

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

LÊNIO TOGNI

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE OSTEOARTRITE INDUZIDA PELA ANTERIORIZAÇÃO
CIRÚRGICA DO DISCO ARTICULAR EM RATOS**

Porto Alegre
2017

LÊNIO TOGNI

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE OSTEOARTRITE INDUZIDA PELA ANTERIORIZAÇÃO
CIRÚRGICA DO DISCO ARTICULAR EM RATOS**

Linha de pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica Aplicadas

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de CTBMF, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Martha Campos

Porto Alegre
2017

Ficha Catalográfica

T645c Togni, Lênio

Caracterização de um modelo de osteoartrite induzida pela anteriorização cirúrgica do disco articular em ratos / Lênio Togni . – 2017.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos.

1. Osteoartrite. 2. Articulação temporomandibular. 3. deslocamento anterior de disco articular. 4. inflamação. 5. rato. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

LENIO TOGNI

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE OSTEOARTRITE INDUZIDA PELA ANTERIORIZAÇÃO
CIRÚRGICA DO DISCO ARTICULAR EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de CTBMF, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Martha Campos (Presidente)

Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Prof. Dr. Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

Prof^a. Dr^a. Maria Ivete (Suplente)

Dedicatória

À minha família, pelo carinho e compreensão.

À minha esposa Maíra, pelo companheirismo e por tudo aquilo nos torna mais unidos.

Pai e Mãe, pelas pessoas disponíveis, incentivadoras e apoiadoras que sempre foram, e com certeza vocês são as pessoas mais responsáveis por esse momento.

Minhas irmãs e colegas, Grazielle e Lidiane, que além do incentivo souberam administrar minha ausência necessária.

E a todos que participaram e fizeram do empenho realidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Dra. Maria Martha Campos, foi um imenso prazer ter compartilhado esses dois anos com tua sabedoria e dedicação. Sem dúvida alguma, um exemplo de pesquisadora e professora, que soube me mostrar o caminho nos momentos difíceis e os novos horizontes da ciência. Seu empenho foi fundamental para a realização desse trabalho. Agradeço a confiança depositada em mim permitindo a realização do mesmo.

À Maira Cavallet de Abreu Togni, minha esposa, pela participação que tiveste neste trabalho, não só na etapa experimental e científica, mas também por ter sido compreensiva com relação às horas abdicadas do nosso tempo juntos para essa realização. Tua motivação e companheirismo foram fundamentais durante todas as etapas.

Ao Rodrigo Braccini, colega de laboratório, por toda ajuda, ensinamentos e participação ativa que tiveste durante todo o processo de construção desse trabalho. Além de colega, foste um grande amigo durante essa etapa, foi um prazer ter tido tua companhia.

À Janaina Silva, técnica do laboratório de patologia, que teve participação importantíssima para confecção dessas belas imagens histológicas. Os desafios que o processamento dos tecidos nos impuseram foi com certeza um aprendizado imenso para nós dois. Agradeço pelas horas compartilhadas.

Ao meu grande amigo e colega Rafael Chies Hartmann, que foi com certeza um grande encorajador do meu ingresso nessa instituição, e um grande incentivador para a realização de mais essa etapa.

Agradecimento aos colegas e integrantes do INTOX, que embora não tenha tido tempo e oportunidade de convívio com todos, tive a honra e o prazer de participar de um grupo onde todos se respeitam e ajudam uns aos outros. Uma grande lição corporativa.

Esse trabalho não se constrói só. É a realização de uma pessoa com o empenho de muitos. Um agradecimento especial a todos que, de alguma maneira, fizeram parte dessa realização.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, representado pelo seu Diretor Prof. Dr. Alexandre Bahlis pela excelente estrutura e qualidade de ensino proporcionada.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS em nome da Prof^a. Dra. Ana Maria Spohr, pelas oportunidades durante o curso de Mestrado.

À Secretaria de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Ao Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS, pela utilização das dependências para realização dos experimentos.

À Raquel M. Oliveira pela disponibilidade de tempo nos últimos instantes no processamento histológico.

Ao Adolpho Herbert Augustin, pela ajuda e participação no processamento das imagens das microtomografias.

Aos colegas de Mestrado e Doutorado de Odontologia pela amizade e apoio durante o curso.

À CAPES, pelo apoio financeiro disponibilizado através da bolsa no último ano do Mestrado, indispensável para o término deste curso.

RESUMO

Objetivo: Este trabalho teve por objetivo caracterizar o desenvolvimento de um modelo de osteoartrite, na articulação temporomandibular (TMJ-OA), posteriormente à cirurgia de anteriorização de disco articular em ratos, em comparação a um modelo já estabelecido de indução de osteoartrite (OA), pela infiltração intra-articular do agente inflamatório, CFA.

Métodos: Ratos Wistar machos (160-180 g) foram randomicamente divididos em dois grupos, denominados ADD (submetidos à anteriorização do disco articular) e falso-operados (acesso cirúrgico, sem a anteriorização do disco articular). Para fins de comparação, dois grupos experimentais adicionais receberam a infiltração intra-articular do adjuvante completo de Freund (CFA; 50 µl/sítio; 1:1 óleo/emulsão salina) ou, o mesmo volume de solução salina (NaCl 0,9%). Diferentes subgrupos experimentais (n=8 por grupo) foram eutanasiados em 15, 30 ou 60 dias depois dos procedimentos. A região correspondente à articulação temporomandibular (ATM) foi coletada para análises histológicas quanto à espessura da fibrocartilagem (hematoxilina-eosina), à presença de proteoglicanas (safranin-O e azul de toluidina), ao metabolismo ósseo sub-condral (fosfatase ácida tartarato-resistente; TRAP) e aos níveis de colágeno (tricroômico de Masson). A imunopositividade para a agreganase, ADAMTS5, foi avaliada nas diferentes camadas de fibrocartilagem. Imagens de microtomografia foram adquiridas para avaliação da morfologia e microestrutura (30 e 60 dias; N=4 por grupo). Os níveis inflamatórios das citocinas séricas, IL-1 β , IL-6 e TNF, foram avaliados como indicativos dos possíveis efeitos da indução de TMJ-AO, por ADD ou CFA.

Resultados: A análise da coloração por hematoxilina-eosina demonstrou um aumento na espessura da fibrocartilagem no grupo ADD, em 15 e 30 dias, principalmente no terço anterior do côndilo. No grupo CFA, um espessamento da fibrocartilagem foi encontrado no terço posterior, somente em 15 dias. Um aumento da presença de proteoglicanas foi encontrado

na fibrocartilagem do grupo ADD, de acordo com a análise qualitativa pelas colorações de safranin-O e de azul de toluidina. O grupo ADD também apresentou um aumento da imunopositividade para ADAMTS5 nas células da fibrocartilagem, em 15 e 30 dias, enquanto que a expressão dessa agreganase, no grupo CFA, apresentou-se discretamente aumentada em 15 dias. A avaliação histológica do osso subcondral não revelou nenhuma diferença em relação ao conteúdo de colágeno ou, ao número de osteoclastos ativos, nos grupos ADD ou CFA, como indicado pelas colorações de tricrômico de Masson e TRAP. Contudo, a análise microtomográfica demonstrou mudanças marcantes na morfologia e na estrutura óssea dos côndilos do grupo ADD, com formação de osteófitos em 30 dias e, achatamento da superfície articular em 60 dias. O terço anterior do côndilo do grupo ADD também apresentou um aumento na separação trabecular e na superfície óssea, associada com uma redução da espessura trabecular e do volume ósseo. Os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF) foram indetectáveis em todos os grupos experimentais.

Conclusão: O modelo cirúrgico ADD em ratos levou a alterações crônicas compatíveis com OA, com formação de osteófitos, seguida por achatamento da superfície condilar e alterações trabeculares. Este modelo experimental pode representar uma nova estratégia para investigar os mecanismos relacionados à TMJ-OA, permitindo a identificação de novas terapias para esta condição.

DESCRITORES¹

Articulação temporomandibular (TMJ), osteoartrite (OA), cartilagem articular, inflamação.

¹DeCS- Descritores em Ciências da Saúde, disponível em <http://decs.bvs.br>

ABSTRACT

Objective: This study aimed to characterize the development of temporomandibular osteoarthritis (TMJ-OA) following the surgical anterior displacement of the articular disc (ADD) in rats, in comparison to the well-established model of OA induced by the intra-articular injection of the inflammatory agent CFA.

Methods: Male Wistar rats (160-180 g) were randomly divided into two surgical groups, namely ADD (submitted to anterior disc displacement) and sham-operated (surgical access, without ADD). For purposes of comparison, two additional experimental groups received an intra-articular infiltration of complete Freund's adjuvant (CFA; 50 μ l/site; 1:1 oil/saline emulsion), or the same volume of saline solution (0.9% NaCl). Different experimental subgroups (N=8 per group) were euthanized on 15, 30 or 60 days after procedures. The region corresponding to the left TMJ was collected for histological analysis of fibrocartilage thickness (hematoxylin-eosin staining), presence of proteoglycans (safranin-O and toluidine blue), subchondral bone metabolism (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) and collagen levels (Masson's trichrome). The immunopositivity for the aggrecanase ADAMTS5 was examined in the fibrocartilage layers. Micro-CT images were acquired for morphological and microstructural evaluation (30 and 60 days; N=4 per group). The levels of inflammatory serum proteins (IL-1 β , IL-6 and TNF) were assessed to evaluate the possible systemic outcomes of TMJ-OA induced by ADD or CFA.

Results: The analysis of hematoxylin-eosin-stained sections revealed an increment of fibrocartilage thickness in the ADD group, on 15 and 30 days, mainly in the anterior third of the condyle. In the CFA group, a fibrocartilage thickening was seen in the posterior third, only at 15 days. Increased proteoglycan contents were present in the fibrocartilage of the ADD group, according to the qualitative analysis by safranin-O and toluidine blue staining. The ADD

group also displayed an augmented immunopositivity for ADAMTS5 in the fibrocartilage cells, on 15 and 30 days, whereas the expression of this aggrecanase was subtly increased in the CFA group at 15 days. The histological evaluation of the subchondral bone did not reveal any evident difference in the collagen contents, or in the number of activated osteoclasts, in the ADD or CFA groups, as indicated by Masson's trichrome and TRAP staining. However, the micro-CT analysis showed marked morphological and structural changes in condyles of the ADD group, with osteophyte formation on 30 days, and a flattening of condylar surface on 60 days. The anterior condyle third of the ADD group also presented an increment of trabecular separation and bone surface, associated to a reduction of trabecular thickness and bone volume. The serum levels of the pro-inflammatory cytokines, namely IL-1 β , TNF or IL-6, were undetectable in all the experimental groups.

Conclusion: The surgical model of ADD in rats led to long-term OA-like alterations, with the formation of osteophytes, followed by flattening of the condyle surface and trabecular derangements. This experimental model might represent a reliable strategy to investigate TMJ-OA-related mechanisms, allowing the identification of novel therapies for this condition.

DESCRIPTORS²

Temporomandibular joint (TMJ), osteoarthritis (OA), articular cartilage, inflammation.

²MeSH- Medical Subject Headings, available at: www.nlm.nih.gov/mesh

LISTA DE ABREVIATURAS

Osteoartrite – OA

Articulação temporomandibular – ATM ou TMJ

Disfunção temporomandibular – DTM ou TMD

Osteoartrite em articulação temporomandibular - TMJ-OA

Anteriorização de disco articular – ADD

Desarranjo interno articular – DIA

Adjuvante completo de Freund - CFA

Hematoxilina & Eosina - H&E

Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato – TRAP

ADAM metalopeptidase com trombospondina tipo 1 domínio 5 – ADAMTS5

Interleucina 1 β - IL-1 β

Interleucina 6 – IL-6

Fator de necrose tumoral - TNF

Microtomografia – Micro-CT

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
<i>Disfunção temporomandibular</i>	15
<i>Osteoartrite na ATM</i>	18
<i>Modelos experimentais para disfunção temporomandibular</i>	23
OBJETIVOS	27
<i>Objetivo geral</i>	27
<i>Objetivos específicos</i>	27
CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	31
<i>ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS</i>	38
<i>ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais/PUCRS</i>	39
<i>ANEXO C- Comprovante de submissão do manuscrito ao Periódico O&C</i>	40

INTRODUÇÃO

Disfunção temporomandibular

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial e bilateral, que desempenha um papel muito importante, guiando a movimentação do osso mandibular, bem como, absorvendo e distribuindo a carga exercida durante tarefas simples como mastigar, engolir e falar (1).

Com relação à anatomia da ATM, ela é composta pela fossa articular, um processo do osso temporal; pelo côndilo, um processo do osso mandibular; pelo disco articular, estrutura fibrosa que tem a função de absorver e distribuir e lubrificar a articulação e, pela cápsula articular, que além de estabilizar a articulação através de seus ligamentos, promove a formação do líquido sinovial a partir da camada íntima. O líquido sinovial, também conhecido como sinóvia, é o lubrificante fundamental para que os movimentos básicos realizados pela ATM, como a rotação e translação, possam ocorrer facilmente, diminuindo atrito e distribuindo a pressão por todo o compartimento articular (2). Alterações na morfologia e na dinâmica destas estruturas da ATM são fatores predisponentes para o desenvolvimento de patologias articulares dependendo da sua capacidade adaptativa.

A disfunção temporomandibular (DTM) representa uma condição patológica degenerativa musculoesquelética, associada à alteração de forma e função, sendo manifestada através de dores e ruídos articulares, limitações e desvios de movimento e dor orofacial. Seu conceito vem sofrendo algumas alterações ao longo dos últimos anos, podendo ser dividida em dois grandes grupos: DTM miopática e DTM artropática. Estas alterações podem ser encontradas isoladamente, mas são predominantemente mistas (3). Estima-se que 25%

da população tenham apresentado, em algum momento, os sintomas de DTM; porém, apenas uma pequena parcela desta população procura tratamento para esta doença (4).

Aproximadamente 66% dos pacientes com sintomas de DTM apresentam alguma alteração de forma e função intra-articular observadas em ressonância nuclear magnética (5). Este grupo de alterações patológicas é definido como “desarranjos internos articulares” (DIA). Desarranjo interno é um termo ortopédico que designa uma falha mecânica localizada, interferindo na fluidez do movimento articular. Para a ATM, esse termo é utilizado quando existe uma relação de anormalidade entre as estruturas internas da articulação, ou seja, o disco articular encontra-se mal relacionado com as outras estruturas: o côndilo e a eminência articular (*The Glossary of Prosthodontic Terms*). Dessa forma pode-se subclassificar estes DIA em: irregularidades de superfície; condições anquilóticas (aderências, adesões, anquilose óssea); desarranjos de disco (anteriorização de disco articular com e sem redução); desarranjos disco-côndilo (subluxações e luxações) e corpos estranhos (6).

A etiopatogenia das DTMs tem sido o foco de muitas investigações, assim como, as alterações presentes nas articulações com DIA. O impacto a respeito desses achados é de interesse para as abordagens clínicas que visam o tratamento estrutural da ATM, diferentemente de outra corrente de abordagem clínica que tem como alvo principal a dor do paciente (7).

A evolução natural da doença ainda é pouco conhecida; tem sido sugerido que as forças anormais sobre a ATM em pacientes com DIA podem estar associadas ao aparecimento de processos degenerativos intra-articulares, como a osteoartrite (OA) (1, 5, 8). Este dado está associado ao achado frequente de alterações morfológicas no côndilo mandibular em pacientes que sofrem de DTM e que apresentam disco articular anteriorizado, um tipo de DIA. Em contrapartida, alterações ósseas leves também são observadas em pacientes com

articulações definidas como “normais” (5, 9). Esse processo faz parte do equilíbrio entre adaptação e remodelação; porém, quando a capacidade de adaptação dos tecidos articulares é excedida, ocorre o estabelecimento de um processo degenerativo, denominado de OA (9, 10). Embora não esteja comprovado, de acordo com os achados da literatura, há indícios fortes de que a OA seja uma evolução de uma articulação com DIA, não o contrário (1). Outra teoria sobre a evolução da DTM seria de que o DIA e a OA ocorrem em conjunto, como consequência de sobrecarga articular.

Outra alteração ainda não bem esclarecida é a relação entre a anteriorização do disco articular e o retroposicionamento do côndilo mandibular dentro do espaço articular: qual deles seria a causa ou o efeito? Em modelos animais em coelhos, já foi demonstrado que a aplicação de força no sentido de retroposicionamento mandibular promove anteriorização de disco articular (11, 12). Por outro lado, a indução cirúrgica de anteriorização de disco articular em coelhos também pode resultar em retroposicionamento do côndilo mandibular (13). Clinicamente, já foi demonstrado que pacientes que apresentam DIA apresentam, cefalometricamente, maxila e mandíbula com comprimento menor do que a normal, em comparação para pacientes assintomáticos (14, 15). Esse achado corrobora com os resultados já observados em animais; entretanto, ainda não é possível afirmar o que ocorre primeiramente, se a anteriorização do disco articular, se o retroposicionamento do côndilo mandibular ou, se estas alterações ocorrem simultaneamente. O entendimento desta relação é fundamental para compreender se alguns indivíduos apresentam pré-disposição à anteriorização de disco articular, como por exemplo, pacientes classe II de Angle ou, se a aquisição de alguns hábitos funcionais pode induzir o retroposicionamento do côndilo mandibular e, conseqüentemente, ocasionar a anteriorização do disco articular.

Osteoartrite na ATM

Osteoartrose ou, atrite degenerativa, é classicamente definida como uma doença não inflamatória de articulações móveis, atingindo principalmente a cartilagem articular, produzindo sintomas em uma única articulação. A doença é considerada como resultado de um padrão de danos tempo-dependente, ao invés de uma entidade única. O processo degenerativo é caracterizado pela degradação progressiva da cartilagem articular e tecidos moles, afinamento e remodelação de osso subcondral, formação de esporões marginais e formação de cistos subcondrais. A presença de dor não é um sintoma determinante que caracteriza a doença, visto que a osteoartrite é muito frequente em pacientes idosos de forma assintomática. Porém, esta se torna sintomática quando acompanhada de processo inflamatório secundário (3). Entretanto, a compreensão atual é que o processo inflamatório e as alterações degenerativas estão intimamente relacionados; logo, o termo osteoartrite (OA) é mais adequado para descrever esta doença (6). Ao longo das duas últimas décadas, o conceito sobre OA tem sofrido algumas mudanças, sendo atualmente definida como uma doença inflamatória de baixo grau, no qual a inflamação ocorre no início da doença como resultado da interação entre o sistema imune e fatores locais, como danos aos tecidos articulares e disfunções metabólicas (16, 17).

O foco dos trabalhos na literatura, nesta última década, tem sido desvendar os eventos inflamatórios intra-articulares, seus mediadores e agentes moduladores, que consequentemente acabam gerando a OA. Sua etiologia é multifatorial e complexa e, o seu desenvolvimento, é considerado um evento secundário à anteriorização de disco articular, trauma, sobrecarga funcional e anormalidades de desenvolvimento. Todavia, a patogênese e os fatores causais do colapso dos tecidos de revestimento articulares ainda permanecem pouco claros e são tema de controvérsia (18).

Todos os tecidos de revestimento da articulação desempenham papel importante para o equilíbrio que adapta a forma (contorno das superfícies articulares) à função (movimentos complexos de abertura e fechamento da mandíbula). Embora a cartilagem articular tenha sido descrita originalmente como um tecido inerte, devido à falta de vascularização, apresenta um sistema complexo de regulação enzimática que permite a sua remodelação. Quando há a perda do equilíbrio entre a capacidade de adaptação e a demanda funcional exigida, ou seja, o equilíbrio anabólico e catabólico, alguns mecanismos são ativados para prevenir ou reparar o dano. Quando a capacidade adaptativa excede a capacidade reacional do tecido temos como resultado a necrose celular. A capacidade de adaptação dos tecidos de revestimento da ATM é contínua, porém, é mais pronunciada durante o estágio de crescimento e, ao longo dos anos, a resposta dos tecidos à adaptação é menor, podendo mais facilmente exceder o limite adaptativo (3, 6).

O conceito de “órgão articular” ganhou mais força a partir do momento que se começou a compreender a interação entre tecidos que fazem parte do sistema articular da ATM. O líquido sinovial, produzido pela membrana sinovial que reveste a ATM, desempenha papel importante na nutrição, trocas metabólicas, fagocitose e, principalmente, lubrificação da fibrocartilagem, que é o tecido de revestimento da superfície do côndilo e da fossa articular. A fibrocartilagem, por sua vez, é suportada diretamente pelo tecido ósseo subcondral e ligamento capsular. A absorção das forças exercidas sobre a ATM está diretamente associada à propriocepção neuromuscular e ligamentos capsulares, que diminuem a força sobre a articulação. No entanto, a fibrocartilagem e o líquido sinovial contribuem para a absorção e dissipação da carga intra-articular. Quando a capacidade desse complexo sistema excede ou diminui, há possibilidade de causar dano às estruturas

superficiais da articulação. Nesse contexto, a capacidade de adaptar-se do “órgão articular” desempenha papel importante no equilíbrio entre saúde e doença dos tecidos (6).

Os trabalhos realizados em modelos animais de OA em ATM têm demonstrado forte correlação entre a sobrecarga articular e a degradação de matriz fibrocartilaginosa; muitos destes estudos foram realizados com dispositivos que alteram a oclusão de forma abrupta, assim como a mudança na posição do disco articular (19-22).

A cartilagem condilar da ATM é dividida a partir da camada mais superficial para a mais profunda em: camada fibrosa, proliferativa, pré-hipertrófica e hipertrófica. Uma das características de uma articulação com OA é a perda leve e progressiva da matriz extracelular, que é composta principalmente por colágeno tipo II (19, 23). A degradação de matriz extracelular é mediada por citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF), que induzem a síntese e ativação de metaloproteinases pelos condrócitos, e essas são responsáveis pela degradação da matriz extracelular na região articular.

As metaloproteinases são um grupo de enzimas proteolíticas que desempenham papel importante em vários processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, morfogênese, remodelação tecidual, crescimento celular, migração e apoptose (24). Em condições de normalidade tecidual elas participam de processos de defesa e reparo tecidual, já em condições patológicas inflamatórias, como osteoartrite, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e cânceres, as metaloproteinases participam ativamente de processos de destruição tecidual (25). Sua expressão é regulada por fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e hormônios (24). Dentre as metaloproteinases, dois subgrupos têm maior relevância para os processos destrutivos da cartilagem, as MMP (metaloproteinases da matriz) e as ADAMTS (desintegrina e metaloproteinases com resíduos de trombospondina)

(26). O influxo do íon zinco para o meio celular é extremamente importante para a transcrição de MMPs e ADAMTSs; posteriormente, estas são secretados para o meio extracelular de forma zimogênica e ativadas por outras proteases (24, 27). Uma vez ativadas, a atividade dessas proteases é regulada por TIMPS (inibidores tissulares de metaloproteinasas) em fluidos corporais e plasmáticos, e por inibidores endógenos como a α_2 macroglobulina (α_2 M) (24). As metaloproteinasas que apresentam maior relevância no processo de osteoartrite são: MMP3, MMP9, MMP13 e ADAMTS5 (6, 19, 22, 28). A agrecanase, ADAMTS5, é considerada uma das enzimas mais importantes nesse processo destrutivo, sendo que a deleção gênica do seu sítio catalítico em camundongos foi capaz de reduzir drasticamente a progressão da OA (29).

Citocinas e outros mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial também parecem desempenhar um papel importante na patogênese da OA produzindo enzimas de degradação, como a tripsina. Foi demonstrado em ATM de porcos submetidos a um protocolo de hiperfunção, através de um aparato de movimentação cíclica e com a injeção de hialuronidase e tripsina, como enzimas de degradação da matriz extracelular, que há um aumento significativo na expressão de IL-1 β , MMP1, MMP3 e MMP9, o que foi associado, funcionalmente, a um aumento significativo do coeficiente de fricção das superfícies articulares (30). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF estão presentes no fluido sinovial de pacientes com DTM, e estão relacionadas com o processo degenerativo na ATM (28). Níveis sistêmicos elevados dessas citocinas estão normalmente associados com doenças reumatológicas, mas também podem estar associados a processos destrutivos em ATM de humanos (31, 32).

A relação entre o tecido ósseo e a fibrocartilagem de revestimento também tem papel fundamental no desenvolvimento da OA, uma vez que as alterações à nível da cartilagem refletem-se no osso subjacente, o osso subcondral (33). Uma perda óssea e remodelação da

superfície condilar ocorre em função do estabelecimento da OA em modelos animais (34). Os achados em microtomografias sugerem a ocorrência de um afinamento de trabéculas, aumento de espaço intertrabecular, aumento da superfície trabecular e perda volume ósseo em cêndilos (19, 21, 35). Ademais, análises de histoquímicas demonstram que osteoclastos dessa região encontram-se ativados e em maior número (21, 33).

O processo inflamatório intra-articular, além de causar degradação da fibrocartilagem, com perda de capacidade lubrificante do líquido sinovial e aumento à fricção entre os tecidos, também tem o potencial de alterar estruturalmente o disco articular, aumentando a sua porosidade, diminuindo sua capacidade elástica e aumentando a degradação das fibras colágenas (36). Desta forma é possível sugerir que o processo inflamatório intra-articular tem potencial de alterar as propriedades das estruturas de revestimento articular e favorecer possivelmente o deslocamento do disco articular, causando DIA.

A presença de OA e DIA parecem ter uma relação conjunta. Independente do fator etiológico primário, essas duas alterações são frequentemente observadas em exames de ressonância magnética nuclear (RMN) em indivíduos que apresentam DTM. A presença de dor em ATM está altamente associada à presença de DIA diagnosticada por RMN (64,5%). Entretanto, a presença de DIA em pacientes sem sintomas pode variar entre 30 a 39%. Através desses dados pode-se imaginar que a presença de DIA pode ter um papel na produção da dor e na disfunção (DTM); porém, o DIA, isoladamente na ATM, não seria suficiente para causar dor. Da mesma forma, a presença de OA numa amostra de 388 pacientes com dor em ATM foi de 45,4%. Quando estas alterações, OA e DIA estão associadas, representam fator de risco à presença de dor em ATM (3.7:1). Contudo, ênfase é dada pelo autor de que esta associação não poder ser considerada como fator único e dominante ao desenvolvimento de dor em ATM (37).

Modelos Experimentais para Disfunção Temporomandibular

Muitos modelos, animais ou computadorizados, têm sido propostos para avaliar as disfunções articulares, uma vez que estudar algumas alterações moleculares e histológicas em humanos se torna impossível. O desenvolvimento de desarranjos internos articulares, a partir de modificações de relação entre as estruturas ósseas e o disco articular, tem sido o foco de tais estudos, com o objetivo de compreender as modificações que ocorrem aos níveis estrutural e molecular, assim como, o desenvolvimento de estratégias clínicas para o tratamento dessa disfunção. Embora o arranjo estrutural das articulações de modelos como ratos e coelhos tenha considerável semelhança, não se pode deixar de salientar que a cinética dos movimentos mastigatórios jamais será igual à humana.

Um estudo baseado em análise de elementos finitos que tentou avaliar a distribuição do estresse sobre as estruturas da eminência articular e disco articular, em um modelo de desarranjo interno articular que simulava alterações de posição do disco articular (anterior, posterior, medial e lateral), demonstrou estresse máximo aumentado de 6 a 12x sobre o disco articular e de 13 a 60x sobre a porção posterior da eminência articular. Nesse modelo, só não foi avaliado o estresse máximo exercido sobre o côndilo articular, que seria interessante para a compreensão da distribuição das forças dentro de uma ATM disfuncional (38).

A indução de inflamação em articulações através da infiltração de agentes flogísticos tem sido frequentemente utilizada em modelos para o estudo de DTM em ratos (34, 36, 39). Estes protocolos são empregados a fim de melhor compreender a sucessão de eventos e a expressão de mediadores químicos que influenciam a degradação das superfícies articulares, a fim de aumentar o entendimento sobre a etiofisiopatogenia da AO em ATM. Dentre os compostos indutores presentes na literatura, o CFA (adjuvante completo de Freund) tem sido o agente mais utilizado. O CFA é uma emulsão de óleo de parafina contendo micro-organismos

inativados por calor, muito utilizada desde os anos de 1950, em modelos experimentais para doenças autoimunes. Este composto atua como um imunopotencializador, estimulando a imunidade celular e liberando citocinas, sendo considerado o composto preferencial para este tipo de modelo de osteoartrite (40, 41). Na ATM, o CFA induz, desde alterações na fibrocartilagem de revestimento da superfície articular, até alterações nas propriedades biomecânicas do disco articular (36, 39).

Um modelo animal bastante utilizado para experimentos em ATM são coelhos. Devido ao tamanho do animal, a realização de procedimentos cirúrgicos envolvendo a ATM torna-se mais fácil. Entretanto, é um modelo de maior custo e de manejo mais complicado em relação, por exemplo, aos ratos. Seguindo os achados clínicos, onde parece haver relação entre OA e DIA, a mimetização da anteriorização de disco articular em modelos experimentais tem sido demonstrada através de procedimento cirúrgico, desinserindo o ligamento capsular e tracionando este em direção anterior através de sutura e elásticos. Este tipo de modelo tem sido utilizado com sucesso, demonstrando alterações degenerativas intra-articulares em coelhos (3, 12, 20, 42, 43).

Um trabalho recente avaliou anatomicamente a similaridade entre a ATM humana com a de ratos. Como resultado, observou-se que existem pequenas diferenças em relação ao ângulo das estruturas; no entanto, elas podem ser ditas como similares. A cabeça condilar possui um aspecto mais plano, e não apresenta eminência articular como a ATM humana, assim como o disco articular é mais fino e em menor proporção (44). Histologicamente, as superfícies de revestimento são bastante similares (45). O fato de serem roedores justifica essas diferenças; porém, quando o objetivo é avaliar alterações inflamatórias, o rato torna-se um modelo viável.

Modelos experimentais utilizando ratos, com a introdução de dispositivos que alteram a sua relação normal de oclusão, têm sido bastante utilizados. Na literatura, há demonstração de diversos modelos capazes de gerar algum grau de inflamação intra-articular e, conseqüentemente, a degeneração de superfície articular em diversos graus: mordida cruzada (22, 36); aumento de dimensão vertical (28); projeção ou retroposicionamento de mandíbula (13, 46, 47) e; remoção de disco articular (48).

Embora o rato seja o animal mais prático para a realização de experimentos devido ao tamanho, ao cuidado e ao tempo de crescimento, não houve até o momento o desenvolvimento de nenhum modelo propondo a realização de procedimento de anteriorização de disco articular, como o que já existe em coelhos (20). Um dos motivos está relacionado às dificuldades técnicas para realizar o procedimento cirúrgico de anteriorização do disco articular; no entanto, o desenvolvimento deste modelo seria de grande importância científica, uma vez que, seria mais fidedigno aos achados clínicos.

A indução de inflamação, através de infiltração ou por dispositivos de alterações oclusais abruptas - que são os modelos já existentes - não apresenta o deslocamento do disco articular. Como já descrito anteriormente, um dos principais achados clínicos em articulações com osteoartrite (OA) é a presença de desarranjos internos articulares (DIA), ou seja, alteração na posição funcional do disco, o que faz parte de todo o contexto fisiopatológico para o estabelecimento da doença.

A necessidade de modelos experimentais mais próximos da realidade clínica é parte fundamental para compreensão dos mecanismos envolvidos no processo da AO, ainda por serem descobertos e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de novos alvos farmacológicos (16). A infiltração de agentes químicos com esse propósito tem sido questionada atualmente, pois, apesar de ser um modelo de rápida progressão, causam uma inflamação intensa nos

tecidos articulares, não representativa da OA em humanos. Modelos de OA em joelho que envolvem procedimentos cirúrgicos ou sobrecarga mecânica tem sido valorizados pela proximidade com a doença em humanos (49, 50).

Com base no que foi descrito acima, o presente estudo teve por objetivo padronizar, em ratos, um modelo de osteoartrite associada com desarranjo interno articular, através da anteriorização cirúrgica do disco articular. Ademais, este estudo teve como meta, avaliar alterações morfológicas locais e alterações inflamatórias sistêmicas no modelo cirúrgico, em comparação com o modelo de injeção intra-articular de CFA.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo caracterizar, em ratos, um modelo de osteoartrite (OA) associada com desarranjo interno articular (DIA), através da anteriorização cirúrgica do disco articular da ATM, comparando as alterações degenerativas com aquelas observadas no modelo de indução por infiltração intra-articular de CFA na ATM.

Objetivos específicos

- a) Verificar histologicamente, por meio de técnicas histoquímicas, a resposta da fibrocartilagem de revestimento articular frente às alterações degenerativas propostas pelos 2 modelos de indução de OA.
- b) Determinar as diferenças na morfologia articular e na estrutura óssea trabecular entre os grupos experimentais, utilizando microtomografia computadorizada (micro-CT).
- c) Estimar a interferência da anteriorização do disco articular da ATM no estabelecimento do processo de OA.
- d) Avaliar a expressão sérica de marcadores inflamatórios relacionados ao processo de OA nos diferentes grupos, por meio de ELISA.
- e) Avaliar a expressão da agreganase, ADAMTS5, na fibrocartilagem dos diferentes grupos experimentais, através de imunohistoquímica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado no volume de publicações relacionadas à osteoartrite nos últimos anos, pode-se concluir que esta é uma área de grande interesse científico. A alta prevalência da doença, onde se estima que aproximadamente 37% da população americana, acima de 60 anos, sofra desse mal, é com certeza um fator estimulante para esse desenvolvimento. O colapso progressivo das estruturas de revestimento articular é a principal característica dessa patologia; conseqüentemente, tem-se a presença de dor, a disfunção articular e a formação de deformidades articulares. A ausência de tratamentos efetivos que modulem a progressão da doença, acaba tendo como consequência um grande número de pacientes que são tratados com a instalação de próteses articulares em estágios finais da doença, quando os fármacos existentes não conseguem mais prover qualidade de vida satisfatória aos pacientes.

Considerando-se as duas últimas décadas, muitas descobertas envolvendo os mecanismos da doença ocorreram, assim como, algumas mudanças de conceito relacionadas à etiopatogenia. Atualmente, esta patologia assume o status de doença inflamatória de baixo-grau; ou seja, uma doença crônica, onde a inflamação não está somente presente em quadros álgicos, mas tem papel fundamental em todos os processos relacionados à doença, quer seja na degeneração da cartilagem, ou nas alterações ósseas subjacentes. Em virtude dessas novas informações, todas as áreas médicas devem rever seus conceitos relacionados ao tratamento clínico. A osteoartrite é uma doença que atinge todas as articulações e, essa mudança não é diferente para a disfunção temporomandibular (DTM), um grupo de alterações onde se insere a osteoartrite dentro das alterações na ATM.

Tendo em vista que as articulações do corpo, embora tenham muitas semelhanças, não apresentem as mesmas características morfológicas e funcionais, existe uma necessidade

de modelos experimentais mais próximos à realidade clínica; sem dúvida as DTMs se inserem nesse contexto. Os desarranjos internos articulares (DIA), como descrito na literatura, estão intimamente relacionados com o surgimento da OA em ATM. Por se tratar de uma doença crônica e por vezes silenciosa, os pacientes, em sua maioria, são diagnosticados somente em estágios mais avançados, quando normalmente sofrem com alterações dolorosas. O entendimento acerca dos processos de estabelecimento e evolução da doença é fundamental para a realização de tratamentos mais eficientes. Nesse contexto, os modelos experimentais inserem-se como alternativas em virtude das limitações associadas aos estudos em humanos.

O modelo proposto neste trabalho em ratos segue uma tendência natural em pesquisa básica, onde animais de pequeno porte e com possibilidade de manipulação genética contribuem para a descoberta dos mecanismos bioquímicos envolvidos com a OA. O modelo de anteriorização de disco articular em coelhos segue em sentido contrário a essas exigências; a proposta desse trabalho tem fundamento prático e tem a possibilidade de contribuir para novas descobertas. Além disso, o presente estudo correlacionou os dados encontrados com o modelo de ADD em ratos, com aqueles observados no modelo clássico de indução de OA em ratos, induzido pela injeção intra-articular de CFA.

Os achados de micro-CT conseguiram expressar da melhor forma nossos objetivos em relação ao desenvolvimento da OA nesse modelo. As alterações ósseas não ocorreram de forma rápida, mas foram consequência de um processo crônico, no qual o deslocamento do disco articular interferiu de forma significativa no metabolismo da ATM, visto que em 60 dias surgiram as alterações mais importantes na estrutura óssea trabecular. O aumento da espessura da fibrocartilagem, principalmente na região anterior do côndilo, foi provavelmente uma reação inicial em consequência de um processo adaptativo e, a formação de osteófitos laterais, nas microtomografias em 30 dias, dão subsídio a esse achado, visto que ocorre uma

fase proliferativa na fibrocartilagem dessa região. A ausência da análise histológica para os 60 dias ocorreu em função do processo de descalcificação, que é lento em virtude da utilização de agentes quelantes, uma vez que produtos ácidos tendem a comprometer a integridade dos tecidos, principalmente para imunistoquímica. Provavelmente, fazendo uma correlação com os achados em micro-CT em 60 dias, teremos uma diminuição expressiva da espessura da fibrocartilagem nesse momento, associado a uma perda de proteoglicanas e um aumento de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo e a destruição de matriz extracelular na fibrocartilagem. Na maior parte das análises, os resultados para o modelo de CFA foram mais discretos, com uma tendência à resolução, ficando mais distante dos achados clínicos observados em pacientes com OA de ATM.

Pode-se concluir que o modelo proposto surge como uma alternativa ao estudo alterações patológicas na ATM, apresentando alterações semelhantes à OA, tendo como diferencial a associação do desenvolvimento da doença com a anteriorização do disco articular em ratos, possibilitando a investigação de mecanismos relacionados à etiopatogenia ou o desenvolvimento de novas terapias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

1. Murphy MK, MacBarb RF, Wong ME, Athanasiou KA. Temporomandibular disorders: a review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2013;28(6):e393-414.
2. Shaffer SM, Brismee JM, Sizer PS, Courtney CA. Temporomandibular disorders. Part 1: anatomy and examination/diagnosis. *The Journal of manual & manipulative therapy*. 2014;22(1):2-12.
3. Zarb GA, Carlsson GE. Temporomandibular disorders: osteoarthritis. *Journal of orofacial pain*. 1999;13(4):295-306.
4. Solberg WK, Woo MW, Houston JB. Prevalence of mandibular dysfunction in young adults. *Journal of the American Dental Association*. 1979;98(1):25-34.
5. Rao VM, Babaria A, Manoharan A, Mandel S, Gottehrer N, Wank H, et al. Altered condylar morphology associated with disc displacement in TMJ dysfunction: observations by MRI. *Magnetic resonance imaging*. 1990;8(3):231-5.
6. Stegenga B. Osteoarthritis of the temporomandibular joint organ and its relationship to disc displacement. *Journal of orofacial pain*. 2001;15(3):193-205.
7. Chantaracherd P, John MT, Hodges JS, Schiffman EL. Temporomandibular joint disorders' impact on pain, function, and disability. *Journal of dental research*. 2015;94(3 Suppl):79S-86S.
8. Kurita H, Ohtsuka A, Kobayashi H, Kurashina K. Resorption of the postero-superior corner of the lateral part of the mandibular condyle correlates with progressive TMJ internal derangement. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2003;32(4):363-7.

9. Bertram S, Rudisch A, Innerhofer K, Pumpel E, Grubwieser G, Emshoff R. Diagnosing TMJ internal derangement and osteoarthritis with magnetic resonance imaging. *Journal of the American Dental Association*. 2001;132(6):753-61.
10. de Bont LG, Boering G, Liem RS, Eulderink F, Westesson PL. Osteoarthritis and internal derangement of the temporomandibular joint: a light microscopic study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1986;44(8):634-43.
11. Desai S, Johnson DL, Howes RI, Rohrer MD. Changes in the rabbit temporomandibular joint associated with posterior displacement of the mandible. *The International journal of prosthodontics*. 1996;9(1):46-57.
12. Bryndahl F, Warfvinge G, Eriksson L, Isberg A. Cartilage changes link retrognathic mandibular growth to TMJ disc displacement in a rabbit model. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2011;40(6):621-7.
13. Bryndahl F, Eriksson L, Legrell PE, Isberg A. Bilateral TMJ disk displacement induces mandibular retrognathia. *Journal of dental research*. 2006;85(12):1118-23.
14. Gidakou IK, Tallents RH, Stein S, Kyrkanides S, Moss ME. Comparison of skeletal and dental morphology in asymptomatic volunteers and symptomatic patients with unilateral disk displacement with reduction. *The Angle orthodontist*. 2004;74(2):212-9.
15. Bosio JA, Burch JG, Tallents RH, Wade DB, Beck FM. Lateral cephalometric analysis of asymptomatic volunteers and symptomatic patients with and without bilateral temporomandibular joint disk displacement. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1998;114(3):248-55.

16. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(10):580-92.
17. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*. 2016;85:81-90.
18. Wang XD, Zhang JN, Gan YH, Zhou YH. Current Understanding of Pathogenesis and Treatment of TMJ Osteoarthritis. *Journal of dental research*. 2015;94(5):666-73.
19. Zhang HY, Liu YD, Yang HX, Zhang M, Liao LF, Wan XH, et al. Installing and thereafter removing an aberrant prosthesis elicited opposite remodelling responses in growing mouse temporomandibular joints. *Journal of oral rehabilitation*. 2015.
20. Li H, Cai X, Wang S, Yang C, Song H, Huang L. Disc positions and condylar changes induced by different stretching forces in the model for anterior disc displacement of temporomandibular joint. *The Journal of craniofacial surgery*. 2014;25(6):2112-6.
21. Yang T, Zhang J, Cao Y, Zhang M, Jing L, Jiao K, et al. Decreased bone marrow stromal cells activity involves in unilateral anterior crossbite-induced early subchondral bone loss of temporomandibular joints. *Archives of oral biology*. 2014;59(9):962-9.
22. Zhang M, Wang H, Zhang J, Zhang H, Yang H, Wan X, et al. Unilateral anterior crossbite induces aberrant mineral deposition in degenerative temporomandibular cartilage in rats. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2016;24(5):921-31.
23. Jiao K, Dai J, Wang MQ, Niu LN, Yu SB, Liu XD. Age- and sex-related changes of mandibular condylar cartilage and subchondral bone: a histomorphometric and micro-CT study in rats. *Archives of oral biology*. 2010;55(2):155-63.

24. Yamamoto K, Murphy G, Troeberg L. Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biol.* 2015;44-46:255-63.
25. Nissinen L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(8):2571-80.
26. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015;44-46:1-6.
27. Lee M, Won Y, Shin Y, Kim JH, Chun JS. Reciprocal activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α and the zinc-ZIP8-MTF1 axis amplifies catabolic signaling in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2016;24(1):134-45.
28. Figueroba SR, Desjardins MP, Ferreira LE, Berto LA, Valdrighi HC, Groppo FC. The influence of altered occlusion on pro-inflammatory cytokine levels in the TMJ synovial tissues of rats. *Archives of oral biology.* 2014;59(11):1164-71.
29. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005;434(7033):644-8.
30. Asakawa-Tanne Y, Su S, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T, Okamoto Y, et al. Effects of enzymatic degradation after loading in temporomandibular joint. *Journal of dental research.* 2015;94(2):337-43.
31. Cevidanes LH, Walker D, Schilling J, Sugai J, Giannobile W, Paniagua B, et al. 3D osteoarthritic changes in TMJ condylar morphology correlates with specific systemic and local biomarkers of disease. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2014;22(10):1657-67.

32. Bal A, Unlu E, Bahar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2007;26(2):211-5.
33. Jiao K, Niu LN, Wang MQ, Dai J, Yu SB, Liu XD, et al. Subchondral bone loss following orthodontically induced cartilage degradation in the mandibular condyles of rats. *Bone.* 2011;48(2):362-71.
34. Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Wada T, Arai Y, Matsumoto N, et al. In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint. *Oral Dis.* 2011;17(5):499-507.
35. Xu L, Guo H, Li C, Xu J, Fang W, Long X. A time-dependent degeneration manner of condyle in rat CFA-induced inflamed TMJ. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):556-67.
36. Wang XD, Cui SJ, Liu Y, Luo Q, Du RJ, Kou XX, et al. Deterioration of mechanical properties of discs in chronically inflamed TMJ. *Journal of dental research.* 2014;93(11):1170-6.
37. Emshoff R, Innerhofer K, Rudisch A, Bertram S. The biological concept of "internal derangement and osteoarthritis": a diagnostic approach in patients with temporomandibular joint pain? *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2002;93(1):39-44.
38. Liu Z, Qian Y, Zhang Y, Fan Y. Effects of several temporomandibular disorders on the stress distributions of temporomandibular joint: a finite element analysis. *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering.* 2015:1-7.
39. Wang XD, Kou XX, Mao JJ, Gan YH, Zhou YH. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. *Journal of dental research.* 2012;91(5):499-505.

40. do Nascimento GC, Leite-Panissi CR. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. *Physiology & behavior*. 2014;125:1-7.
41. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology*. 2001;70(6):849-60.
42. Gu Z, Zhou Y, Zhang Y, Zhao S, Liu J, Hu J. An animal model for inducing anterior disc displacement of the temporomandibular joint. *Journal of orofacial pain*. 2006;20(2):166-73.
43. Mills DK, Daniel JC, Herzog S, Scapino RP. An animal model for studying mechanisms in human temporomandibular joint disc derangement. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1994;52(12):1279-92.
44. Orset E, Chaffanjon P, Bettega G. Temporomandibular joint model: anatomic and radiologic comparison between rat and human. *Surgical and radiologic anatomy : SRA*. 2014;36(2):163-6.
45. Porto GG VB, Andrade ES, Silva-Junior VA. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2010;25(3):290-3.
46. Zhang J, Jiao K, Zhang M, Zhou T, Liu XD, Yu SB, et al. Occlusal effects on longitudinal bone alterations of the temporomandibular joint. *Journal of dental research*. 2013;92(3):253-9.
47. Hua X, Xiong H, Han G, Cheng X. The effects of gradually induced backward movement of the mandible by a Twin Inclined Plane Device in rats. *The Angle orthodontist*. 2012;82(5):839-45.
48. Tanaka E, Dalla-Bona DA, Iwabe T, Kawai N, Yamano E, van Eijden T, et al. The effect of removal of the disc on the friction in the temporomandibular joint. *Journal of oral and*

maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2006;64(8):1221-4.

49. Fang H, Beier F. Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(7):413-21.

50. Poole R, Blake S, Buschmann M, Goldring S, Lavery S, Lockwood S, et al. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2010;18 Suppl 3:S10-6.



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6748

Porto Alegre, 12 de agosto de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS LOCAIS E SISTÊMICOS E SUA CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES FUNCIONAIS, EM DOIS MODELOS ANIMAIS DE DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR" coordenado por MARIA MARTHA CAMPOS. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PUCRS

ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais- PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 54/2015 - CEUA

Porto Alegre, 28 de agosto de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

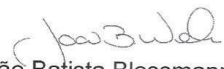
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00465, intitulado **“Avaliação dos marcadores inflamatórios locais e sistêmicos e sua correlação com alterações funcionais, em dois modelos animais de disfunção temporomandibular”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
164	Rattus norvegicus	10/2015 – 10/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Maria Martha Campos
INTOX
Nesta Universidade



Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

De: Osteoarthritis and Cartilage eesserver@eesmail.elsevier.com
Assunto: Submission Confirmation
Data: 19 de dezembro de 2016 21:21
Para: camposmartha@yahoo.com, maria.campos@puccs.br
Cc: leniotogni@hotmail.com, macavallet@hotmail.com, adolpho.augustin@puccs.br, rbraccinis@hotmail.com



Dear Dr. Campos:

Thank you for the submission of your manuscript Characterization of a rat model of temporomandibular joint osteoarthritis following the surgical anterior disc displacement to Osteoarthritis and Cartilage.

You have now successfully completed the on-line submission process. This acknowledgement and any queries are for the corresponding author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the corresponding author.

The manuscript is undergoing peer review. You will be notified by one of the Editors when the review is complete.

Kind regards,

Editorial Office
Osteoarthritis and Cartilage

