



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**HENRIQUE BALLASSINI ABDALLA**

**Avaliação do mecanismo envolvido no efeito antinociceptivo da  
15d-PGJ<sub>2</sub> mediado pela ativação dos receptores ativados por  
proliferados de peroxissoma- $\gamma$  em macrófagos na ATM de ratos.**

**Piracicaba  
2016**

**HENRIQUE BALLASSINI ABDALLA**

**Avaliação do mecanismo envolvido no efeito antinociceptivo da  
15d-PGJ<sub>2</sub> mediado pela ativação dos receptores ativados por  
proliferados de peroxissoma- $\gamma$  em macrófagos na ATM de ratos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa.Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga

Este exemplar corresponde a versão final da dissertação defendida pelo aluno, Henrique Ballassini Abdalla, orientado pela, Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga

**Piracicaba**

**2016**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq; CAPES

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Ab31a Abdalla, Henrique Ballassini, 1990-  
Avaliação do mecanismo envolvido no efeito antinociceptivo da 15d-PGJ2 mediado pela ativação dos receptores ativados por proliferados de proxissoma-gamma em macrófagos na ATM de ratos / Henrique Ballassini Abdalla. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Juliana Trindade Clemente Napimoga.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. PPAR gama. 2. Macrófagos. 3. Analgesia. I. Clemente-Napimoga, Juliana Trindade, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of mechanism involved in the analgesic effect of 15d-PGJ2 mediated by activation of receptors activated by proliferated perissome-gamma in macrophages in TMJ rats

**Palavras-chave em inglês:**

PPAR gamma

Macrophages

Analgesia

**Área de concentração:** Fisiologia Oral

**Titulação:** Mestre em Odontologia

**Banca examinadora:**

Juliana Trindade Clemente Napimoga [Orientador]

Leonardo Rigoldi Bonjardim

Victor Angelo Martins Montalli

**Data de defesa:** 05-02-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 05 de Fevereiro de 2016, considerou o candidato HENRIQUE BALLASSINI ABDALLA aprovado.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. JULIANA TRINDADE CLEMENTE NAPIMOGA

PROF. DR. LEONARDO RIGOLDI BONJARDIM

PROF. DR. VICTOR ANGELO MARTINS MONTALLI

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, Ronaldo Sergio Abdalla e Anna Cristina Pacheco Ballassini Abdalla, e avó, Ercilia Berna Pacheco Ballasini, por toda dedicação e amor, sou eternamente grato a vocês.

**Agradecimentos**  
**Agradecimentos especiais**

A minha orientadora Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga, pelo empenho, paciência, compreensão e, acima de tudo, exigência, muito obrigado;

A minha namorada, Patrícia, por todos os momentos de atenção, compreensão e carinho, você é meu grande amor.

Aos meus amigos Cristina, Luiz, Ricardo e Hortência pelos momentos de companheirismo, meu eterno respeito a vocês.

Aos funcionários e amigos, Carlos Alberto A. Feliciano, Eliete Righetto e Maria Eliza dos Santos, sem vocês teria sido muito difícil e em algumas horas impossível, muito obrigado.

## **Agradecimentos**

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu excelentíssimo reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques;

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa da Prof. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade oferecida;

Aos Professores do Departamento de Fisiologia pelos ensinamentos ministrados e pelo apoio à pesquisa;

A todos os Professores que de forma direta ou indireta contribuíram para o nosso melhor aproveitamento;

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pelo profissionalismo demonstrado e dedicação prestada;

A todos os amigos e alunos da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pelo apoio mútuo e coleguismo ético demonstrado;

A algum amigo que porventura não tenha sido citado, mas que colaborou com seu incentivo e dedicação;

## Resumo

A 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), um ligante natural dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs), tem sido considerado uma promissora estratégia terapêutica para doenças inflamatórias. Estudos anteriores sugerem que o potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da 15d-PGJ<sub>2</sub> na dor inflamatória da articulação temporomandibular (ATM) está vinculado a ativação de macrófagos residentes no tecido periaritular. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar: (1) se a 15d-PGJ<sub>2</sub>, ao se ligar receptor PPAR- $\gamma$ , promove alteração fenotípica nos macrófagos residentes tipo M1 para M2 via sinalização da hemoxigenase tipo 1 (OH-1) promovendo ação resolutive do processo inflamatório; e (2) se a ação analgésica promovida pela liberação de opióides endógenos pelo macrófagos ativados pela 15d-PGJ<sub>2</sub> é mediado pela ativação da via neuronal L-Arginina/NO/cGMP/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> através da proteinoquinase dependente da Ca<sup>+2</sup>/Calmodulina na ATM de ratos. Para este estudo foram utilizados ratos machos Wistar ( $\pm$  150g, n=8 animais por grupo), provenientes do CEMIB, previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (#3414-1). Análises através do método ELISA demonstraram que a administração intra-articular de 15d-PGJ<sub>2</sub> (100 ng/ATM) aumenta a liberação do fator de transcrição ativados do PPAR- $\gamma$  (P <0.05: One-way ANOVA, Teste de Tukey). O tratamento dos animais com o recrutador de macrófagos Tioglicolato (1%/ATM/dia) aumentou significativamente a liberação do fator de transcrição ativados do PPAR- $\gamma$  em animais tratados com 15d-PGJ<sub>2</sub>. A análise da expressão da proteinoquinase dependente de Ca<sup>+2</sup>/calmodulina não demonstrou diferença entre os grupos testados (P >0.05: One-way ANOVA, Tukey test). Os cortes histológicos dos tecidos periarticulares tratados com imunohistoquímica demonstraram positividade para os marcadores de macrófagos M1, M2 e OH-1. A marcação do M2 e OH-1 foi mais evidente nos animais tratados com tioglicolato + 15d-PGJ<sub>2</sub>. Os resultados sugerem que a administração periférica da 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM de ratos ativa os receptores PPAR $\gamma$  localizados nos macrófagos residentes, induzindo alteração fenotípica para macrófagos tipo M2, através da via da heme oxigenase 1, promovendo resolução do processo inflamatório. O efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> é independente da ativação da proteinoquinase dependente de Ca<sup>+2</sup>/calmodulina.

**PALAVRAS CHAVES: 15d-PGJ<sub>2</sub>, PPAR $\gamma$ , macrófagos, hemoxigenase, analgesia**

## Abstract

The 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), a natural ligand of receptors activated by peroxisome proliferators (PPARs), has been considered a promising therapeutic strategy for inflammatory diseases. Previous studies suggest that the potential antinociceptive and anti-inflammatory effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> inflammatory pain in the temporomandibular joint (TMJ) is linked to activation of resident macrophages in periarticular tissue. Thus, the aim of this study was to evaluate: (1) to 15d-PGJ<sub>2</sub>, to bind PPAR $\gamma$  receptor, promotes phenotypic change in the resident type M1 macrophages to M2 via signaling hemoxygenase type 1 (OH-1) promoting action termination of the inflammatory process; and (2) whether the analgesic effect promoted by the release of endogenous opioids by macrophages activated by 15d-PGJ<sub>2</sub> is mediated activation of neuronal pathway L-Arginine / NO / cGMP / K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> by protein kinase dependent Ca<sup>+2</sup>/ Calmodulin in ATM mice. For this study were used male Wistar rats ( $\pm$  150 g, n = 8 animals per group), from the CEMIB previously approved by the Ethics Committee on Animal Use (# 3414-1). Analysis by ELISA showed that intra-articular administration of 15d-PGJ<sub>2</sub> (100 ng / ATM) increases the release of the activated transcription factor PPAR $\gamma$  (P <0.05: One-way ANOVA, Tukey Test). The treatment of the animals with the recruiter thioglycolate macrophages (1%/ATM / day) significantly increased the release of activated transcription factor PPAR $\gamma$  in animals treated with 15d-PGJ<sub>2</sub>. The analysis of the expression of protein kinase dependent Ca<sup>+2</sup>/ calmodulin showed no difference between the groups tested (P >0.05: One-way ANOVA, Tukey test). Histological sections of the periarticular tissues treated with immunohistochemistry showed positivity for markers of macrophages M1, M2 and OH-1. The mark M2 and OH-1 was evident in animals treated with thioglycollate + 15d-PGJ<sub>2</sub>. The results suggest that peripheral administration of 15d-PGJ<sub>2</sub> in the active ATM rat PPAR $\gamma$  receptors located in the resident macrophages, inducing phenotypic change to M2 type macrophage, through the pathway of heme oxygenase 1, promoting resolution of the inflammatory process. The antinociceptive effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> is independent of the activation of protein kinase dependent Ca<sup>+2</sup>/ calmodulin.

**Key Words: 15d-PGJ<sub>2</sub>, PPAR $\gamma$ , macrophages, hemoxygenase, anagelsia**

## Lista de Abreviaturas e siglas

**15d-PGJ<sub>2</sub>** – 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandinaJ<sub>2</sub>

**ATM** – Articulação temporomandibular

**CaMKII** – Proteinoquinase dependente de Ca<sup>+2</sup>/calmodulina II

**DTM** – Desordens temporomandibulares

**HO-1** – Heme-oxigenase 1

**M1** – macrófagos classicamente ativados

**M2** – macrófagos alternativamente ativados

**NO** – óxido nítrico

**PPAR $\gamma$**  – receptores ativados por proliferadores de peroxissomas gamma

**sNOS** – óxido nítrico sintetase

## Sumário

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
<b>3.PROPOSIÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>4.MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>5.RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>6.DISSCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>7.CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO 1 : Certificado de aprovação do CEUA/UNICAMP</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 2 : Certificado de apresentação do painel na SBFTE/2015</b>	<b>52</b>

## 1. Introdução

As desordens temporomandibulares (DTMs) compreendem um grupo de diversas condições que resultam em dor na articulação temporomandibular e/ou dor na musculatura mastigatória, fatores comuns para o desenvolvimento de dor crônica orofacial (Cairns, 2010). A etiologia da DTM é considerada complexa e multifatorial por envolver fatores de origem anatômica, oclusal, muscular e psicológica. É caracterizada pela presença de sinais e sintomas como ruídos articulares, redução da amplitude ou alteração dos movimentos mandibulares, limitações funcionais, dores na musculatura mastigatória, na região pré-auricular e/ou na própria articulação (Garcia et al., 2000; Ash et al., 2001; Ozan et al., 2007; Silveira et al., 2007). Como a dor é a principal reclamação dos pacientes com DTM, e as estratégias para o controle da dor relacionada com as DTMs são insatisfatórias, o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas mais eficazes para o controle da dor é de grande interesse para pacientes e clínicos (Cairns, 2010).

O receptor ativado pelo proliferador peroxissoma tipo  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) é membro da superfamília de receptores nucleares e um fator de transcrição ativado por ligantes (Escher, 2000), com efeitos pleiotrópicos sobre a diferenciação dos adipócitos, homeostase da glicose, metabolismo dos lípidos, o crescimento celular, e a inflamação (Surh YJ et al., 2011). Neste sentido, os ligantes do PPAR, tais como a 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin $J_2$  (15d-PG $J_2$ ) – um dos derivados do metabolismo da prostaglandina D2 e ligante natural para PPAR $\gamma$  – vem representando uma promissora estratégia terapêutica para doenças inflamatórias.

Considerando estes dados, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a administração periférica da 15d-PG $J_2$  na articulação temporomandibular (ATM) de ratos previne a sensibilização dos nociceptores mediado pelo PPAR $\gamma$  (Pena-dos-Santos et al., 2009; Quinteiro et al., 2012; Clemente-Napimoga et al., 2012). Os dados sugerem que o efeito antinociceptivo da 15d-PG $J_2$  mediado pela ativação do PPAR $\gamma$  na ATM se dá por dois mecanismos distintos: (1) Uma vez liberado no tecido periarticular, a 15d-PG $J_2$  ativa os receptores PPAR $\gamma$  expressos em macrófagos residentes ocasionando a liberação dos peptídeos opióides endógenos  $\beta$ -endorfina e dinorfina (Macedo et al., 2016 submetido para publicação, CNPQ # 483988/2012). Os peptídeos opióides liberados, ativam os receptores  $\kappa$  e  $\delta$  opióides nos neurônios nociceptivos aferentes primários, estimulando a via antinociceptiva L-Arginina/NO/cGMP/ $K^+_{ATP}$ , de forma independente da fosforilação das enzimas

PI3K/Proteinoquinase B (AKT), resultando na hiperpolarização da membrana e antinocicepção (Pena-dos-Santos et al., 2009; Quinteiro et al., 2012; Macedo et al., 2016). (2) A 15d-PGJ<sub>2</sub> aumenta a expressão do fator de aceleração de decaimento (CD55), molécula anti-adesiva que promove a depuração da ligação dos leucócitos com as células endoteliais, que associada a inibição da cascata hipernociceptiva mediada pelo Fator de Necrose Tumoral – alpha (TNF- $\alpha$ ) promovendo um potente efeito anti-inflamatório (Quinteiro et al., 2012; Quinteiro et al., 2014).

De acordo com estes estudos, nosso grupo demonstrou que o efeito antinociceptivo dos agonistas específicos para os receptores  $\kappa$  e  $\delta$  opióides também dependem da ativação da via PI3K/AKT pathway (Macedo et al., 2016). Por outro lado, apesar do efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> ser mediado pelos receptores  $\kappa$  e  $\delta$  opióides seguido da ativação da via intracelular NO/cGMP/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> nos neurônios nociceptivos primários, este mecanismo é independente da via PI3K/AKT. Neste sentido, tem sido demonstrado que os receptores opióides podem também estimular a produção de NO pelos neurônios nociceptivos primários através da ativação da NO-sintase pela proteinoquinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina. Sendo assim, a primeira hipótese que foi testada no presente estudo foi que o efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> é mediado pelos receptores PPAR $\gamma$  nos macrófagos residentes os quais liberam opióides endógenos ativando os receptores  $\kappa$  e  $\delta$  opióides que promovem hiperpolarização dos neurônios nociceptivos primários através da ativação da via intracelular Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina/NO/cGMP/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>.

A literatura tem demonstrado que macrófagos ativados apresentam uma expressão significativa de PPAR $\gamma$  (Chawla et al., 2001). E que sua ativação por agonistas promove uma mudança fenotípica da infiltração de macrófagos M1 (macrófagos que aumentam a atividade microbicida e mediadores pro-nociceptivos) para M2 (macrófagos que tem funções homeostáticas) em tecidos inflamados, aumentando a expressão gênica do opióide endógeno procencefalina através de uma via hemoxigenase dependente. Sendo assim, a segunda hipótese que foi testada neste estudo foi que os animais submetidos a um processo inflamatório na ATM e tratados com a 15d-PGJ<sub>2</sub> tem aumentado a liberação de opióides endógenos via macrófagos, através de uma mudança fenotípica de macrófagos M1 para M2 através de uma via dependente da heme-oxigenase (HO)1.

Considerando o potencial efeito terapêutico da 15d-PGJ<sub>2</sub>, a melhor elucidação dos mecanismos envolvidos com seu efeito anitnociceptivo é de relevância clínica e farmacologia, uma vez que, a 15d-PGJ<sub>2</sub> pode ser considerada uma nova perspectiva terapêutica para o tratamento clínico das condições dolorosas provenientes da ATM.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1. ATM e Desordens temporomandibulares (DTM)

A ATM é uma articulação bilateral que se movimenta sinergicamente, caracterizada como uma articulação sinovial bilateral composta por um côndilo mandibular e sua correspondente cavidade temporal (fossa glenóide e eminência articular), com a presença de um disco articular (Murphy et al., 2013). A articulação temporomandibular (ATM) é uma das mais utilizadas no corpo humano, sendo considerada uma estrutura anatômica complexa, que com a participação de grupos musculares especiais, possibilita a mandíbula executar variados movimentos durante a mastigação e fala (Amantéa et al., 2004; Nunes & Maciel, 2005; Ingawalé & Goswami, 2009).

As DTMs são um conjunto de desordens musculoesqueléticas e neuromusculares que afetam a articulação temporomandibular (ATM) e tecidos circundantes, caracterizadas por limitação dos movimentos articulares, dor e ruído articular (Leeuw et al, 2013). A Disfunção Temporomandibular (DTM) constitui em uma condição na qual há uma desarmonia no sistema estomatognático, podendo ocorrer envolvimento e prejuízo nos músculos mastigatórios, na ATM propriamente dita, ou em ambos (Okeson, 1997; Quinto, 2000; Vazquez-Delgado et al., 2004; Leeuw, 2010). Na região orofacial, correspondem à condição de dor crônica de maior prevalência, e parecem ser até duas vezes mais comuns em mulheres que em homens (Leeuw, 2010) e esses dados sugerem que os hormônios sexuais atuam modulando a dor na ATM.

A dor é um dos sinais clássicos de processo inflamatório apresentando como denominador comum a sensibilização dos receptores nociceptivos aferentes primários decorrentes de estímulos inflamatórios ou lesões teciduais. Em particular, a dor da ATM é resultado de episódios inflamatórios envolvendo mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e aminas simpatomiméticas (Kopp, 2001; Rodrigues et al., 2006) que estão presentes em altos níveis no fluido sinovial dos pacientes com DTM (Kopp, 2001).

## **2.2. Dor**

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. A sensação dolorosa tem papel fisiológico e funciona como um sinal de alerta para percepção de algo que está ameaçando a integridade física (IASP). A dor é um dos sinais clássicos de processo inflamatório apresentando como denominador comum a sensibilização dos receptores nociceptivos aferentes primários. Decorrente de estímulos inflamatórios ou lesões teciduais, a liberação de citocinas e quimiocinas pró e antiinflamatórias desencadeiam a liberação de prostanoídes e aminas simpatomiméticas que por sua vez atuam diretamente nos nociceptores causando a hipernocicepção, resultado da redução do limiar de excitabilidade devido à modulação de canais de sódio voltagem-dependentes (Khasar et al. 1999, Verri et al, 2006). Nos seres humanos, esta sensibilização do nociceptor geralmente leva a condições clínicas conhecidas como hiperalgesia (uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso) ou alodinia (dor devida a um estímulo que normalmente não provoca dor) (IASP).

## **2.3. Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs)**

Receptores nucleares são fatores de transcrição ligantes dependentes que regulam uma série de genes relacionados ao controle de crescimento celular, diferenciação celular, e homeostasia (Ricote et al., 1999). Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são um tipo de receptores nucleares, que regulam a expressão do gene-alvo pela ligação a específicos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPREs) situados em sítios regulatórios de cada gene (Wahli et al., 1995). O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR); e ao ser estimulado por ação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcricionais, resultando em aumento na transcrição gênica (Tavares et al.,2007). São conhecido três subtipos de PPAR:  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , que estão dispostos em diferentes tecidos e estão relacionados com ligantes seletivos e principalmente envolvidos na regulação do metabolismo dos lipídios, proliferação

celular e resposta inflamatória (Gill et al.,2013). O receptor PPAR- $\alpha$ , é predominantemente expresso em células do fígado, rins, intestino e tecido adiposo e estão relacionados com o aumento da liberação de enzimas associadas com a oxidação de ácidos graxos e o metabolismo de lipoproteínas. PPAR- $\delta$  é expressa na grande maioria das células, mas nenhum papel específico foi descrito para esta isoforma. Em contrapartida, o receptor PPAR- $\gamma$  vem se destacando pois, além de estar presente em células do tecido adiposo e estar sendo relacionado com aspectos críticos da diferenciação de adipócitos e metabolismo da glicose, recentemente foi observado que ele também é expresso em células como monócitos e macrófagos ativados, tendo várias funções atribuídas para o PPAR- $\gamma$  em macrófagos, mas o verdadeiro papel deste fator de transcrição permanece obscuro (Chawla et al., 2001; Ricote et al., 1999).

#### **2.4. Agonista de PPAR**

Os ativadores PPAR inibem a ativação de genes de resposta inflamatória por interferir negativamente nas vias de sinalização, e exercem essas atividades antiinflamatórias em células como monócitos-macrófagos, endoteliais, epiteliais e musculares lisas em que o receptor é expresso (Gill et al.,2013). Foi relatado que o agonista sintético de PPAR-gamma, rosiglitazona, atenua a alodínia táctil através do controle da ativação dos macrófagos na fase precoce (aguda) da dor neuropática induzida pela ligação parcial do nervo ciático. Além disso, a rosiglitazona reduziu a hiperalgesia aguda, por meio de uma mudança de fenotipagem de macrófagos nos locais de injúria em dor pós-incisional (Hasegawa-Moriyama et al., 2012). Apesar da sua ação periférica, estudos vêm demonstrando sua participação na regulação do sistema nervoso central. A sinalização dos receptores PPAR- $\gamma$  promoveu uma atividade neuroprotetora e resultou numa melhora neurológica após isquemia cerebral e lesão medular, alterando genes de indução inflamatória em macrófagos/micróglia. Recentemente, foi relatado que a ativação do PPAR- $\gamma$  exerce efeitos analgésicos, através da regulação da ativação de macrófagos em um modelo pós-incisional em rato (Hasegawa-Moriyama et al., 2013). Tais resultados suportam a hipótese de que as respostas neuroinflamatórias podem ser controladas e/ou moduladas através da ativação da sinalização PPAR- $\gamma$  nos macrófagos durante o desenvolvimento da dor neuropática. Sendo assim, os dados indicam um papel

modulatório para o receptor no controle da resposta inflamatória (Bocher et al., 2002; Hasegawa-Moriyama et al., 2012,2013).

## **2.5. Receptores opióides:**

Dor crônica e aguda são frequentemente associadas com processo inflamatório, como resultado da destruição tecidual, reações imunes atípicas ou por lesão neuronal. Dentro do contexto de sensibilização periférica, neurônios aferentes primários transduzem sinais mecânicos, químicos e térmicos e convertem-nos em potenciais de ação. Neste sentido, a classe dos opióides são as drogas mais usadas para tratamento de condições dolorosas agudas e crônicas (Stein et al., 2003). Já se sabe que os receptores opióides são membros da família de sete receptores transmembranares de proteína G acoplado a receptores (GPCR). Uma vez ativados pelos seus ligantes, a proteína G dissocia-se nas subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta/\gamma$  subunidades que ativam vários efetores, incluindo a inibição da produção de cAMP ou interagindo diretamente com diferentes canais iônicos na membrana (Stein et al., 2011). Atualmente são identificados três tipos de receptores opióides: mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) e delta ( $\delta$ ). Todos os três tipos modulam a inibição da dor e são encontrados em todo o sistema nervoso, em neurônios somáticos e sensitivos, em projeções da medula espinhal, no mesencéfalo e córtex (Kieffer et al., 2002). Porém todos os três tipos de receptores opióides induzem a hiperpolarização da membrana como resultado do aumento da atividade de canais de potássio (Stein et al., 2003). Corroborando com estes efeitos nos canais de potássio, foi visto que os opióides atenuam a excitabilidade de nociceptores, conseqüentemente a propagação de potenciais de ação e a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios, tendo a soma de todos esses mecanismos um efeito analgésico e anti-inflamatório (Stein et al., 2001).

## **2.6. Peptídeos opióides endógenos**

Três famílias de peptídeos opióides endógenos são bem estabelecidas: endorfina, encefalina e dinorfina. Cada família é derivada de distintos precursores: pró-opiomelanocortina (POMC), pró-encefalina (PENK), pró-dinorfina. Além disso, cada opióide peptídeo apresenta diferente afinidade e selectividade para cada um dos receptores (Machelska et al., 2007; Akil et al., 1998). Em condições dolorosas relacionadas à inflamação, POMC, PENK e pró-dinorfina foram encontradas em células circulantes e linfonodos. Em tecidos injuriados, esses peptídeos foram mais

liberados por linfócitos, monócitos e macrófagos. Particularmente, opióides peptídeos endógenos estão presentes em migrações leucocitárias nos tecidos inflamados, sendo esta população celular composta de granulócitos, monócitos/macrófago e linfócitos (Stein et al., 2011). Além disso, estas células leucocitárias apresentam grânulos de secreção contendo endorfina, disposta na periferia da célula, pronta para serem liberadas (Mousa et al., 2004). Sendo assim, é dito que a potência do efeito intrínseco inibitório da dor é proporcional ao número de imunócitos que produzem opióides (Stein et al., 1993; Schafer et al., 1994). Portanto, a ativação de receptores opióides pelos peptídeos opióides endógenos ou exógenos sintéticos vem demonstrando capacidade para modular a proliferação de células imunológicas, quimiotaxia, citotoxicidade, e síntese e liberação de citocinas e quimiocinas (Stein et al., 2011).

## **2.7. 15-deoxy $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandina (15d-PGJ<sub>2</sub>)**

A 15-deoxy $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandina (15-D-PGJ<sub>2</sub>), é uma prostaglandina ciclopentenona (PG) que é formada após a desidratação e a isomerização da PGJ<sub>2</sub> (um metabólito da PGD<sub>2</sub>) que apresenta uma maior reatividade e potencial biológico em muitos sistemas celulares (Milne GL et al., 2011). A 15d-PGJ<sub>2</sub> é uns dos produtos finais da cascata do ácido araquidônico. Esta cascata é uma via metabólica do corpo humano que sintetiza uma grande variedade de mediadores químicos. Sua síntese inicia-se quando, por algum estímulo, seja fisiológico, farmacológico ou até patológico, a Fosfolipase A<sub>2</sub>, presente na membrana celular, hidrolisa os fosfolípidios da membrana, liberando o ácido araquidônico. Livre, ele pode ser substrato para duas vias enzimáticas, a da cicloxigenase e a lipoxigenase. O ácido araquidônico é convertido em prostaglandina G<sub>2</sub>, pela via da cicloxigenase, e posteriormente em prostaglandina D<sub>2</sub>, que por um processo de desidratação converte-se em 15d-PGJ<sub>2</sub> (Surh et al. 2011).

A ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) desempenha um papel na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, estabelecendo assim a instalação de um processo de inflamação aguda. No entanto, diversas linhas de estudos sugerem que a indução de COX-2, também contribui para o processo resolutivo da inflamação através da produção da 15d-PGJ<sub>2</sub>, uma prostaglandina amplamente relacionada a processos resolutivos, como em modelos de pancreatite, artrite reumatoide, modelos de lesões endoteliais e vascular, inflamação (Surh et al. 2011). Este lipídio

eletrofílico pode ligar-se diretamente a algumas proteínas e mudar a sua estrutura e função. Tem sido demonstrado que esta ligação provoca respostas biológicas importantes, incluindo a proteção contra lesões/agentes inflamatórios, bem como em reações de stress oxidativo (Oh JY et al., 2008).

Algumas dessas atividades estão associadas com a observação de que este composto (15d-PGJ<sub>2</sub>) ativa os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (Schoonjans et al., 1997; Ricote et al., 1998). A 15d-PGJ<sub>2</sub> difere de outras prostaglandinas, tanto na sua composição química, como em sua atividade biológica (Surh et al., 2011). Embora uma das principais prostaglandinas formadas pela COX-2, 15d-PGJ<sub>2</sub> tem efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativas e citoprotectores. Foi visto que, a 15d-PGJ<sub>2</sub> é produzida em abundância em locais de inflamação, e o seu potencial protetor de células e tecidos a partir de inflamação aguda, especialmente por facilitar a resolução da inflamação, tem sido sugerido (Scher JU et al., 2005; Straus DS et al., 2001).

Neste sentido, os ligantes do PPAR, tais como a 15d-PGJ<sub>2</sub> – um dos derivados do metabolismo da prostaglandina D<sub>2</sub> e ligante natural para PPAR- $\gamma$  (Schoonjans et al., 1997; Ricote et al., 1998) – vem representando uma promissora estratégia terapêutica para doenças inflamatórias (Chima et al., 2008; Cuzzocrea et al., 2003; Kaplan et al., 2005; Napimoga et al., 2008a, 2008b; Shan et al., 2004), especialmente aquelas que induzem dor inflamatória (Pena-dos-Santos et al., 2009; Quinteiro et al., 2012) e danos neurais (Hyong et al., 2008; McTigue et al., 2007; Park et al., 2007; Pereira et al., 2006; Sundararajan et al., 2005; Tureyen et al., 2007; Zhao et al., 2005).

Tem sido demonstrado que a variação de níveis de 15d-PGJ<sub>2</sub> está associado com processos inflamatórios, sugerindo que este receptor desempenha um papel importante na modulação da reação inflamatória. Diversos estudos tem confirmado que a ativação de receptores PPAR- $\gamma$  pela 15d-PGJ<sub>2</sub>, produz efeitos antiinflamatórios como a inibição da expressão de vários genes de resposta inflamatória em macrófagos ativados, incluindo os genes que codificam o TNF- $\alpha$ , gelatinase B, e ciclo-oxigenase (COX-2). Corroborando com estes resultados, inúmeros tratamentos in vivo com agonistas de receptor PPAR- $\gamma$  foram relatados por atenuar modelos doenças inflamatórias, como a colite em camundongos e a artrite induzida por adjuvante em ratos (Napimoga et al., 2007; Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1998).

## 2.8. Potencial efeito anti-inflamatório e analgésico da 15d-PGJ<sub>2</sub>

Foi estabelecido que 15d-PGJ<sub>2</sub> promove analgesia periférica na pata de ratos pela estimulação da liberação de opióides endógenos (Napimoga et al., 2008b). O efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> na resposta nociceptiva induzida por formalina na ATM de ratos, parece envolver um efeito periférico de opióides, visto que o seu efeito antinociceptivo foi bloqueado pela injeção intra-articular na ATM de naloxona, um antagonista não seletivo de receptores de opióides (Napimoga et al., 2008b). Foi demonstrado que a 15d-PGJ<sub>2</sub> tem potencial antinociceptivo periférico e efeito anti-inflamatório na ATM, através da ativação de receptores PPAR- $\gamma$ , e co-ativação receptores opióides, em específico  $\kappa$  e  $\delta$  opióides (Pena-dos-Santos et al., 2009).

Similar aos opióides periféricos, o mecanismo antinociceptivo de 15d-PGJ<sub>2</sub> envolve a ativação da via da L-arginina/NO/cGMP/PKG. Esta conclusão é sustentada pela observação de que a analgesia periférica da 15d-PGJ<sub>2</sub> foi inibida pelo uso de bloqueadores específicos para NOS, GMPc e PKG. Esta atividade analgésica ocorre pela abertura de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-dependentes, que se baseia na observação de que o efeito analgésico da 15d-PGJ<sub>2</sub> é inibida pelo uso de glibenclamida, um bloqueador de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-dependentes (Pena-dos-Santos et al., 2009).

É bem estabelecido na literatura que a ativação de receptores opióides em neurônios nociceptivos primários ativam vias de sinalização celular, tais como a via do NO-GMPc (Ferreira et al., 1991; Amarante et al., 2002; Leáñez et al., 2009; Clemente-Napimoga et al., 2009). Além do mais, mais recentemente tem sido demonstrado que o efeito antinociceptivo periférico da morfina (ligante de receptor opióides) é mediado pela fosforilação das enzimas PI3K/AKT, que por sua vez, ativa a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e conseqüente produção de óxido nítrico (NO), o qual aumenta as correntes dos canais de K<sup>+</sup>ATP resultando em uma hiperpolarização dos neurônios nociceptivos. Entre a família de enzimas PI3K, PI3K  $\gamma$  é ativada pelas subunidades  $\beta\gamma$  de receptores acoplados à proteína G, incluindo os receptores de opióides (Stephens L, et al. 1994). Dessa forma, foi demonstrado que o aumento nos níveis de NO pelos neurônios da raiz do gânglio dorsal foi bloqueada pela administração de bloqueador não seletivo para PI3K e AKT (Cunha et al., 2010). Outro trabalho demonstrou que a ativação de receptores kappa opióides por agonistas sintéticos seletivos (U50488) inibiu a hiperalgesia inflamatória pela ativação da via da PI3K/Proteinoquinase B (AKT) e conseqüente ativação da via

intracelular antinociceptiva da NO/cGMP/  $K^+_{ATP}$ , inibindo a transmissão sináptica através da hiperpolarização da membrana neural (Cunha et al., 2012).

### **2.9. Proteinoquinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII)**

Em estudo recente foi demonstrado que o efeito antinociceptivo dos agonistas específicos para os receptores  $\kappa$  e  $\delta$  opióides na ATM dependem da ativação da via PI3K/AKT para desencadear o efeito analgésico. Contudo, apesar do efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> ser mediado pelos receptores  $\kappa$  e  $\delta$  opióides seguido da ativação da via intracelular NO/cGMP/  $K^+_{ATP}$  nos neurônios nociceptivos primários, este mecanismo é independente da via PI3K/AKT (Macedo et al., 2016). Estes resultados sugerem que as vias pelas quais os opióides endógenos e opióides sintéticos, ainda que ativem semelhantes receptores, agem e respondem de forma diferentes. Neste sentido, tem sido demonstrado que os receptores opióides podem também estimular a produção de NO pelos neurônios nociceptivos primários através da ativação da NO-sintase pela proteinoquinase dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina. O óxido nítrico (NO) sintetizado a partir do óxido nítrico sintase (nNOS) tem vários efeitos fisiológicos, em grande parte associado a regulação da guanilato ciclase solúvel, levando à produção de GMPc (Bredt et al., 1994). Os CaMKs [ $Ca^{2+}$ /CAM (quinases dependentes de calmodulina)] desempenham papéis críticos na transdução de processamento por aumentar a  $Ca^{2+}$  intracelular (Takata et al., 2011). Entre eles, CaMKs multifuncionais, tais como CaMKII e membros da cascata de CaMK, estão presentes na maioria dos tecidos de mamíferos, mas são particularmente abundantes no cérebro, onde fosforilam e regulam numerosos substratos proteicos (Wayman et al., 2008). Desta forma, foi demonstrado que os receptores opióides também podem estimular a produção de NO pelos neurônios nociceptivos primários a partir da ativação de óxido nítrico sintase por  $Ca^{2+}$ /dependente de calmodulina proteína quinase (CaMK), que catalisam a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina (Takata et al., 2011). Além disso, foi visto que a ativação de receptores  $\kappa$ -opióides aumentam significativamente os níveis de imunoreatividade da  $Ca^{2+}$ /CaMKII fosforilada em amígdalas de rato (Yoshizawa K. et al., 2011),

## **2.10. Polarização fenotípica em macrófagos residentes**

Outro aspecto a ser considerado é a presença do PPAR- $\gamma$  nos macrófagos residentes no tecido periarticular (Macedo et al., 2016). A literatura tem demonstrado que macrófagos ativados apresentam uma expressão significativa de PPAR- $\gamma$  (Chawla et al., 2001). Além do mais, um estudo recente demonstrou que a ativação do PPAR $\gamma$  por agonistas promove uma mudança fenotípica da infiltração de macrófagos M1 (macrófagos que aumentam a atividade microbicida e mediadores pronociceptivos) para M2 (macrófagos que tem funções homeostáticas) em tecidos inflamados, aumentando a expressão gênica do opióide endógeno procencefalina através de uma via hemoxigenase dependente (Hasegawa-Moriyama et al., 2013).

Os macrófagos podem adquirir distintos fenótipos, que dependem do microambiente em que essas células se encontram. Há dois fenótipos bem estabelecidos na literatura: os macrófagos classicamente ativados (M1), que sintetizam altos níveis de mediadores tóxicos, associados com o aumento da atividade microbicida e mediadores pró-nociceptivos, como a óxido nítrico sintase (iNOS); e os macrófagos alternativamente ativados (M2), de caráter resolutivo, representada por funções homeostáticas relacionadas a reparação tecidual e cicatrização. O balanço entre esses dois fenótipos é tem papel crucial na regulação da inflamação nos tecidos periféricos (Hasegawa-Moriyama et al., 2013). Durante o período de cicatrização das lesões, macrófagos M2 sofrem uma transição de fenotipagem, de pró-inflamatórios para aos fenótipos resolutivos, que é importante para a regulação da angiogênese, formação de tecido de granulação e de encerramento de feridas (Mirza et al., 2015). Na ausência de sinalização do PPAR-gama, macrófagos não suprimiram a produção de citocinas inflamatórias e não adquiriram atividade metabólica oxidativa associada com o fenótipo M2. De fato, a ativação de PPAR-gamma potencia polarização de monócitos circulantes para macrófagos do fenótipo M2 (Bouhlef MA, et al., 2007).

## **2.11. Heme-oxigenase (HO-1)**

A heme-oxigenase (HO-1) é uma enzima limitante da velocidade microssomal que catalisa a degradação da heme (Maines et al., 2000). HO-1, uma proteína de stress-induzível, sendo induzida por vários sinais oxidativos e inflamatórios. Por conseguinte, a expressão de HO-1 foi considerada como uma resposta celular adaptativa contra resposta inflamatória e lesão oxidativa (Naito et al., 2014). Além

disso, foi relacionada como um gene alvo de PPAR em células vasculares (Kronke G et al., 2007), e também está implicada como um mediador chave para a polarização de macrófagos para um fenótipo M2 (Weis N et al., 2009). Sendo assim, esses relatos sugerem que a sinalização/ativação do PPAR regula a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 através de um mecanismo de HO-1-dependente (Hasegawa-Moriyama et al., 2013).

### **3. Proposição**

O presente estudo teve como objetivo avaliar a alteração fenotípica de de macrófagos em animais tratados com a 15d-PGJ<sub>2</sub>, assim como a participação da proteinoquinase dependente de Ca<sup>+2</sup>/calmodulina (CaMKII) no efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> mediado pelos receptores PPAR $\gamma$ .

#### **3.1. Objetivos Específicos**

3.1.1. Confirmar a presença do PPAR $\gamma$  em macrófagos da ATM de ratos e quantificar o fator de transcrição do PPAR $\gamma$  ativado em animais com injúria inflamatória induzida por carragenina e tratados com o agonista do PPAR $\gamma$ , 15d-PGJ<sub>2</sub>;

3.1.2. Avaliar as mudanças fenotípicas dos macrófagos de M1 para M2 no tecido periarticular inflamado e tratado com o agonista do PPAR $\gamma$ , 15d-PGJ<sub>2</sub>;

3.1.3. Avaliar se a alteração fenotípica em macrófagos é mediado pela via heme-oxigenase (HO-1);

3.1.4. Avaliação da liberação da CaMKII no tecido periarticular inflamado tratado com o agonista do PPAR $\gamma$ , 15d-PGJ<sub>2</sub>;

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos Wistar ( $\pm$  150g, n=8 animais por grupo) provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório) e mantidos no Biotério da FOP - UNICAMP. O delineamento dos grupos experimentais foi feito adotando-se: valor crítico para grau de confiança de 95% (1,96); desvio máximo 0,2236 (22,36%), baseado no estudo anterior da literatura e experimentos preliminares; erro padrão mínimo que se deseja encontrar de  $\pm 5\%$  da média (50%); e nível de significância de  $p < 0,05$ . Segue o cálculo:  $n = 1 + [2C \times (s/d)^2]$   $n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2236/0,5)^2]$   $n = 1 + [21,02 \times (0,4472)^2]$   $n = 1 + [21,02 \times 0,2]$   $n = 1 + 4,204$   $n = 5,204$  Sendo que o n deve ser arredondado para o próximo número inteiro. Ou seja,  $n = 6$  animais. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12 h) e temperatura ( $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) com alimentação e água, *ad libitum*. Os procedimentos experimentais propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEUA #3414-1) e está de acordo com as diretrizes determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

### 4.2 Drogas

Foi utilizado: carragenina (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), diluída em 0,9% NaCl aquecida a  $60^\circ\text{C}$ , na dose de 100  $\mu\text{g}/15\mu\text{l}$ ; 15d-PGJ<sub>2</sub> foi obtida de Calbiochem (San Diego, CA, USA) diluídas em 0,9% NaCl na dose de 100 ng/15 $\mu\text{l}$ ; tioglicolato 3% (DIFCO Laboratories Detroit, MI, USA) e diluído em 0,9% NaCl na concentração de 1%.

### 4.3 Injeção intra-articular na ATM

Os animais foram anestesiados brevemente por 30 segundos, através da inalação de isoflurano. Em seguida uma agulha calibre 30G, acoplada a uma seringa Hamilton (50  $\mu\text{l}$ ) por meio de uma cânula de polietileno P20, foi introduzida na ATM. O ponto de referência para a injeção intra-articular foi a borda do arco zigomático na

região póstero-lateral do cômulo. Os animais retornaram a consciência aproximadamente 30 segundos após o término da inalação do anestésico.



**Figura 1.** Animal sob efeito de anestesia inalatória durante injeção intra-articular na ATM.

#### 4.4 Delineamento experimental

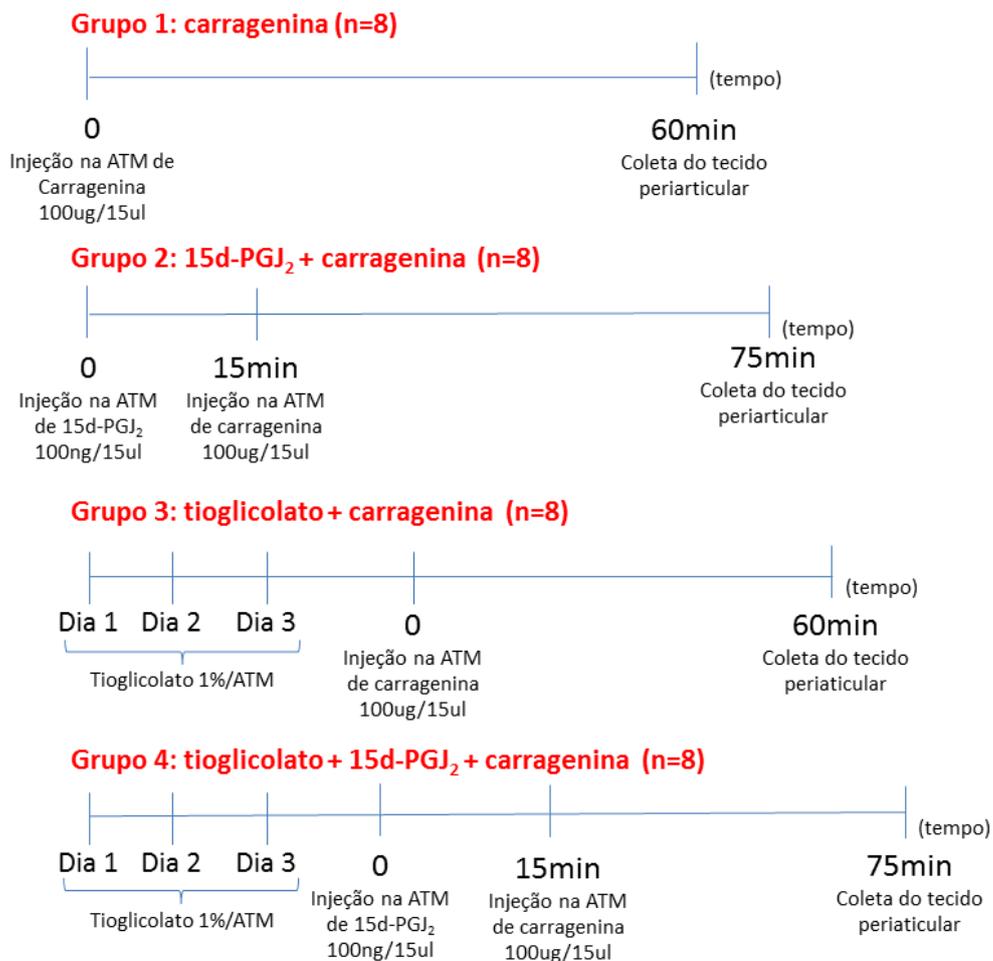
Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizados 4 grupos experimentais:

**Grupo 1:** Injeção intra-articular de carragenina 100  $\mu\text{g}/\text{ATM}$  (Pena-dos-Santos et al., 2009) e uma hora depois os animais foram mortos por anestesia e amostras do tecido periarticular foram removidas.

**Grupo 2:** Injeção intra-articular de 15d-PGJ<sub>2</sub> 100 ng/ATM (Pena-dos-Santos et al., 2009) 15 minutos antes da injeção intra-articular de carragenina 100  $\mu\text{g}/\text{ATM}$ , e uma hora depois os animais foram mortos por anestesia e amostras do tecido periarticular foram removidas.

**Grupo 3:** Os animais foram pré-tratados com um recrutador de macrófagos (Tioglicolato 1 %/ATM/dia) durante 3 dias. Após este período, os animais receberam uma injeção intra-articular de carragenina 100  $\mu\text{g}/\text{ATM}$  (Pena-dos-Santos et al., 2009) e uma hora depois os animais foram mortos por anestesia e amostras do tecido periarticular foram removidas.

**Grupo 4:** Os animais foram pré-tratados com um recrutador de macrófagos (Tioglicolato 1%/ATM/dia) durante 3 dias. Após este período, os animais receberam uma injeção intra-articular de 15d-PGJ<sub>2</sub> 100 ng/ATM 15 minutos antes da injeção intra-articular de carragenina 100 µg/ATM e uma hora depois os animais foram mortos por anestesia e amostras do tecido periarticular foram removidas.



**Figura 2.** Fluxograma do delineamento experimental.

## 4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

**4.5.1 Para as análises utilizando os métodos Western Blot e ELISA:** os animais foram mortos por aprofundamento de anestesia e deslocamento cervical, e os tecidos periarticulares de ambas as ATM foram removidas, sendo duas ATM compondo uma única amostra, e armazenado a -80°C. Assim, para estas análises foram utilizados 4 animais por grupo. Posteriormente os tecidos foram

homogeneizados em solução Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo 0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), 0,1mM de fenil-metil-sulfonil fluoreto, 0,1mM de cloreto de benztônico, 10mM de EDTA e 20KI/ml de aprotinina (Sigma, USA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 RPM/ 10 min/ 4°C). O total de proteínas extraídas foi avaliado utilizando o kit colorimétrico para dosagem proteica BCA (Thermo Scientifi) e o sobrenadante estocado a -20°C para análises posteriores.



**Figura 3.** Remoção do tecido periarticular

**4.5.2. Para realização das análises utilizando o método de imunohistoquímica:** os animais foram anestesiados e perfundidos com uma solução salina heparinizada (200 ml) seguida de uma solução de paraformaldeído 4% em PBS, pH 7.4 (Sigma-Aldrich). O tecido periarticular esquerdo de 4 animais foi removido e cuidadosamente emblocados em parafina, mantendo sua posição original.

#### **4.6 ELISA**

Para esta análise foram usadas as amostras já homogeneizadas para avaliar a liberação do fator de transcrição ativados do PPAR $\gamma$  (TransAM PPAR $\gamma$  - Active Motif Europe, Rixensart, Belgium). Este kit é composto por poços já sensibilizados, portanto iniciamos adicionando 40  $\mu$ l de Complete Binding Buffer em todos os poços

que foram usados. Em seguida foi adicionado 10 µl das amostras em seus respectivos poços. No poço correspondente ao blank foi adicionado 10 µl de Complete Lysis Buffer, e no poço do controle positivo foi adicionado 10 µl de padrão diluído em Complete Lysis Buffer, seguida por 1 hora de incubação em temperatura ambiente sob agitação (100rpm). Os poços foram então lavados com 200 µl por 3 vezes com 1x Wash Buffer. Feita as lavagens, foi pipetado 100µl do anticorpo primário do PPAR $\gamma$  (1:1000) e incubado por 1 hora sem agitação, seguida de 3 lavagens com tampão. Posteriormente foi adicionado 100 µl de anti-mouse HRP-conjugado (1:1000) como anticorpo secundário, e incubado por 1 hora sem agitação. Lavar os poços 4 vezes com tampão e adicionar 100 µl de reagente colorimétrico, Developing Solution, e incubar por 10 minutos, na ausência de luz. Em seguida a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µl Stop Solution, e na presença deste ácido a coloração azulada torna-se amarelada. Imediatamente após a as absorbâncias foram determinadas em 450 nm.

#### **4.6 Western Blot**

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas "overnight" a 4°C com tampão de bloqueio [PBS 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% Tween 20]. As membranas foram lavadas três vezes com PBS 0,1% Tween 20. Em seguida foram incubadas em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,1% Tween 20 contendo anticorpo primário rabbit polyclonal Anti-Phospho-CaMKII (Bioss), para detecção da expressão da proteinoquinase Ca/Calmodulina,. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado HRP específico (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e novamente lavadas. As membranas foram então reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual de instruções e exposto ao filme radiográfico (Kodak). Para confirmação da uniformidade das proteínas, as membranas receberam stripping e foram bloqueadas "overnight" a 4°C, e então foram incubadas por 2 horas com mouse monoclonal Alfa-Tubulina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), seguida de incubação por 1 hora com anticorpo secundário conjugado HRP específico (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA). O software Image J foi utilizado para mensuração das bandas por densidade ótica.

#### **4.7 Imunohistoquímica**

As amostras foram emblocadas em parafina e os cortes histológicos foram seriados e longitudinalmente, com 4 µm de espessura. Os cortes histológicos foram desparafinados e processados para a recuperação de antígeno com 10 mM de tampão de citrato, pH 6,0. Depois disso, os cortes foram imersas em 0,3 % de peróxido de hidrogênio em metanol e incubados com anticorpos primários. Os anticorpos usados eram específicos para: marcador específico para M1 (iNOS – Abcam) , na diluição de 1:50, por 2 horas; marcador específico para M2 (CD206 – Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:50, overnight; e HO-1 (Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:200, por 1 hora. Anticorpo secundário ligado a peroxidase (Peroxidase Kit Envision, Dako Corp., Carpinteria, CA) e tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) foram usados para detectar a ligação específica. As secções foram contrastadas com hematoxilina. Fotomicrografia Digital foram obtidos com um microscópio Zeiss Axioskop 2 plus equipado com AxioCam câmera digital e software de aplicação Axiovision (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha).

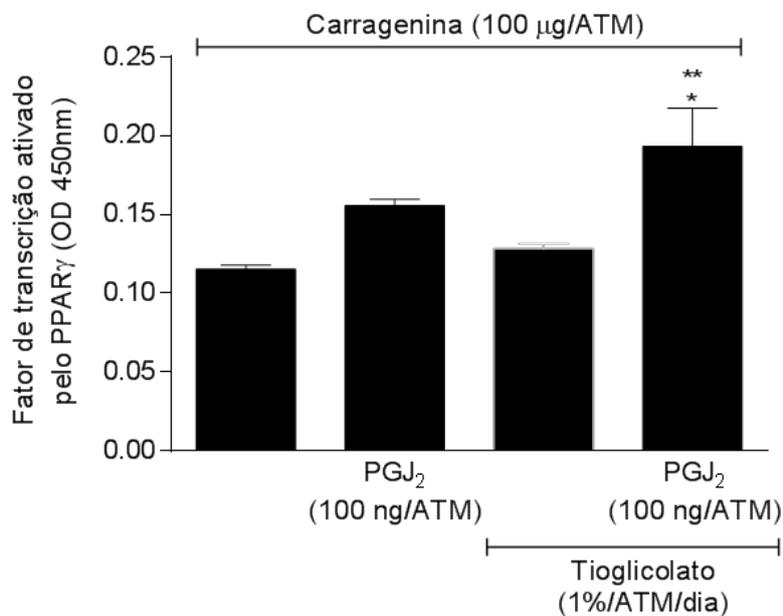
Fazendo uso de um microscópio optico (Zeiss Axioskop 2), dois examinadores interpretaram as reações imunohistoquímicas para macrófago tipo M1 (NOS-2), macrófagos tipo M2 (CD206) e HO-1. Os cortes histológicos foram avaliados qualitativamente e semi-quantitativamente. A marcação nuclear foi considerada positiva ao marcador (Figura 2). A avaliação da expressão dos marcadores descritos foi realizada de acordo com a porcentagem de células positivamente marcadas considerando a pontuação de 0 a 3 (0 = negativo; 1 = menos de 25 %; 2 = entre 25 a 50 %; 3 = mais de 50% das células positivamente marcadas).

#### **4.8 Análises dos dados**

Os dados foram avaliados utilizando-se análise de variância à um critério de avaliação (One-Way ANOVA). As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em 5%. O programa GraphPad Prism 6.0 foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos e confecção do gráficos.

## 5. Resultados

O recrutamento de macrófagos no tecido periarticular da ATM de ratos, mediado pelo Tioglicolato, aumentou significativamente a liberação do fator de transcrição ativado pelo PPAR- $\gamma$  no tecido periarticular de animais tratados com 15d-PGJ<sub>2</sub> (Figura 4). Estes dados reforçam a hipótese de que o PPAR- $\gamma$  no tecido periarticular da ATM de ratos está localizado nos macrófagos e quando ativados pela 15d-PGJ<sub>2</sub>, libera o fator de transcrição ativado pelo PPAR- $\gamma$  promovendo efeito analgésico mediado pela liberação de opióides endógenos (Pena-dos-Santos et al., 2009; Macedo et al., 2016).



**Figura 4: A 15d-PGJ<sub>2</sub> induz ativação de receptores PPAR- $\gamma$  em macrófagos na ATM de ratos.** O pré-tratamento com indutor de macrófagos, Tioglicolato (1%/ATM/dia) durante 3 dias, aumentou significativamente a liberação do fator de transcrição ativado pelo PPAR- $\gamma$  nos animais tratados com 15d-PGJ<sub>2</sub> (100 ng/ATM). O símbolo (\*) indica liberação do fator de transcrição ativado pelo PPAR- $\gamma$  significativamente maior quando comparado ao grupo Carragenina ( $P < 0,05$ : ANOVA; Teste de Tukey). O símbolo (\*\*) indica liberação do fator de transcrição ativado pelo PPAR- $\gamma$  significativamente maior quando comparado ao grupo Tioglicolato + Carragenina ( $P < 0,05$ : ANOVA; Teste de Tukey)

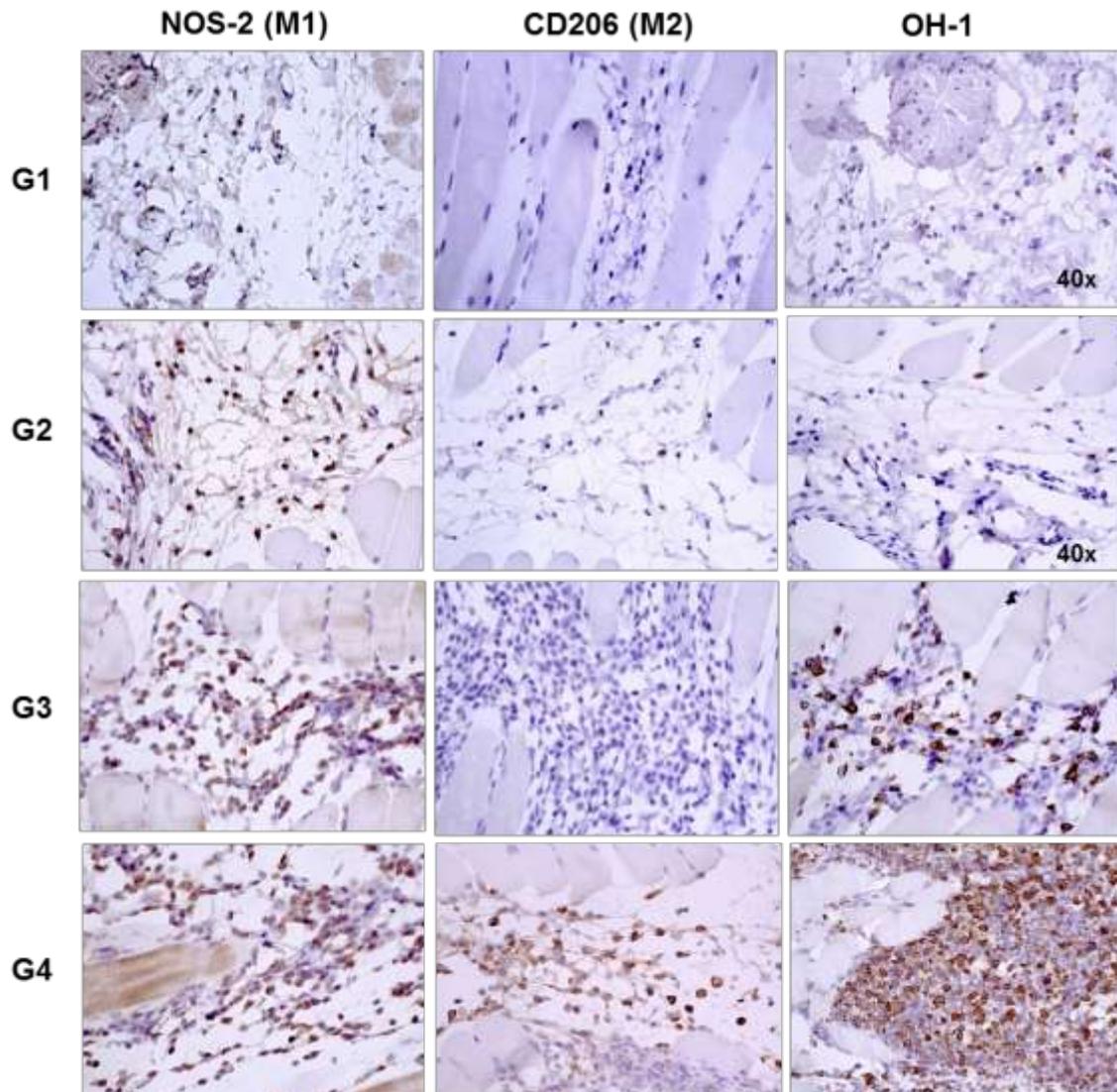
A literatura sugere que a ativação dos receptores PPAR $\gamma$  por agonistas induz uma polarização dos macrófagos do tipo M1 (macrófagos que aumentam a atividade microbicida e mediadores pronociceptivos) para macrófagos do tipo M2 (macrófagos que tem funções homeostáticas) em tecidos inflamados (Hasegawa-Moriyama et al., 2013) através de uma via hemoxigenase dependente, resultando em um aumento da expressão gênica e liberação de opióides endógenos. As análises de imunohistoquímica dos tecidos periarticulares da ATM de ratos confirmam esta hipótese. Para comprovar esta hipótese, foi demonstrado que esta mudança é dependente da via da HO-1 (Naito et al., 2014). Desta maneira, foi avaliado por imunohistoquímica se a 15d-PGJ<sub>2</sub> induz mudança fenotípica em macrófagos de M1 para M2, e se esta polarização de fenótipos é pela via da HO-1.

Em uma análise qualitativa os resultados demonstraram que o tratamento dos animais com o recrutador de macrófagos Tioglicolato aumenta a expressão de macrófagos M1 na ATM de ratos e o tratamento com a 15d-PGJ<sub>2</sub> aumenta a expressão de macrófagos M2 associado positivamente com o aumento da expressão da HO-1 (Tabela 1).

**Tabela 1. Resultados da Imunohistoquímica**

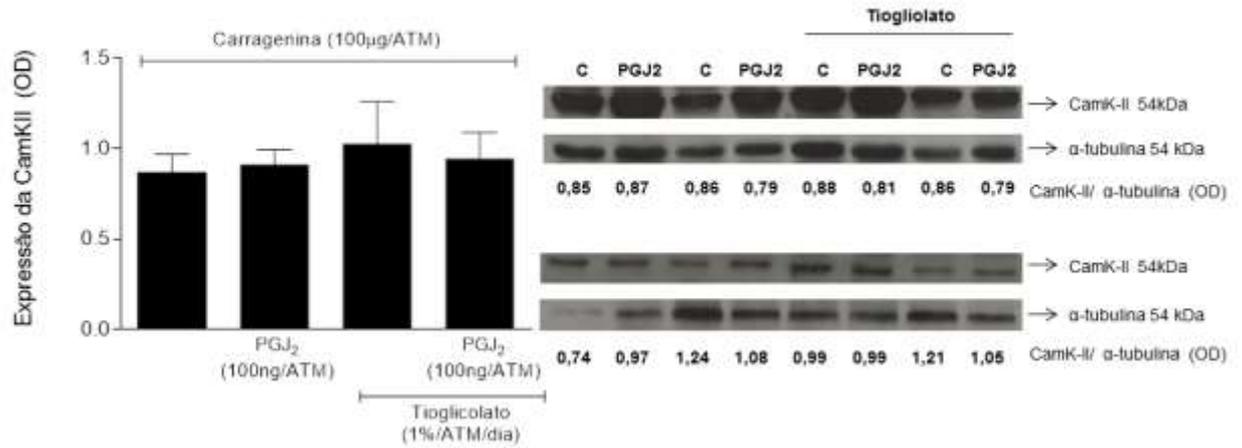
Marcador	Pontuação		
	NOS-2 (M1)	CD 206 (M2)	HO-1
G1	2 – 2	0 – 0	0 – 0
G2	2 – 2	1 – 1	0 – 1
G3	3 – 3	0 – 0	2 – 2
G4	3 – 3	3 – 1	3 – 3

**Figura 5. Avaliação do efeito da 15d-PGJ<sub>2</sub> na alteração fenotípica de macrófagos M1 para M2 através da via HO-1.** G1 = Carragenina; G2 = 15d-PGJ<sub>2</sub> + Carragenina; G3 = Tioglicolato + Carragenina; G4 = Tioglicolato + 15d-PGJ<sub>2</sub> + Carragenina.



Considerando que a analgesia induzida pela 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM está relacionada com a liberação de opióides endógenos que através dos seus receptores localizados nos neurônios aferentes primários ativam a via intracelular L-Argenina/NO/cGMP (Pena-dos-Santos et al., 2009; Macedo et al., 2016), foi avaliado a participação da proteinoquinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMKII) neste processo. Os resultados demonstraram que o efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> é independente da ativação da CaMKII (Figura 6).

**Figura 6: O efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> é independente da via de ativação CamK-II.** Não houve diferença estatística entre os grupos testados ( $P > 0,05$ : ANOVA, Teste de Tukey).



## 6. Discussão

Este estudo demonstrou que o tratamento periférico com a 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM de ratos induz uma alteração fenotípica de macrófagos residentes do tipo M1 (macrófagos que aumentam a atividade microbicida e mediadores pronociceptivos) para macrófagos do tipo M2 (macrófagos que tem funções homeostáticas) dependente da HO-1, resultando em um efeito antinociceptivo.

A 15d-PGJ<sub>2</sub> tem demonstrado um potente efeito analgésico e anti-inflamatório na ATM de ratos (Napimoga et al., 2008; Pena-dos-Santos et al., 2009; Quinteiro et al., 2012; Quinteiro et al., 2014; Macedo et al., 2016). Os estudos suportam a hipóteses de que o tratamento periférico com a 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM de ratos é capaz de inibir a sensibilização da neurônios nociceptivos primários e consequente propagação de estímulos nocivos, através da ativação neuronal da via L-arginina/NO/cGMP (Pena-dos-Santos et al., 2009) e inibição da liberação de mediadores da cascata inflamatória (Quinteiro et al., 2012; Quinteiro et al., 2014).

O efeito periférico terapêutico da 15d-PGJ<sub>2</sub> é mediado pela ativação dos receptores PPAR- $\gamma$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ - opióides (Pena-dos-Santos et al., 2009). Mais especificamente, foi demonstrado que a 15d-PGJ<sub>2</sub> não é ligante de receptores opióides, e sim ligante específico de receptores PPAR- $\gamma$  localizados em células inflamatórias (particularmente macrófagos residentes) no tecido periarticular da ATM (Macedo et al., 2016). Foi demonstrado que os receptores PPAR- $\gamma$  uma vez ativado pela 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM, induz a liberação de peptídeos opióides endógenos  $\beta$ -endorfina e dinorfina, os quais ativam os receptores  $\kappa$  e  $\delta$ - opióides nos neurônios nociceptivos primários resultando em um efeito antinociceptivo (Macedo et al., 2016).

Sabe-se que os receptores PPAR- $\gamma$  são fatores de transcrição ligantes dependentes que regulam a expressão do gene-alvo pela ligação a elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma situados em sítios reguladores de cada gene (Wahli et al, 1995), ou seja, quando ativado pela 15d-PGJ<sub>2</sub>, os receptores PPAR- $\gamma$  formam um heterodímero com o receptor retinóico X e esta interação promove a liberação de fatores de transcrição (Zingarelli e Cook, 2005). Os resultados deste estudo demonstraram que a injeção intra-articular da 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM de ratos promove o aumento do fator de transcrição ativado pelo PPAR- $\gamma$

(Figura 4), o que reforça os estudos de análise comportamental onde foi demonstrado que o efeito da 15d-PGJ<sub>2</sub> é dependente do PPAR-γ (Pena-dos-Santos et al., 2009; Quinteiro et al., 2012). Em acréscimo, os resultados demonstraram que o recrutamento de macrófagos no tecido periarticular aumentou significativamente a liberação do fator de transcrição ativado pelo PPAR-γ (Figura 4).

Os macrófagos são componentes chaves da resposta imunitária inata frente a estímulos nocivos, pois são capazes de orquestrar tanto indução do processo inflamatório quanto a resolução do mesmo. Os macrófagos podem ser divididos em dois grupos: os classicamente ativados (M1), e os alternativamente ativados (M2) (S. Gordon et al., 2003; Y. Naito et al. 2014). Os macrófagos tipo M1 são caracterizados por expressar elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores químicos, enquanto que, os macrófagos tipo M2 apresentam funções na resolução do processo inflamatório ao promover a proliferação celular, cicatrização de feridas e liberação de peptídeos opióides endógenos (Machelska et al., 2002, Y. Naito et al. 2014).

O PPAR<sub>γ</sub> é altamente expresso em macrófagos, e sua expressão induz rapidamente a diferenciação de monócitos em macrófagos (Chinetti et al., 1998). Tem sido demonstrado que na ausência da expressão do receptor PPAR<sub>γ</sub>, os macrófagos não são capazes de suprimir a produção de citocinas inflamatórias ou adquirir atividade metabólica oxidativa, fortemente associada com o fenótipo M2. A ativação de PPAR<sub>γ</sub> potencializa a polarização de monócitos circulantes para macrófagos do fenótipo M2 (Bouhlej MA et al., 2007; Hasegawa-Moriyama et al., 2014). Considerando que os macrófagos são a fonte de liberação de peptídeos opióides endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM de ratos (Macedo et al., 2016), foi proposto avaliar se o PPAR<sub>γ</sub> localizado em macrófagos quando ativado pela 15d-PGJ<sub>2</sub> resulta na alteração fenotípica de macrófagos M1 para M2.

As imagens obtidas através da imunohistoquímica demonstraram marcação positiva para os macrófagos e o tratamento com a 15d-PGJ<sub>2</sub> aumenta a expressão de macrófagos M2 (Figura 5). Estes dados suportam a hipótese de que o efeito antinociceptivo periférico da 15d-PGJ<sub>2</sub> é mediado pelo PPAR<sub>γ</sub> localizado em macrófagos residentes, o que resulta na liberação de peptídeos opióides endógenos,

que por sua vez, ativam os receptores  $\kappa$  e  $\delta$ - opióides nos neurônios nociceptivos primários (Napimoga et al., 2008; Pena-dos-Santos et al., 2009; Macedo et al., 2016).

A hemeoxigenase-1 (OH-1), identificada como um gene alvo dos receptores PPAR $\gamma$  em células vasculares (Kronke G et al., 2007), também está relacionada como um mediador chave na polarização dos macrófagos, do fenótipo M1 para M2 (Bouhlef et al., 2007; Weis N e Weigert A et al., 2009; von Knethen A et al., 2011). Os dados deste estudo demonstraram que o aumento da expressão de macrófagos M2 está diretamente relacionado com o aumento da expressão da OH-1 em animais tratados com a 15d-PGJ<sub>2</sub> (Figura 5). Estes dados corroboram a literatura onde é relaciona-se o aumento da expressão de macrófagos M2 com a resolução de modelos de indução de dor e inflamação (Bouhle et al., 2007; Odegaard et al., 2007; Godai et al., 2014; Zizzo G et al., 2015).

Pode-se concluir que os macrófagos tem apresentado ser o pivô central na patogênese do processo inflamatório, sendo o balanço entre seus fenótipos (M1 e M2) o ponto chave que define a resolução do processo inflamatório e o restabelecimento da homeostasia nos tecidos.

Outro aspecto a ser abordado é a sinalização dos receptores  $\kappa$  e  $\delta$ - opióides, localizados nos neurônios nociceptivos primários, para ativação da via intracelular neuronal L-Arginina/NO/cGMP, envolvida no efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM de ratos. Sabe-se que a ativação de receptores opióides pode induzir o aumento do NO em neurônios aferentes primários pela ativação da óxido-nítrico sintase (sNO) mediado pela proteinoquinase dependente de Ca<sup>+2</sup>/Calmodulina, que catalisa a formação de NO pela L-Arginina (Takata et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que a ativação de receptores opióides aumentaram os níveis de imunoreatividade da molécula de Ca<sup>+2</sup>/Calmodulina (CaMKII) fosforilada (Yoshizawa K et al., 2011). Sendo assim, foi testada a hipótese de que a CaMKII estaria intermediando a ativação da via L-Arginina/NO/cGMP pelo receptores  $\kappa$  e  $\delta$ - opióides nos neurônios nociceptivos primários na ATM. Contrariando a hipótese, os resultados demonstraram que não há diferença na expressão da CaMKII entre os grupos testados (Figura 6).

A literatura tem demonstrado que a ativação de receptores  $\kappa$ -opioides estimulam a ativação da Proteinoquinase dependente da ativação de mitógeno P38 (p38-MAPK), resultando no aumento dos níveis sNO, via Kinase acoplada a receptores ligados a proteína G tipo 3 (GRK3) (Bruchas et al., 2006; 2010). Considerando o tratamento periférico com a 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM resulta no aumento significativo da expressão da GRK3 (Macedo et al., 2016), é possível hipotetizar que a GRK3 e a p38-MPK sejam responsáveis pela ativação da via neuronal L-Arginina/NO/cGMP pelo receptores  $\kappa$  e  $\delta$ - opioides nos neurônios nociceptivos primários na ATM. No entanto, mais experimentos são necessários para elucidar este mecanismo. Há um interesse particular em neurônios aferentes primários do ponto de vista terapêutico, porque eles são a início dos impulsos nociceptivos. Os estímulos inflamatórios ou lesões de tecidos estimulam a liberação de uma cascata de citocinas características, que acabam por desencadear a liberação de mediadores finais responsáveis pela dor inflamatória (Verri et al 2006). Desta forma, se forem encontrados mecanismos de inibição da sensibilização e / ou excitação destes neurônios, eventos centrais subsequentes, tal como sensibilização e plasticidade, podem ser prevenidos (Stein et al., 2011). Sendo assim, a 15d-PGJ<sub>2</sub> por todo seu mecanismo aqui exposto, pode ser considerada uma promissora estratégia terapêutica para as condições inflamatórias da ATM.

## 7. Conclusão

1. O efeito antinociceptivo periférico da 15d-PGJ<sub>2</sub> na ATM é resultado da ativação dos receptores PPAR $\gamma$  localizados nos macrófagos residentes do tecido periarticular.
2. Os receptores PPAR $\gamma$  ativados pela 15d-PGJ<sub>2</sub> foram capazes de promover uma alteração fenotípica em macrófagos do tipo M1 para macrófagos M2.
3. A alteração fenotípica induzida pela ativação dos receptores PPAR $\gamma$  ativados pela 15d-PGJ<sub>2</sub> é mediado pela ativação da via da heme-oxigenase (OH-1).
4. Foi demonstrado que o efeito antinociceptivo da 15d-PGJ<sub>2</sub> é independente da ativação da proteinoquinase dependente da Ca<sup>2+</sup>/calmodulina para sinalização da via intracelular do NO/cGMP/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>.

## Referências

Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.* 1998 Jun-Jul;51(1-2):127-40.

Amantéa DV, Novaes AP, Campolongo GD, de Barros TP. A importância da avaliação postural no paciente com disfunção da articulação temporomandibular. *Acta Ortop Bras.* 2004; 12:155-9.

Amarante LH, Duarte ID: The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 2002, 454(1):19-23.

Ash MM. Paradigmatic shifts in occlusion and temporomandibular disorders. *J Oral Rehabil.* 2001 Jan;28(1):1-13.

Bocher V, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in the regulation of lipids and inflammation control. *J Soc Biol.* 2002;196(1):47-52.

Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;967:7-18.

Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007 Aug;6(2):137-43.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175-95.

Bruchas MR, Chavkin C. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. *Psychopharmacology (Berl).* 2010 Jun;210(2):137-47. doi: 10.1007/s00213-010-1806-y. Epub 2010 Apr 17.

Bruchas MR, Land BB, Chavkin C. The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain Res.* 2010 Feb 16;1314:44-55. doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.062. Epub 2009 Aug 28.

Bruchas MR, Macey TA, Lowe JD, Chavkin C. Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes. *J Biol Chem.* 2006 Jun 30;281(26):18081-9. Epub 2006 Apr 28.

Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehab.*2010; 37:391–410.

Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM . PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):48-52.

Chima RS, Hake PW, Piraino G, Mangeshkar P, Denenberg A, Zingarelli B (2008) Ciglitazone ameliorates lung inflammation by modulating the inhibitor kappaB protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway after hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 36: 2849–2857.

Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Pineda Torra, I., Delerive, P.,Majd, Z., Fruchart, J.C., Chapman, J., Najib, J., and Staels, B. (1998). Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* 273, 25573–25580.

Clemente-Napimoga JT, Moreira JA, Grillo R, de Melo NF, Fraceto LF, Napimoga MH. 15d-PGJ2-loaded in nanocapsules enhance the antinociceptive properties into rat temporomandibular hypernociception. *Life Sci.* 2012 Jun 14;90(23-24):944-9

Clemente-Napimoga JT, Pellegrini-da-Silva A, Ferreira VH, Napimoga MH, Parada CA, Tambeli CH (2009) Gonadal hormones decrease temporomandibular joint kappa-mediated antinociception through a down-regulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia. *Eur J Pharmacol* 1; 617: 41-47.

Cunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, Duarte HL, Souza GR, Verri WA Jr, et al. (2010) Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4442-4447.

Cunha TM, Souza GR, Domingues AC, Carreira EU, Lotufo CM, Funez MI, Verri WA Jr, Cunha FQ, Ferreira SH. Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits

inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K $\gamma$ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol Pain*. 2012 Feb 8;8:10. doi: 10.1186/1744-8069-8-10.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Patel NS, Serraino I, Di Paola R, et al. (2003) Reduction in the evolution of murine type II collagen-induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Br J Pharmacol* 138: 678–688.

Douglas, CR. Fisiologia das Posturas Mandibulares. In:\_\_. *Patofisiologia oral: fisiologia normal e patológica aplicada e odontologia e fonoaudiologia*. v.1. São Paulo: Pancast, 1998. p. 227-36.

Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*. 2000 Mar 17;448(2):121-38.

Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB (1991) The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: Stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 201: 121–122.

Garcia AR, Madeira MC, Paiva G, Olivieri KA. Joint vibration analysis in patients with articular inflammation. *Cranio*. 2000 Oct;18(4):272-9.

Gill N, Bijjem KR, Sharma PL. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effect of all-trans retinoic acid in carrageenan-induced paw edema in Wistar rats: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$  receptors. *Indian J Pharmacol*. 2013 May-Jun;45(3):278-82. doi: 10.4103/0253-7613.111944.

Godai K, Hasegawa-Moriyama M1, Kurimoto T, Saito T, Yamada T, Sato T, Kojima M, Kanmura Y. Peripheral administration of morphine attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization through COX-2-dependent pathway. *Mol Pain*. 2014 Jun 14;10:36. doi: 10.1186/1744-8069-10-36.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec;5(12):953-64.

Hasegawa-Moriyama M, Kurimoto Tae, Nakama M, Godai K, Kojima M, Kuwaki T, Kanmura Y (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist

rosiglitazone attenuates inflammatory pain through the induction of heme oxygenase-1 in macrophages. *Pain* 154: 1402-1412.

Hasegawa-Moriyama M, Ohnou T, Godai K, Kurimoto T, Nakama M, Kanmura Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Sep 14;426(1):76-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.039. Epub 2012 Aug 14.

Hyong A, Jadhav V, Lee S, Tong W, Rowe J, Zhang JH, Tang J. Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates inflammation after surgical brain injury in rodents. *Brain Res*. 2008 Jun 18;1215:218-24.

Ingawalé S, Goswami T. Temporomandibular joint: disorders, treatments, and biomechanics. *Ann Biomed Eng*. 2009;37(5):976-96.

Ingawalé S, Goswami T. Temporomandibular joint: disorders, treatments, and biomechanics. *Ann Biomed Eng*. 2009 May;37(5):976-96. doi: 10.1007/s10439-009-9659-4. Epub 2009 Feb 28.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):82-6.

Kaplan JM, Cook JA, Hake PW, O'Connor M, Burroughs TJ, Zingarelli B (2005) 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) (15D-PGJ(2)), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and 15-deoxy-D12,14-PGJ2 induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced mortality in endotoxic shock. *Shock* 24: 59–65.

Khasar SG, McCarter G, Levine JD. Epinephrine produces a adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol*. 1999; 81: 1104–1112.

Kieffer, B.L. & Gaveriaux-Ruff, C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol*. 66, 285–306 (2002).

Kopp S. Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*. 2001; 15: 9–28.

Krönke G, Kadl A, Ikonomu E, Blüml S, Fürnkranz A, Sarembock IJ, Bochkov VN, Exner M, Binder BR, Leitinger N. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun;27(6):1276-82. Epub 2007 Apr 5.

Leáñez S, Hervera A, Pol O (2009) Peripheral antinociceptive effects of mu- and delta opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. *Eur J Pharmacol* 602: 41–49.

Leeuw R. *Dor Orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento.* 2010; Quarta ed. São Paulo: Quintessence Editora LTDA.

Leeuw R, Eisenlohr-Moul T, Bertrand P. The association of smoking status with sleep disturbance, psychological functioning, and pain severity in patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain.* 2013 Winter;27(1):32-41. doi: 10.11607/jop.1040.

Macedo GC. *Avaliação dos mecanismos neuroquímicos envolvidos no efeito antinociceptivo da 15d-PGJ2 na articulação temporomandibular de ratos.* Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2016.

Machelska H, Mousa SA, Brack A, Schopohl JK, Rittner HL, Schafer M, Stein C. Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1. *J Neurosci.* 2002 Jul 1;22(13):5588-96.

Machelska H. *Neuropeptides.* 2007 Dec;41(6):355-63. Epub 2007 Jul 20. Review. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control.

Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000 May;46(3):573-85.

McTigue DM, Tripathi R, Wei P, Lash AT. The PPAR gamma agonist Pioglitazone improves anatomical and locomotor recovery after rodent spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2007 Jun;205(2):396-406.

Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts LJ 2nd (2011) Isoprostane generation and function. *Chem Rev* 111: 5973-5996.

Mirza RE, Fang MM, Novak ML, Urao N, Sui A, Ennis WJ, Koh TJ. Macrophage PPAR $\gamma$  and impaired wound healing in type 2 diabetes. *J Pathol*. 2015 Aug;236(4):433-44. doi: 10.1002/path.4548. Epub 2015 May 12.

Mousa SA, Shakibaei M, Sitte N, Schäfer M, Stein C. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. *Endocrinology*. 2004 Mar;145(3):1331-41. Epub 2003 Nov 20.

Murphy MK, MacBarb RF, Wong ME, Athanasiou KA.; Temporomandibular disorders: a review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013 Nov-Dec; 28(6):e393-414. doi: 10.11607/jomi.te20.

Naito Y, Takagi T, Higashimura Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Dec 15;564:83-8. doi: 10.1016/j.abb.2014.09.005. Epub 2014 Sep 18.

Napimoga MH, Souza GR, Cunha TM, Ferrari LF, Clemente-Napimoga JT, Parada CA, et al (2008) 15d-prostaglandin J2 inhibits inflammatory hypernociception: involvement of peripheral opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 313–321.

Napimoga MH, Vieira SM, Dal-Secco D, Freitas A, Souto FO, Mestriner FL, et al. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. *J Immunol* 180:609–617.

Nunes Junior PC, Maciel RL. Propriedades anatômicas e funcionais da ATM com aplicabilidade no tratamento fisioterapêutico. *Fisioter Bras*. 2005;6(5):381-387.

Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:275-97. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130138.

Oh JY, Giles N, Landar A, Darley-Usmar V. Accumulation of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defence induction. *Biochem J*. 2008 Apr 15;411(2):297-306. doi: 10.1042/bj20071189.

Okeson JP. Current terminology and diagnostic classification schemes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 83(1): 61-4.

Ozan F, Polat S, Kara I, Küçük D, Polat HB. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in a Turkish population. *J Contemp Dent Pract.* 2007 May 1;8(4):35-42.

Park SW, Yi JH, Miranpuri G, et al. Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320:1002–1012.

Pena-dos-Santos DR, Severino FP, Pereira SA, Rodrigues DB, Cunha FQ, Vieira SM, Napimoga MH, Clemente-Napimoga JT. Activation of peripheral kappa/delta opioid receptors mediates 15-deoxy-(Delta12,14)-prostaglandin J2 induced-antinociception in rat temporomandibular joint. *Neuroscience.* 2009 Nov 10;163(4):1211-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.052

Pereira MP, Hurtado O, Cárdenas A, et al. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through non completely overlapping mechanisms. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006; 26, 218–229.

Quinteiro MS, Napimoga MH, Mesquita KP, Clemente-Napimoga JT. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ2 on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. *Eur J Pain.* 2012 Sep;16(8):1106-15.

Quinteiro MS, Henrique Napimoga M, Gomes Macedo C, Furtado Freitas F, Balassini Abdalla H, Bonfante R, Trindade Clemente-Napimoga J. 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:58-65. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.002. Epub 2014 Jul 10.

Quinto, C.A. Classificação e tratamento das disfunções temporomandibulares: qual o papel do fonoaudiólogo no tratamento dessas disfunções? *Rev CEFAC* 2000; 2(2): 15-22.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 391: 79-82.

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol*. 1999 Nov;66(5):733-9.

Rodrigues LL, Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, de Arruda Veiga MC, Parada CA, Tambeli CH. Peripheral sympathetic component of the temporomandibular joint inflammatory pain in rats. *J Pain*. 2006 Dec; 7(12): 929-36.

Schäfer M, Carter L, Stein C (1994) Interleukin-1 $\beta$  and corticotropin-releasing-factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4219–4223.

Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 2005;114:100–9.

Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J (1997) Peroxisome proliferators activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 8: 159–166.

Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Nishioka K. (2004) A potential role of 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J Biol Chem* 279: 37939–37950.

Silveira AM, Feltrin PP, Zanetti RV, Mautoni MC. Prevalence of patients harboring temporomandibular disorders in an otorhinolaryngology department. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007 Jul-Aug;73(4):528-32.

Stein C, Machelska H (2011) Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. *Pharmacol Rev* 63: 860-881.

Stein C, Machelska H, Schäfer M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z Rheumatol*. 2001 Dec;60(6):416-24.

Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med*. 2003 Aug;9(8):1003-8.

Stein C. Neuro-immune interactions in pain. *Crit Care Med.* 1993 Sep;21(9 Suppl):S357-8.

Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell.* 1994 Apr 8;77(1):83-93.

Straus DS, Glass CK. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 2001;21:185–210

Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience.* 2005; 130: 685–696.

Surh YJ, Na HK, Park JM, Lee HN, Kim W, Yoon IS, Kim DD. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochem Pharmacol.* 2011 Nov 15;82(10):1335-51. doi: 10.1016/j.bcp.2011.07.100. Epub 2011 Aug 6.

Takata T, Kimura J, Tsuchiya Y, Naito Y, Watanabe Y (2011) Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide* 25: 145-152.

Tavares V, Hirata MH, Hirata RD. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jun;51(4):526-33.

Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J. Neurochem.* 2007; 101:41–46.

Vazquez-Delgado E, Schmidt JE, Carlson CR, DeLeeuw R, Okeson JP. Psychological and sleep quality differences between chronic daily headache and temporomandibular disorders patients. *Cephalalgia.* 2004; 24(6): 446-54.

Verri, Jr. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics.* 2006; 112: 116–138.

von Knethen A, Neb H, Morbitzer V, Schmidt MV, Kuhn AM, Kuchler L, Brüne B. PPAR $\gamma$  stabilizes HO-1 mRNA in monocytes/macrophages which affects IFN- $\beta$  expression. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 15;51(2):396-405. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.033. Epub 2011 Apr 22.

Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol*. 1995 May;2(5):261-6.

Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*. 2008 Sep 25;59(6):914-31. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.021.

Weis N, Weigert A, von Knethen A, Brüne B. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell*. 2009 Mar;20(5):1280-8. doi: 10.1091/mbc.E08-10-1005. Epub 2009 Jan 7.

Yoshizawa K, Narita M, Saeki M, Narita M, Isotani K, Horiuchi H, et al. (2011) Activation of extracellular signal-regulated kinase is critical for the discriminative stimulus effects induced by U-50,488H. *Synapse* 65: 1052-1061.

Yoshizawa K, Narita M, Saeki M, Narita M, Isotani K, Horiuchi H, Imai S, Kuzumaki N, Suzuki T. Activation of extracellular signal-regulated kinase is critical for the discriminative stimulus effects induced by U-50,488H. *Synapse*. 2011 Oct;65(10):1052-61. doi: 10.1002/syn.20937. Epub 2011 Apr 26.

Zhao Y, Patzer A, Gohlke P, et al. The intracerebral application of the PPAR $\gamma$ -ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain. *Eur. J. Neurosci*. 2005; 22, 278–282.

Zingarelli B, Cook JA (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 23: 393-399.

Zizzo G, Cohen PL. The PPAR- $\gamma$  antagonist GW9662 elicits differentiation of M2c-like cells and upregulation of the MerTK/Gas6 axis: a key role for PPAR- $\gamma$  in human macrophage polarization. *J Inflamm (Lond)*. 2015 May 3;12:36. doi: 10.1186/s12950-015-0081-4. eCollection 2015..

## ANEXO 1



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "AVALIAÇÃO DO MECANISMO ENVOLVIDO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO 15d-PGJ2 MEDIADO PELA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA - GAMA EM MACRÓFAGOS NA ATM DE RATOS" (protocolo nº 3414-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Juliana Clemente Trindade Napimoga / Henrique Ballassini Abdalla, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de julho de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Campinas, 07 de julho de 2014.

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

47º BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS  
CERTIFICATE

We certify that the work Antinociceptive effect of 15-deoxy- Delta 12,14 -prostaglandin J2 is mediated by the activation of proliferator-activated receptor- g on macrophage cells in the temporomandibular joint., authorship of Abdalla HB, Macedo CG, Napimoga MH, Bonfante R, da Rocha LM, Clemente-Napimoga JT, was presented as poster at the 47th Annual Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), held in Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil, from September 28 to October 01, 2015.



MARIA CHRISTINA W. DE AVELLAR  
PRESIDENT SBFTE



28/09-01/10/2015 Emerging challenges in drug discovery and therapy Águas de Lindóia SP - Brazil