereby supporting the findings of Radhakrishnan et al. (2003).

### 4.3. nNOS expression and activity

The distribution of nNOS-LI neurons was mostly restricted to lamina II, although a small number were seen in the deeper lamina, as previously demonstrated by Dohrn et al. (1994). The authors suggested that Sp5C nNOS-LI neurons act as interneurons connecting the various parts of the Sp5C. It has also been proposed that the predominance of a large population of nNOS-LI neurons in the superficial lamina indicates that such neurons play a role in local nociceptive mechanisms at the trigeminal system and dorsal horn level (Dorhn et al., 1994; Hoheisel et al., 2000).

To the best of our knowledge, our study is the first to describe the influences of TMJ arthritis on nNOS expression in the Sp5C. We observed that the percentage and genic expression of nNOS-LI neurons was unaltered during CIA. In a study involving *in situ* hybridization, it was shown that the number of nNOS mRNA neurons decreased by 20 days after CFA induction of polyarthritis (Pozza et al., 1998). Conversely, injection of CFA into the rat knee joint has been shown to increase the density of nNOS immunoreactivity in the spinal cord (Wu et al., 1998). However, special care must be taken when comparing the results of the present study with those reported by other authors, considering the differences between CFA and carrageenan in terms of the inflammatory responses induced. For example, it has been proposed that the use of CFA may not be appropriate for analyzing the neuronal mechanisms of pain in specific target organs because of its systemic spread (Philippe et al., 1997; Radhakrishnan et al., 200).

Upregulation of nNOS-LI neurons in the dorsal horn has also been observed after intraplantar injection of formalin, capsaicin, CFA or zymosan (Lam et al., 1996;

Yonehara et al., 1997; Maihöfner et al., 2000; Wu et al., 2001). In contrast, decreased immunoreactivity to nNOS neurons in the dorsal horn has been observed during chronic spontaneous mastitis in sheep (Dolan et al., 2000). However, the results of other studies, in which no changes in nNOS dorsal horn neurons were observed after intraplantar injection of carrageenan or CFA (Traub et al., 1994; Goff et al., 1998), are in agreement with our findings.

Although it was not the focus of our study, the RT-PCR method allowed us to identify, for the first time, PnNOS in the Sp5C, which is not affected during arthritis. This nNOS variant was initially described to occur in the rat penis, PnNOS differs from constitutive nNOS by a 102-bp insert encoding a 34-amino acid sequence (Magee et al., 1996; Gonzales-Cadavic et al., 2000). Accordingly, we detected the presence of both nNOS and PnNOS mRNAs in the rat Sp5C samples, as evidenced by the 560-bp and 662-bp RT-PCR products, respectively.

Regarding  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity, we observed a significant increase in the ipsilateral and contralateral Sp5C during the chronic phase of TMJ arthritis. This upregulation was reversed after 24 h by the additional acute inflammation induced by carrageenan, observed in the chronic-active phase. These data indicate that NO also plays an evident role in the processing of chronic pain as previously demonstrated in other studies analyzing the spinal cord (Laurindo et al., 2003; Sung and Ambron, 2004).

The observed increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity may be due to either nNOS or the endothelial NOS isoform (eNOS) or both. The eNOS is expressed in endothelial cells and astrocytes but rarely in neurons. Tao et al. (2004) showed that the intrathecal injection of a selective nNOS inhibitor inhibited carrageenan-

induced thermal hyperalgesia in normal mice, and that this pharmacological approach did not have the same effect in nNOS knockout mice. However, although the intrathecal application of a selective eNOS inhibitor was ineffective in wild-type mice, it significantly inhibited the carrageenan-induced response in nNOS knockout mice. Based on these observations, and on additional biochemical and histological evidence, the authors concluded that nNOS activation mediates carrageenan-induced thermal hyperalgesia, and that eNOS upregulation in astrocytes is an important compensatory mechanism when nNOS-derived NO synthesis is blunted. In view of these results, we can speculate that the observed increase in Sp5C  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity during the chronic phase of carrageenan-induced TMJ arthritis is primarily induced by nNOS. In addition, the eNOS mRNA observed in the present study not revealed alterations in all experimental groups. Taking into account that neither immunohistochemistry nor RT-PCR for nNOS revealed significant differences among the experimental groups, the increased activity observed must be unrelated to either gene or protein expression, although it might be attributable to altered levels of endogenous regulators of enzyme activity (i.e. decreased levels of endogenous nNOS inhibitors, facilitated delivery of co-factors, substrate, etc.). It is still worth mentioning that the results of other studies have emphasized the importance of nNOS-derived NO in nociceptive processing based on the fact that the administration of selective nNOS inhibitors led to the attenuation (or even elimination) of the mechanical and/or thermal hyperalgesia induced by the intraplantar injection of carrageenan (Handy and Moore, 1998; Osborne andCoderre, 1999; Tao et al., 2003).

#### **4.4. iNOS expression and activity**

Expression of iNOS has been characterized in several central nervous system cell types, especially when there is considerable tissue damage (Wu et al., 1998; Licinio et al., 1999; Heneka and Feinstein, 2000). However, the available reports are to some extent contradictory since the results are highly dependent on the specific experimental conditions. For example, upregulated iNOS-LI has been observed in spinal cord ependymal cells during CFA-induced arthritis in the rat knee (Wu et al., 1998). In contrast, Goff et al. (1998) detected no iNOS in rat spinal cord, even after intraplantar administration of CFA. Tao et al. (2003) detected iNOS mRNA in the mouse spinal cord by RT-PCR at only 24 h after the intraplantar administration of carrageenan, and Maihöfner et al. (2000) reported iNOS expression in spinal cord astrocytes after the intraplantar injection of zymosan in mice, although at later time points.

Under the experimental conditions of the present study, we observed no iNOS expression (neither iNOS-LI protein by immunohistochemistry nor its mRNA by RT-PCR). Accordingly, iNOS activity in the Sp5C was irrelevant.

Interestingly, nociceptive stimuli evoked by intraplantar injection of zymosan, capsaicin or carrageenan were attenuated when selective iNOS inhibitors were applied to the spinal cord (Meller et al., 1994; Osborne andCoderre, 1999; Wu et al., 2001). In a study involving wild-type mice, pretreatment with L-N6-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL, a selective iNOS inhibitor) had no effect on carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the early phase but significantly attenuated it in the late phase (24 h after carrageenan injection) (Tao et al., 2003). In contrast, the selective nNOS inhibitor 7-nitroindazole effectively attenuated the entire course of

the thermal hyperalgesia in iNOS knockout mice. It may thus be concluded that, similarly to the interplay between the endothelial and the neuronal NOS isoforms mentioned above (Tao et al., 2004), nNOS-derived NO could compensate for the lack of iNOS during the late phase of carrageenan-induced thermal hyperalgesia, and indirectly imply that iNOS might be important, but not essential, for the late phase of the response. On this point, the findings of Tao et al. (2003) support our results regarding the increased  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity and the absence of iNOS expression and activity observed in the Sp5C samples collected during the chronic phase of CIA.

#### **4.5. nNOS and Fos**

Unilateral CIA in the rat TMJ resulted in a bilateral increase in Fos-LI neuron numbers in the Sp5C, in agreement with the findings of previous studies (Hathaway et al. 1995; Zhou et al., 1999; Beretier and Beretier, 2000). We observed a considerable number of Fos-LI neurons in the deep lamina, in accordance with the results of studies analyzing Fos-LI neurons in the Sp5C and dorsal horn after long-term nociceptive stimulation (Honore et al., 1995; Zhou et al., 1999; Beretier and Beretier, 2000). In contrast, Hathaway et al. (1995) found that, when animals were sacrificed a short time (2-5 h) after nociceptive stimulation of the TMJ, the Fos-LI neurons predominated in superficial lamina.

In the present study it was showed that only a discrete percentage (maximum 14%) of nNOS-LI neurons exhibited Fos-LI, remaining unchanged during CIA in the rat TMJ. Intraplantar or facial nociceptive chemical stimulation has been shown to result in a similar percentage of Fos-/nNOS-LI neurons in the dorsal horn and

trigeminal system (Leong et al., 2000; Yeo et al., 2002; Nazli et al., 2001). Pardutz et al. (2000) demonstrated that systemic administration of nitroglycerin, an NO donor, produced significant increases in nNOS-LI and FOS-LI, although in distinct pools of Sp5C neurons. These data demonstrate that, despite the low number of NO neurons directly activated by nociceptive stimulus (as identified by nNOS-/Fos-LI), such neurons can be mainly implicated in the activation the adjacent neurons involved in nociceptive processing.

In summary, we have shown that nitric oxide is an important neuromediator in the rat Sp5C, and that the nNOS expression remains unchanged during CIA in the TMJ. However, in our model of chronic arthritis, an increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity occurred in the Sp5C, thus suggesting that NO plays an important role in nociceptive processing in this region in long-term diseases. Even in the absence of significant changes in gene and protein expression of the nNOS, iNOS and eNOS, we cannot rule out the possibility that other mechanisms (such as endogenous NOS inhibitors, co-factors and substrate transport) modulate NOS enzyme activity in this animal model. Nevertheless, additional studies are warranted in order to confirm this hypothesis.

## Acknowledgements

This study was supported by fellowship grants and a research grant from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the state of São Paulo – fellowship grants: S.A.T., # 99/07846-3 and A.D.S., # 03/11838-3; research grant, 99/10236-2), as well as by a research grant from the *Fundação da Universidade Estadual Paulista* (FUNDUNESP, Paulista State University Foundation, São Paulo, Brazil). In addition, we are grateful to Karina Vieira Casatti and Jefferson Boyles for reviewing the manuscript.

## References

- Ayers et al., 1996 N.A. Ayers, L. Kapas and J.M. Krueger, Circadian variation of nitric oxide synthase activity and cytosolic protein levels in rat brain. *Brain Res* **707** (1996), pp. 127-130.
- Bereiter et al., 2000 D.A. Beretier, H. Hirata and J.W. Hu, Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn, *Pain* **1** (2000), pp. 221-224.
- Beretier and Bereiter, 2000 D.A. Bereiter and D.F. Bereiter, Morphine and NMDA receptor antagonism reduce c-fos expression in spinal trigeminal nucleus produced by acute injury to the TMJ region, *Pain* **85** (2000), pp. 65-77.
- Bredt and Snyder, 1994 D.S. Bredt and S.H. Snyder, Nitric oxide: a physiologic messenger molecule, *Annu Rev Biochem* **63** (1994), pp. 175-195.

Callsen-Cencic et al., 1999 P. Callsen-Cencic, U. Hoheisel, A. Kaske, S. Mense and S. Tenschert, The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or downregulated? *Cell Tissue Res* **295** (1999), pp. 183-194.

Dohrn et al., 1994 C.S. Dohrn, M.A. Mullett, R.H. Price and A.J. Beitz, Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive interneurons in the spinal trigeminal nucleus, *J Comp Neurol* **346** (1994), pp. 449-460.

Donaldson, 1995 K.W. Donaldson, Rheumatoid diseases and the temporomandibular joint: a review. *Cranio* **13** (1995), pp. 264-269.

Dun et al., 1993 N. J. Dun, S. L. Dun, S. Y. Wu, U. Förstermann, H. H. H. W. Schmidt and L. F. Tseng, Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord, *Neuroscience* **54** (1993), pp. 845-857.

Faria et al., 1997 M.S. Faria, M.N. Muscara, H. Moreno Junior, S.A. Teixeira, H.B. Dias, B. De Oliveira, F.G. Graeff and G. De Nucci, Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test, *Eur J Pharmacol* **323** (1997), pp. 37-43.

Dolan et al., 2000 S. Dolan, L.C. Field and A.M. Nolan, The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation, *Pain* **86** (2000), pp. 311-320.

Ferraz et al., 1997 J.G. Ferraz, K.A. Sharkey, B.K. Reuter, S. Asfaha, A.W. Tigley, M.L. Brown, W. McKnight and J.L. Wallace, Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in

the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage, *Gastroenterology* **113** (1997), pp. 195–204.

Goff et al., 1998 J.R. Goff, A.R. Burkey, D.J. Goff and L. Jasmin, Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour, *Neuroscience* **82** (1998), pp. 559-574.

Gonzalez-Cadavid et al., 2000 N.F. Gonzalez-Cadavid, A.L. Burnett, T.R. Magee, C.B. Zeller, D. Vernet, N. Smith, J. Gitter and J. Rajfer, Expression of penile neuronal nitric oxide synthase variants in the rat and mouse penile nerves, *Biol Reprod* **63** (2000), pp. 704-714.

Handy and Moore, 1998 R.L. Handy and P.K. Moore, Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia, *Neuropharmacology* **37** (1998), pp. 37-43.

Hathaway et al., 1995 C.B. Hathaway, J.W. Hu and D.A. Bereiter, Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint, *J Comp Neurol* **356** (1995), pp. 444-456.

Henderson and Edward 1987 B. Henderson and J.C.W. Edward, The synovial lining in health and disease, Chapman and Hall, London, (1987).

Heneka and Feinstein, 2001 M.T. Heneka and D.L. Feinstein, Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons, *J Neuroimmunol* **114** (2001), pp. 8-18.

Hiki et al., 1992 K. Hiki, R. Hattori, C. Kawai, Y. Yui, Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum, *J Biochem* **111** (1992), pp. 556-558.

Hoheisel et al., 1995 U. Hoheisel, A. Reinert and S. Mense, Changes in NADPH-diaphorase activity in the rat dorsal horn following an acute experimental myositis, *Histochem Cell Biol* **103** (1995), pp. 459-462.

Hoheisel et al., 2000 U. Hoheisel, T. Unger and S. Mense, A block of spinal nitric oxide synthesis leads to increased background activity predominantly in nociceptive dorsal horn neurones in the rat, *Pain* **88** (2000), pp. 249-257.

Honore et al., 1995 P. Honore, J. Buritova and J.M. Besson, Carrageenin-evoked c-Fos expression in rat lumbar spinal cord: the effects of indomethacin, *Eur J Pharmacol* **272** (1995), pp. 249-259.

Kamelchuk and Major, 1995 L.S. Kamelchuk and P.W. Major, Degenerative disease of the temporomandibular joint, *J Orofac Pain* **9** (1995), pp. 168-180.

Lam et al., 1996 H.H.D. Lam, D.F. Hanley, B.D. Trapp, S. Saito, S. Raja, T.M. Dawson and H.Yamaguchi, Induction of cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin in the rat hind paw, *Neurosci Lett* **210** (1996), pp. 201-204.

Laurindo et al., 2003 C. Laurido, A. Hernandez, L. Constandil and T. Pelissier, Nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase are involved in spinal cord wind-up activity of monoarthritic, but not of normal rats, *Neurosci Lett* **352** (2003), pp. 64-66.

Leong et al., 2000 S. Leong, H. Liu and J. Yeo, Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection, *Brain Res* **855** (2000), pp. 107-115.

Leman and Sequeira, 2002 S. Leman and H. Sequeira, Activation of adrenal preganglionic neurons during autonomic dysreflexia in the chronic spinal cord-injured rat, *Auton Neurosci* **98** (2002), pp. 94-98.

Licinio et al., 1999 J. Licinio, P. Prolo, S.M. McCann and M.L Wong, Brain iNOS: current understanding and clinical implications, *Mol Med Today* **5** (1999), pp. 225-232.

Magee et al., 1996 T. Magee, A.M. Fuentes, H. Garban, T. Rajavashisth, D. Marquez, J.A. Rodriguez, J. Rajfer and N.F. Gonzalez-Cadavid, Cloning and sequencing of a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in the penis and lower urogenital tract, *Biochem Biophys Res Commun* **226** (1996), pp. 146–151.

Maihofner et al., 2000 C. Maihofner, C. Euchenhofer, I. Tegeder, K.F. Beck, J. Pfeilschifter and G. Geisslinger, Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation, *Neurosci Lett* **290** (2000), pp. 71-75.

Meller et al., 1994 S.T. Meller, C. Dykstra, D. Grzybycki, S. Murphy and G.F. Gebhart, The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat, *Neuropharmacology* **33** (1994), pp. 1471-1478.

Nazli et al., 2001 M. Nazli, E.S. Hismiogullari, T. Thippeswamy and R. Morris, How central is nitric oxide (NO) to the activation of c-fos in spinal neurones following noxious peripheral stimulation in the rat? *Brain Res* **888** (2001), pp. 172-175.

Okeson 1992 J.P. Okeson, Management of Temporomandibular Disorders and Occlusion (Management of Temporomandibular Disorders & Occlusion) (3<sup>rd</sup> edition), Mosby-Year Book (1992).

Osborne and Coderre, 1999 M.G. Osborne and T.J. Coderre, Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia, *Br J Pharmacol* **126** (1999), pp. 1840-1846.

Philippe et al., 1997 L. Philippe, P. Gegout-Pottie, C. Guingamp, K. Bordji, B. Terlain, P. Netter and P. Gillet, Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats, *Am J Physiol* **273** (1997), pp. R1550-6.

Pozza et al., 1998 M. Pozza, C. Bettelli, F. Magnani, M.T. Mascia, E. Manzini and L. Calza, Is neuronal nitric oxide involved in adjuvant-induced joint inflammation? *Eur J Pharmacol* **359** (1998), pp. 87-93.

Radhakrishnan et al., 2003 R. Radhakrishnan, S.A. Moore and K.A. Sluka, Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats, *Pain* **104** (2003), pp. 567-577.

Sessle, 2000 B.J. Sessle, Acute and chronic craniofacial pain: Brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates, *Crit Rev Oral Biol Med* **11**(2000), pp. 57-91.

Sorkin and Moore, 1996 L.S. Sorkin and J.H. Moore, Evoked Release of Amino Acids and Prostanoids in Spinal Cords of Anesthetized Rats: Changes During Peripheral Inflammation and Hyperalgesia. *Am J Ther* **3** (1996), pp. 268-275.

Sung and Ambron, 2004 Y.J. Sung and R.T. Ambron, Pathways that elicit long-term changes in gene expression in nociceptive neurons following nerve injury: contributions to neuropathic pain, *Neurol Res* **26** (2004), pp. 195-203.

Swain et al., 1997 M.G. Swain, T. Le, A.W. Tigley and P. Beck, Hypothalamic nitric oxide synthase is depressed in cholestatic rats, *Am J Physiol* **272** (1997), pp. G1034–G1040.

Tao et al., 2003 F. Tao, Y.X. Tao, P. Mao, C. Zhao, D. Li, W.J. Liaw, S.N. Raja and R.A. Johns, Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Neuroscience* **120** (2003), pp. 847-854.

Tao et al., 2004 F. Tao, Y.X. Tao, C. Zhao, S. Dore, W.J. Liaw, S.N. Raja and R.A. Johns, Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia, *Neuroscience* **128** (2004), pp. 421-430.

Traub et al., 1994 R.J. Traub, A. Solodkin, S.T. Meller and G.F. Gebhart, Spinal cord NADPH-diaphorase histochemical staining but not nitric oxide synthase

immunoreactivity increases following carrageenan-produced hindpaw inflammation in the rat, *Brain Res* **668** (1994), pp. 204-210.

Wu et al., 1998 J. Wu, Q. Lin, Y. Lu, W.D. Willis and K.N. Westlund, Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis, *Exp Brain Res* **118** (1998), pp. 457-465.

Wu et al., 2001 J. Wu, L. Fang, Q. Lin and W.D. Willis, Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin, *Pain* **95** (2001), pp. 47-58.

Yeo, 2000 J. F. Yeo, Does nitric oxide play a role in orofacial pain transmission? *Ann N Y Acad Sci* **962** (2000), pp. 151-160.

Yonehara et al., 1997 N. Yonehara, M. Takemura, M. Yoshimura, K. Iwase, H.G. Seo, N. Taniguchi and Y. Shigenaga, Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant-induced hyperalgesia, *Jpn J Pharmacol* **75** (1997), pp. 327-335.

Zhou et al., 1999 Q. Zhou, H. Imbe, R. Dubner and K. Ren, Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain, *J Comp Neurol* **412** (1999), pp. 276-291.

Figure 1. Low and high magnification photomicrographs of TMJ frontal sections (from the various experimental groups) stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed under light microscopy A-B: TMJ from the naïve group. Note the absence of inflammatory process. B: Area enclosed in A; observe the slight thickening (arrow) in the normal synovial membrane and absence of immune cells. C-D: TMJ from the sham group; observe histological similarity to the naïve group. E-F: TMJ from the acute phase at 24 hours after carrageenan induction of arthritis. Note the presence of inflammatory exudates in the enlarged supradiscal space (arrows). F: Observe that, because of the intense migration of immune cells and plasma protein to the supradiscal space (arrow and asterisk), the intima layer of the synovial membrane is not typical (arrowheads). Mononuclear and polymorphonuclear neutrophils are distributed throughout the TMJ. G-H: TMJ from the chronic phase at 15 days after carrageenan induction of arthritis, presenting immune cell clumps, known as rice bodies, in the enlarged supradiscal space and a thick synovial membrane. In addition, there are multiple synovial villi in the synovial membrane. H: The rice bodies are formed by the accumulation of macrophages (arrow). The synovial villi present a thick intima layer (arrowheads). I-J: TMJ from the chronic-active phase at 15 days/24 hours after carrageenan induction of arthritis, presenting dense inflammatory infiltrate in the enlarged supradiscal space (arrows and asterisks). J: Observe the surface of the synovial membrane (dotted line) and the intense proliferation of immune cells and plasma protein in the supradiscal space (arrow and asterisk). Abbreviations: AD, articular

disc; IL, intra-articular ligament; IS, infradiscal articular space; MC, mandibular condyle; SS, supradiscal articular space; TB, temporal bone.

Figure 2. Light microscopy photomicrographs of frontal sections of the caudal part of the spinal trigeminal nucleus (Sp5C) submitted to immunohistochemistry to display nNOS-like immunoreactivity (nNOS-LI) (A-D), nNOS-LI and Fos-LI (E-F) neuron profiles in animals with chronic-active carrageenan-induced arthritis in the left TMJ (15 days/24 hours). A: low magnification photomicrograph of the Sp5C showing the pattern of labeling of the nNOS-LI neuron profiles. B: Dorsomedial portion of the Sp5C illustrating the elevated number of nNOS-LI neurons, mainly located in lamina II. C: Higher magnification of B, observe that the neurons in the deeper lamina show multipolar morphology with projections to superficial lamina of the Sp5C. D: Higher magnification of the superficial lamina, showing that most of the nNOS-LI neurons exhibit oval (small arrow) and occasionally fusiform morphology (arrowhead), located in the lamina I. E- F: Double immunohistochemistry method to evidence nNOS-LI and Fos-LI neurons profiles in the superficial lamina. Observe the neurons exhibiting nNOS-LI/Fos-LI (large arrow), nNOS-LI (arrowhead) and Fos-LI (small arrow). Abbreviations: Cuf, cuneate fascicle; spt5, spinal tract of trigeminal nerve; Sp5C, caudal part of the spinal trigeminal nucleus; MDRNd, medullary reticular nucleus, ventral part; rust, rubrospinal tract.

Figure 3. The percentage (mean and SEM) of nNOS-LI neuron profiles in the ipsi- and contralateral Sp5C of rats with carrageenan-induced arthritis in the left TMJ (acute, chronic and chronic-active phases) in relation to the respective sham groups. Observe that there was a slight increase of the nNOS-LI neuron profiles in all phases of arthritis, although the difference was less than significant. The data were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-test* comparison, considering values of  $P < 0.05$  as statistically significant.

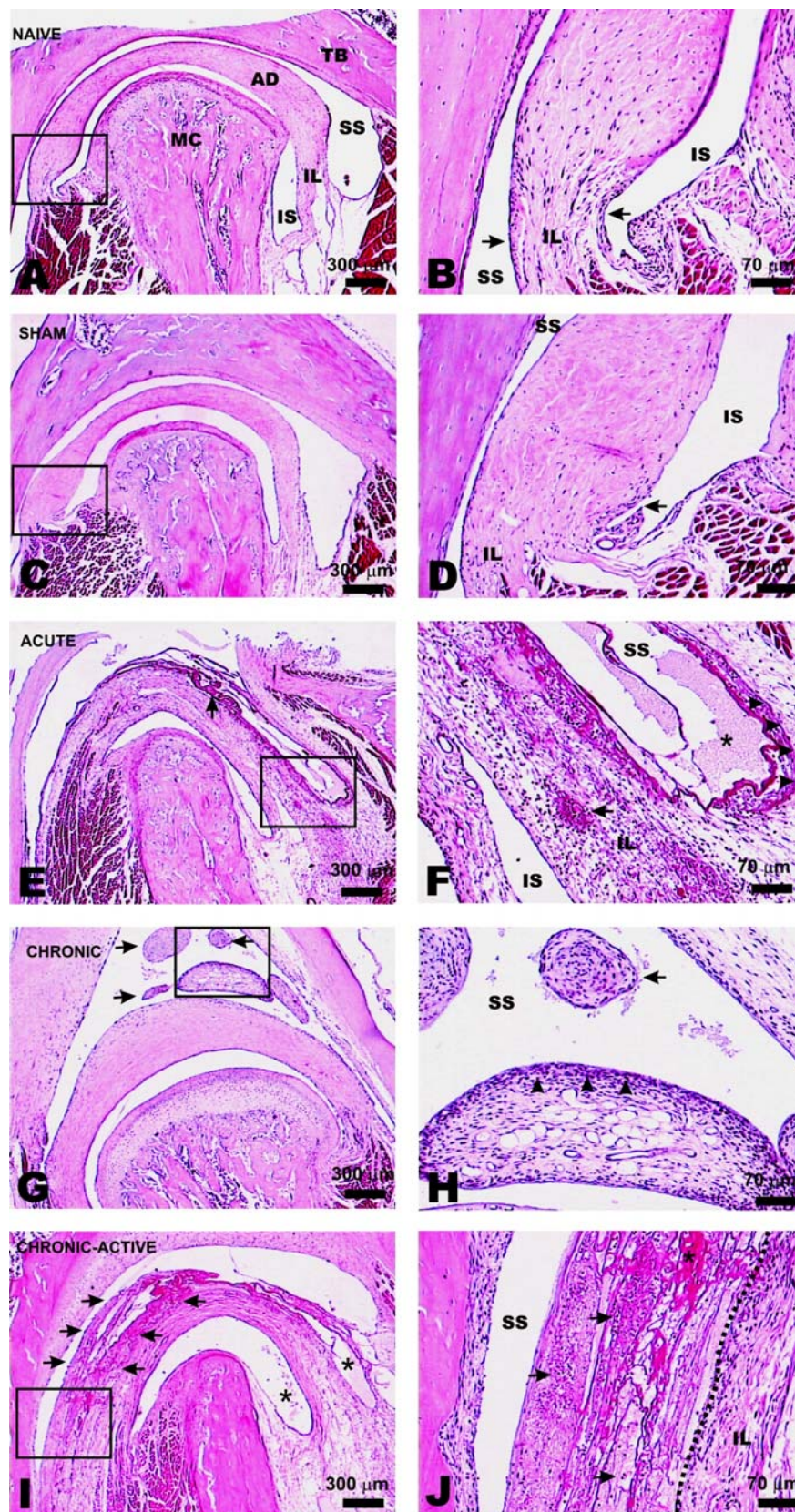
Figure 4. The percentage (mean and SEM) of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity measured in the ipsilateral and contralateral Sp5C of rats with carrageenan-induced arthritis in the left TMJ (acute, chronic and chronic-active phases) in relation to the respective sham groups. In the chronic phase, there was a significant ipsilateral increase in the NOS activity in the Sp5C when compared to the acute (\*\*) and chronic-active phases (\*) and their sham groups (\*\*\*). The data were analyzed by ANOVA, followed by Tukey-Kramer *post-test*, considering values of  $P < 0.05$  as statistically significant. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.01$

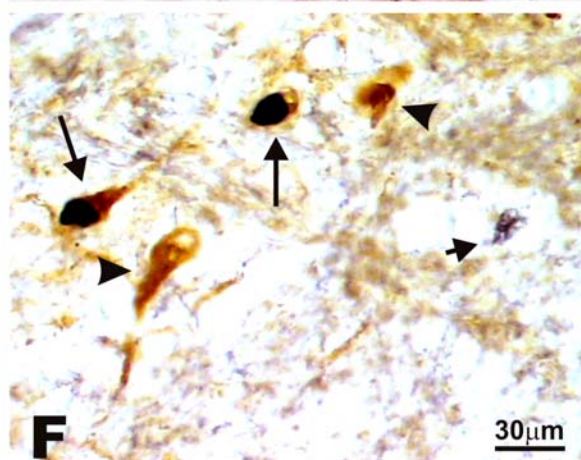
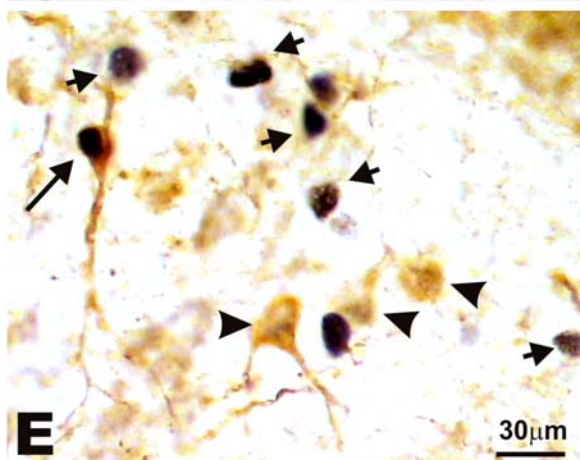
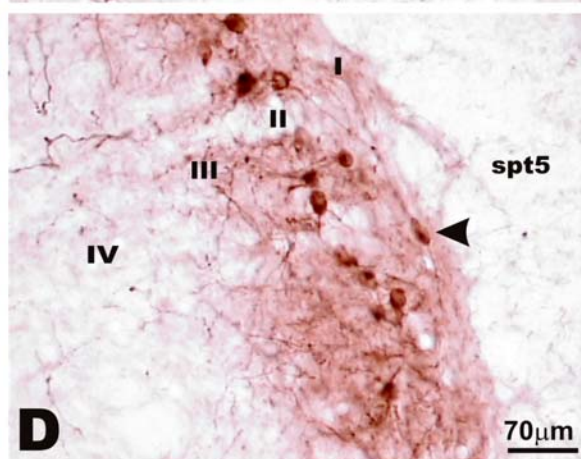
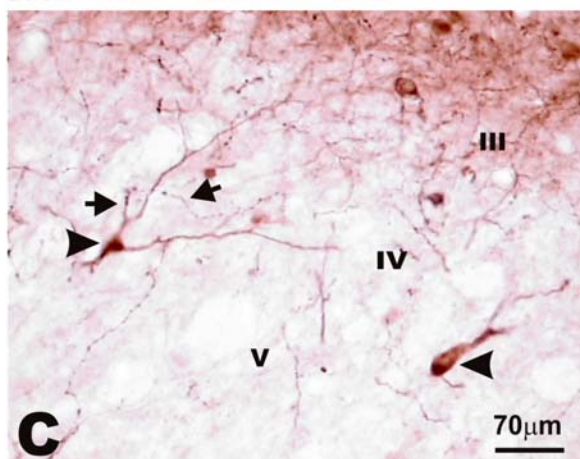
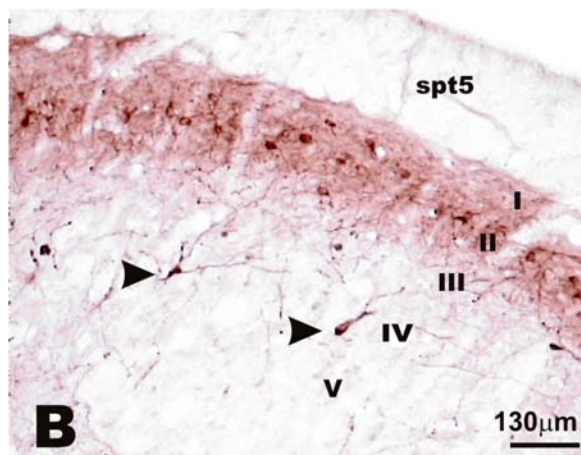
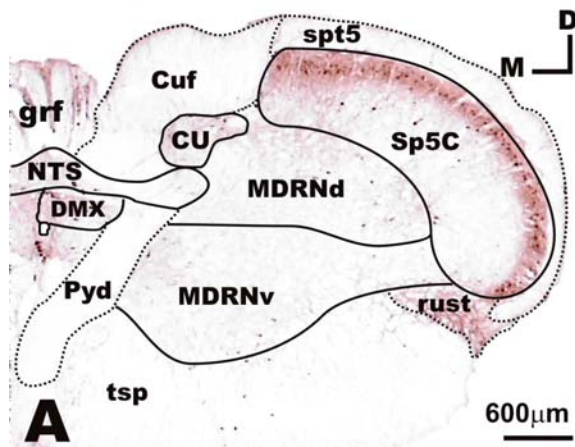
Figure 5. Analyses of the expression of nNOS (A) and iNOS (B) using RT-PCR in the ipsilateral Sp5C samples from rats in different phases of the ipsilateral carrageenan-induced arthritis (CIA) in the left TMJ and their controls (Sham; Anesthetic Control, AC; Naïve). A: Observe the homogeneous density of nNOS labeling in all experimental groups. No semiquantitative difference was observed. It was also possible to demonstrate the discrete expression of penile nNOS in the Sp5C in all experimental groups. Expression of GAPDH was used as a positive

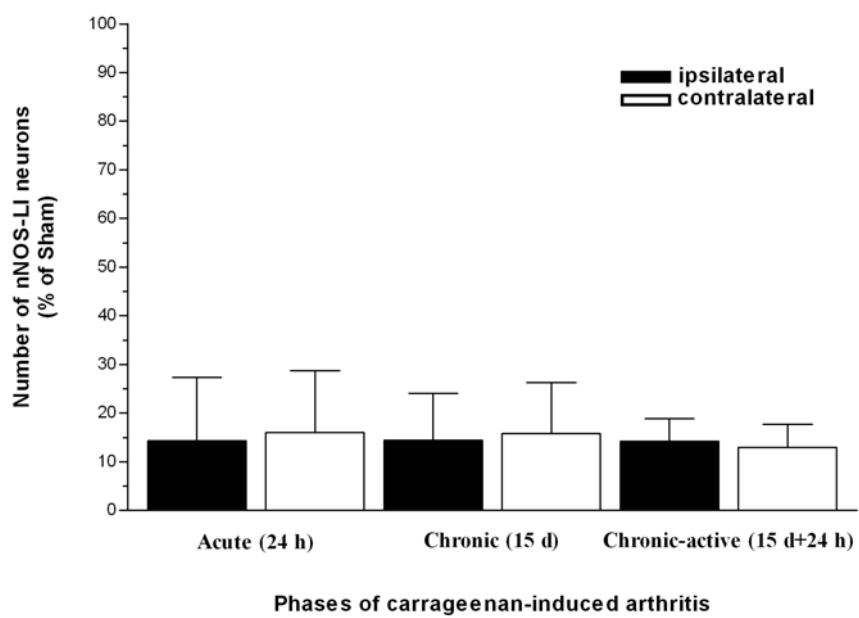
control. Expression of iNOS was not observed in the Sp5C, although iNOS expression was dense in lung homogenates previously sensitized with lipopolysaccharide (LPS) used as a positive control.

Table 1. The nNOS-LI nucleated neuron profiles in the Sp5C, per section and per animal, for ipsilateral carrageenan-induced arthritis in the TMJ (acute, chronic and chronic-active phases) and control groups (sham, anesthetic control and naïve). Data are related to 13 Sp5C sections (–13.8 and –15.3 stereotaxic coordinates, using bregma as the reference point). There were five animals in each experimental group. Abbreviations: AC, anesthetic control; CIA, carrageenan-induced arthritis.

Table 2.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS activity in the ipsilateral and contralateral Sp5C from ipsilateral carrageenan-induced arthritis in the TMJ (acute, chronic and chronic-active phases) and control groups (sham, anesthetic control and naïve). The values are expressed in pmol of L-citrulline/mg protein/min. There were five pools of three animals each (total: n=15) from each experimental group. Abbreviations: AC, anesthetic control; CIA, carrageenan-induced arthritis.







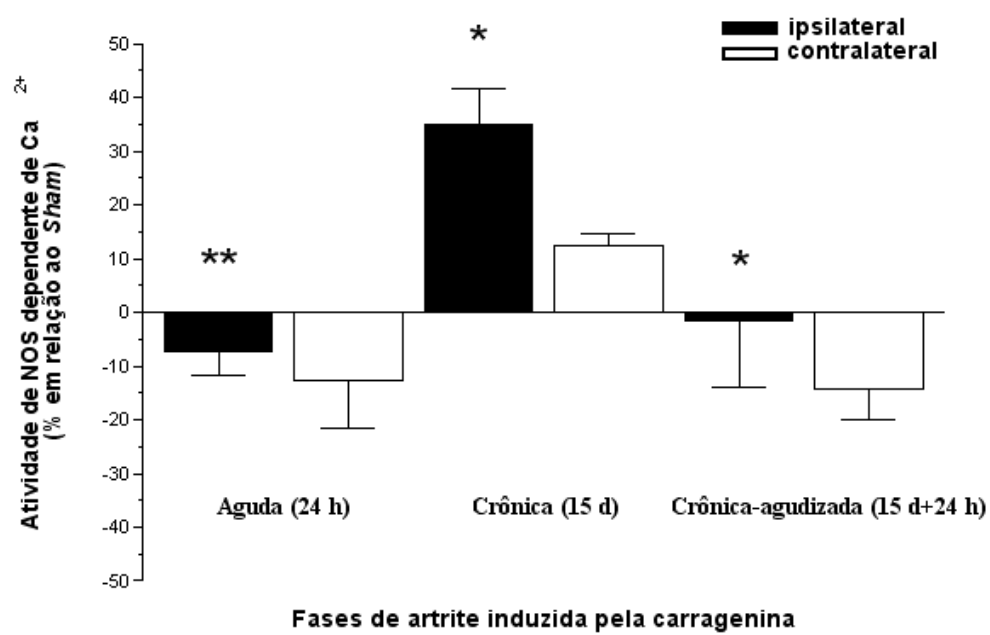


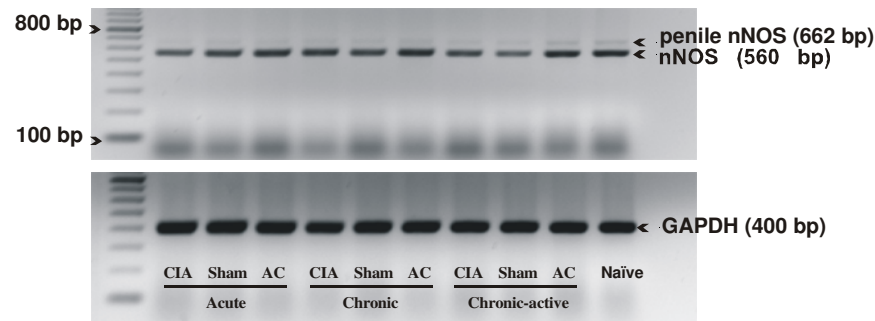
Table 1. Mean and standard error mean (Mean  $\pm$  S.E.M.) of absolute values of nNOS-LI neuron profiles.

| EXPERIMENTAL GROUPS |              |              |              |              |              |              |                |              |              |              |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
|                     | ACUTE        |              |              | CHRONIC      |              |              | CHRONIC-ACTIVE |              |              | NAIVE        |
|                     | CIA          | SHAM         | AC           | CIA          | SHAM         | AC           | CIA            | SHAM         | AC           | NAIVE        |
| <u>PER SECTION</u>  |              |              |              |              |              |              |                |              |              |              |
| IPSI                | 55 $\pm$ 6   | 48 $\pm$ 4   | 47 $\pm$ 2   | 62 $\pm$ 5   | 53 $\pm$ 2   | 55 $\pm$ 5   | 60 $\pm$ 2     | 52 $\pm$ 6   | 48 $\pm$ 2   | 44 $\pm$ 6   |
| CONTRA              | 56 $\pm$ 6   | 50 $\pm$ 3   | 48 $\pm$ 4   | 61 $\pm$ 6   | 53 $\pm$ 2   | 54 $\pm$ 0   | 58 $\pm$ 3     | 51 $\pm$ 4   | 47 $\pm$ 4   | 48 $\pm$ 6   |
| <u>PER ANIMAL</u>   |              |              |              |              |              |              |                |              |              |              |
| IPSI                | 703 $\pm$ 80 | 615 $\pm$ 55 | 629 $\pm$ 33 | 790 $\pm$ 67 | 690 $\pm$ 22 | 627 $\pm$ 99 | 775 $\pm$ 32   | 679 $\pm$ 51 | 596 $\pm$ 36 | 616 $\pm$ 11 |
| CONTRA              | 727 $\pm$ 80 | 626 $\pm$ 25 | 628 $\pm$ 40 | 788 $\pm$ 72 | 681 $\pm$ 26 | 615 $\pm$ 88 | 759 $\pm$ 32   | 672 $\pm$ 41 | 580 $\pm$ 47 | 648 $\pm$ 52 |

Table 2. Mean and standard error mean (Mean  $\pm$  SEM) of the absolute values of Ca<sup>2+</sup> -dependent NOS activity.

| EXPERIMENTAL GROUPS |               |               |               |               |               |               |               |                |               |               |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| ACUTE               |               |               |               | CHRONIC       |               |               |               | CHRONIC-ACTIVE |               |               |
|                     | CIA           | SHAM          | AC            |               | CIA           | SHAM          | AC            |                | CIA           | SHAM          |
| IPSI                | 3.9 $\pm$ 0.2 | 4.3 $\pm$ 0.1 | 4.2 $\pm$ 0.2 | 5.5 $\pm$ 0.3 | 4.3 $\pm$ 0.2 | 4.7 $\pm$ 0.4 | 4.6 $\pm$ 0.6 | 4.4 $\pm$ 0.2  | 3.0 $\pm$ 0.1 | 4.5 $\pm$ 0.2 |
| CONTRA              | 3.6 $\pm$ 0.4 | 4.1 $\pm$ 0.1 | 3.7 $\pm$ 0.3 | 4.9 $\pm$ 0.1 | 4.3 $\pm$ 0.1 | 4.5 $\pm$ 0.2 | 4.0 $\pm$ 0.3 | 4.4 $\pm$ 0.8  | 3.4 $\pm$ 0.1 | 4.4 $\pm$ 0.2 |

**A** **RT-PCR for nNOS**



**B** **RT-PCR for iNOS**

