

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO

ANDERSON PEDROSO PROCKT

**AVALIAÇÃO DO USO DO HORMÔNIO
DO CRESCIMENTO RECOMBINANTE
HUMANO NA ATM DE COELHOS COM
OSTEOARTRITE INDUZIDA**

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Orientador

Porto Alegre
2012

ANDERSON PEDROSO PROCKT

AVALIAÇÃO DO USO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
RECOMBINANTE HUMANO NA ATM DE COELHOS COM
OSTEOARTRITE INDUZIDA

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Orientador: Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Porto Alegre
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P963a Prockt, Anderson Pedroso
Avaliação do uso do hormônio do crescimento recombinante humano na ATM de coelhos com osteoartrite induzida / Anderson Pedroso Prockt. – Porto Alegre, 2012.
96 f. : il.

Diss. (Mestrado em Odontologia) – Fac. de Odontologia, PUCRS.
Orientação: Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli.

1. Odontologia. 2. Articulação Temporomandibular. 3. Hormônio do Crescimento. 4. Osteoartrite. I. Pagnoncelli, Rogério Miranda.
II. Título.

CDD 617.643

**Ficha Catalográfica elaborada por
Vanessa Pinent
CRB 10/1297**

ANDERSON PEDROSO PROCKT

AVALIAÇÃO DO USO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
RECOMBINANTE HUMANO NA ATM DE COELHOS COM
OSTEOARTRITE INDUZIDA

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Aprovada em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto Hübler – PUCRS

Prof. Dr. Vladimir Dourado Poli - PUCRS

Prof. Dr. Vinicius Nery Viegas - PUCRS

Porto Alegre
2012

Dedico esta dissertação aos meus pais
que sempre exigiram um bom
desempenho estudantil, apoiando e
incentivando minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa de seu Reitor, Prof. Dr. Joaquim Clotet;

À Faculdade de Odontologia da PUCRS, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Marcos Túlio Mazzini Carvalho;

Ao Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli pela sua orientação, incentivo e oportunidades dadas;

Aos colegas Ricardo, Fernanda e Aline, que tanto colaboraram na realização deste trabalho;

Ao amigo e colega Andry e a namorada Renata que auxiliaram nas cirurgias dos animais;

À Enfermeira Marta, à médica veterinária Fabíola e a todos os profissionais da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas, pela orientação e auxílio no manejo do experimento animal;

Ao Jorge, à Flávia e a Prof^a Luise pelo auxílio na realização das lâminas histológicas na Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas;

Ao colega Vinícius Mundstock e à Prof^a Dr^a Helena pela colaboração na aquisição das imagens tomográficas e formatação da metodologia;

Ao Arno e ao Filipi do Instituto Idéia, que colaboraram nas aquisições das imagens das lâminas;

Ao Prof. Dr. Fabio Maito pela atenção e disponibilidade em ajudar na interpretação das imagens;

À todos os professores do Mestrado em odontologia da PUCRS com o qual tive o prazer de aprender;

Ao Coordenador da Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, o prof. Dr.
José Antônio Poli de Figueiredo;

À todos os profissionais que de forma direta ou indireta contribuíram para a
realização deste trabalho.

RESUMO

A osteoartrite é uma doença lentamente progressiva e degenerativa que atinge várias articulações do corpo humano, incluindo a ATM. A engenharia tecidual tem avançado no sentido de reduzir os defeitos osteocondrais e regenerar essa articulação. Foram utilizados no estudo 19 coelhos, dos quais 18 tiveram os discos articulares da ATM removidos, com o intuito de induzir osteoartrite. Os animais foram divididos em 3 grupos com 6 cobaias: grupo A, onde 5 coelhos realizaram 1 infiltração na articulação direita com rhGH (0,5UI/kg) e na esquerda com NaCl (0,9%) em 14 dias; grupo B, onde 5 coelhos realizaram 1 infiltração na articulação direita com rhGH (0,5UI/kg) e na esquerda com NaCl (0,9%) em 14 e 21 dias; grupo C, onde 5 coelhos realizaram 1 infiltração na articulação direita com rhGH (0,5UI/kg) e na esquerda com NaCl (0,9%) em 14, 21 e 28 dias. O sexto coelho de cada grupo não recebeu infiltrações e serviu como controle. O 19º coelho não foi operado e serviu como controle de ATM normal. Os animais foram avaliados por tomografia computadorizada cone beam e histologicamente. Os resultados demonstraram que, tomograficamente, as articulações tratadas com 3 infiltrações de NaCl 0,9% e o grupo controle obtiveram maiores índices de osteoartrite ($p < 0,05$). Na análise histológica, as articulações tratadas com rhGH apresentaram maior celularidade e espessura tecidual no grupo A, no grupo B, as articulações infiltradas com rhGH e NaCl (0,9%) apresentaram maior celularidade e espessura que no grupo controle. Quanto ao grau de severidade da osteoartrite, não houve diferença estatística.

Palavras-Chave: hormônio do crescimento, ATM, osteoartrite.

ABSTRACT

Osteoarthritis is a slowly progressive degenerative disease affecting several joints of the human body, including the TMJ. Tissue engineering has advanced to reduce osteochondral defects and to regenerate the TMJ. Nineteen rabbits were used in the present study. Eighteen of them had the articular discs of the TMJ removed in order to induce osteoarthritis. The animals were divided into three groups of six rabbits: group A - five rabbits treated with injections of rhGH (0.5 IU/kg) in the right joint and NaCl (0.9%) in the left joint in 14 days; group B - five rabbits received injections of rhGH (0.5 IU/kg) in the right joint and NaCl (0.9%) in the left joint in 14 and 21 days; and group C - five rabbits underwent injections of rhGH (0.5 IU/kg) in the right joint and NaCl (0.9%) in the left joint in 14, 21, and 28 days. The sixth rabbit of each group was the control and did not receive injections. The 19th rabbit was used as a normal TMJ control and did not undergo surgery. The animals were evaluated using cone beam computed tomography and histological examination. CT showed that the joints treated with three injections of 0.9% NaCl and the control group had higher rates of osteoarthritis ($p < 0.05$). Histological analysis revealed that the joints treated with rhGH had higher tissue cellularity and thickness in group A, whereas the joints treated with rhGH and NaCl (0.9%) had high tissue cellularity and thickness in group B than in the control group. There was no statistical difference in terms of degree of severity of osteoarthritis.

Keywords: growth hormone, TMJ, osteoarthritis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visão Lateral da ATM.....	20
Figura 2 – Visão Frontal da ATM.....	21
Figura 3 - Côndilo em repouso na fossa mandibular (MF). Anteriormente a ele a eminência articular (AE).....	22
Figura 4 – Disco articular com formato bicôncavo.....	23
Figura 5 – Cápsula articular.....	23
Figura 6 - Configuração celular do osso longo e do côndilo mandibular.....	24
Figura 7 - (A) Esquema da anatomia da ATM. (B) Divisão da superfície articular em zonas.....	25
Figura 8 – Mecanismo de desproteção articular sob sobrecarga.....	27
Figura 9 - Exemplos de diferentes expressões de osteoartrite: leve, moderado e severo.....	28
Figura 10 – Aplainamento e reabsorção condilar de uma paciente de 75 anos.....	29
Figura 11 - (A e B) Articulação experimental em 12 dias, com maior espessura de cartilagem articular e celularidade. (C e D) Articulação controle em 12 dias, com menor espessura de cartilagem articular e baixa celularidade.....	31
Figura 12 - (A e B) Articulação experimental em 24 dias, com maior espessura de cartilagem articular e celularidade. (C e D) Articulação controle em 24 dias, com menor espessura de cartilagem articular e baixa celularidade.....	31
Figura 13 - Côndilo tratado com colágeno e 0,1 µg de FGF-2.....	32
Figura 14 - Côndilo tratado com colágeno e 1 µg de FGF-2.....	33
Figura 15 - Côndilo tratado com colágeno.....	33
Figura 16 – Côndilo sem tratamento.....	33
Figura 17 – Glândula pituitária, onde é produzido o GH.....	35
Figura 18 - Graus de severidade osteoartítica da cartilagem patelar de coelhos. O G1 tratado com solução salina. O G2 tratado com AH. O G3 tratado com AH/GH.....	43
Figura 19 – Gaiola dos animais.....	46
Figura 20 – Entubação orotraqueal.....	49
Figura 21 - Controle dos sinais vitais do animal no procedimento cirúrgico.....	50
Figura 22 – Tricotomia pré-cirúrgica.....	52
Figura 23 – Exposição cirúrgica da ATM.....	52
Figura 24 - Remoção cirúrgica do disco articular.....	53
Figura 25 – Disco articular removido.....	53
Figura 26 - Sutura dos planos.....	54
Figura 27 – Sutura da pele.....	54
Figura 28 - Preparo das seringas de NaCl 0,9% e rhGH para infiltração.....	55

Figura 29 – Palpação e infiltração do hormônio na articulação direita.....	56
Figura 30 – Inserção das peças cirúrgicas em uma plataforma de isopor.....	59
Figura 31 - Plataforma posicionada para a aquisição de imagem.....	59
Figura 32 - Imagem tomográfica de um côndilo com aparência normal (Planmeca Romexis Viewer ®).....	60
Figura 33 - Imagem tomográfica de uma irregularidade leve (CS 3D Imaging Software®).....	60
Figura 34 - Imagem tomográfica de uma irregularidade severa (CS 3D Imaging Software®).....	61
Figura 35 – Imagem tomográfica sugestiva de osteófito (CS 3D Imaging Software®).....	61
Figura 36 – Imagem tomográfica sugestiva de alteração de contorno condil...	62
Figura 37 - Imagem tomográfica com água e sem água, respectivamente (CS 3D Imaging Software®).....	62
Figura 38 – Aparelho Planmeca Pro Max.....	63
Figura 39 – Côndilo normal (escore 0).....	65
Figura 40 - Irregularidades na superfície (escore 1).....	65
Figura 41 - Espessamento da cartilagem condilar (escore 2).....	66
Figura 42 - Adelgaçamento da cartilagem condilar (escore 3).....	66
Figura 43 - Fissura na fibrocartilagem do côndilo (escore 4).....	67
Figura 44 – Perda total da cartilagem articular (escore 5).....	67
Figura 45 - Maior espessura e celularidade no grupo rhGH (a) em relação aos grupos NaCl 0,9% (b) e controle (c).....	70
Figura 46 - Maior espessura e celularidade nos grupos rhGH (a) e NaCl 0,9% (b) em relação ao grupo controle (c).....	70
Figura 47- Gráfico TC ATM direita com água (CS 3D Imaging Software).....	72
Figura 48- Gráfico TC ATM direita sem água (CS 3D Imaging Software).....	72
Figura 49: Gráfico TC ATM direita com água (Planmeca Romexis Viewer).....	73
Figura 50: Gráfico TC ATM direita sem água (Planmeca Romexis Viewer).....	73
Figura 51: Gráfico TC ATM esquerda com água (CS 3D Imaging Software).....	74
Figura 52: Gráfico TC ATM esquerda sem água (CS 3D Imaging Software).....	74
Figura 53: Gráfico TC ATM esquerda com água (Planmeca Romexis Viewer)..	75
Figura 54: Gráfico TC ATM esquerda sem água (Planmeca Romexis Viewer)..	75
Figura 55: Gráfico dos escores da análise histológica na ATM direita.....	76
Figura 56: Gráfico dos escores da análise histológica na ATM esquerda.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cronograma de infiltrações.....	48
Tabela 2 - Grau tomográfico da severidade da osteoartrite.....	59
Tabela 3 - Grau histológico da severidade da osteoartrite.....	64
Tabela 4 - Tabela das comparações dos valores obtidos na Análise Tomográfica do Côndilo Mandibular entre e dentro dos grupos.....	69
Tabela 5 - Tabela das comparações dos valores obtidos no critério da cartilagem articular entre e dentro dos grupos.....	70
Tabela 6 - Peso pré-cirúrgico e no momento da eutanásia dos animais.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação temporomandibular
AH	Ácido hialurônico
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein - 2</i>
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor – 2</i>
GH	Hormônio do crescimento
HE	Hematoxilina / eosina
IGF-I	<i>Insuline-like growth factor</i>
kg	Kilograma
kV	Kilovoltagem
mA	Miliampere
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
MMP-1	<i>Matrix metaloproteinase – 1</i>
NaCl	Cloreto de sódio
OA	Osteoartrite
PUCRS	Pontifícia Universidade católica do Rio grande do Sul
rhGH	Hormônio do crescimento recombinante humano
rhBMP-2	Recombinant human <i>bone morphogenetic protein - 2</i>
r-pGH	Recombinant porcine growth hormone
TGF- β	Transforming growth factor – β
TC	Tomografia computadorizada
UI	Unidade internacional
μ g	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
4.1 ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR.....	20
4.2 OSTEOARTRITE.....	26
4.3 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO.....	35
4.3.1 Ação no tecido ósseo.....	37
4.3.2 Ação nas articulações.....	40
5 METODOLOGIA.....	44
5.1 RESPALDO ÉTICO.....	44
5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	45
5.3 AMOSTRA.....	46
5.4 GRUPOS DO EXPERIMENTO.....	47
5.5 PROTOCOLO ANESTÉSICO DOS ANIMAIS.....	49
5.6 PROTOCOLO CIRÚRGICO PARA A INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE.....	51
5.7 PROTOCOLO DE INFILTRAÇÕES.....	55
5.8 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA E BIÓPSIA.....	57
5.9 ANÁLISE TOMOGRÁFICA.....	58
5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	63
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68

6 RESULTADOS.....	69
7 DISCUSSÃO.....	77
8 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A.....	93
APÊNDICE B.....	94
ANEXO A.....	95
ANEXO B.....	96

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença lentamente progressiva e degenerativa que pode envolver muitas articulações, inclusive a articulação temporomandibular (MAN *et al.*, 2009). A causa desta patologia pode ser devido à defeitos genéticos nas moléculas da matriz, trauma direto nas superfícies articulares ou ligamentos associados (MOLLENHAUER, 2008).

Existem dois tipos de osteoartrite: primária e secundária. A osteoartrite primária possui etiologia desconhecida e aparece mais em pessoas idosas, sendo raramente encontrada na ATM (articulação temporomandibular). A osteoartrite secundária é mais comum, tendo sua origem em outros processos como trauma, desarranjos internos ou doenças inflamatórias (ISBERG, 2005).

Os sinais e sintomas característicos são dor, rigidez, estalido articular, crepitação articular e limitação de movimento (DE BONT *et al.*, 1997).

Os defeitos osteocondrais encontrados na osteoartrite permanecem sendo um problema de difícil resolução. Atualmente, algumas terapias estão sendo descritas para proteger as superfícies articulares do processo degenerativo, como o uso de TGF- β (MAN *et al.*, 2009), BMP-2 (SUZUKI *et al.*, 2002), FGF-2 (TAKAFUJI *et al.* 2007) e ácido hialurônico (AH) (XINMIN e JIAN, 2005).

Com o mesmo objetivo, alguns trabalhos demonstram os efeitos do hormônio do crescimento (GH) em tecido ósseo e cartilagem articular (LIVNE *et al.*, 1997 e BAIL *et al.*, 2003).

O hormônio do crescimento é uma pequena molécula protéica com 191 aminoácidos e peso molecular de 22.005, secretado na adeno-hipófise. Além do seu efeito geral sobre a estimulação do crescimento, o GH também exerce efeitos metabólicos específicos como aumento da velocidade de síntese protéica em todas as células do organismo; aumento da utilização de ácidos graxos para produção de energia; e redução da velocidade de utilização da glicose em todo organismo. Desta forma, o hormônio do crescimento aumenta as proteínas corporais, utiliza as reservas de gordura e preserva os carboidratos (GUYTON, 1997).

A estimulação da cartilagem e do osso são os efeitos mais evidentes do hormônio do crescimento. O GH aumenta a deposição de proteínas pelas células condrocíticas e osteogênicas que promovem o crescimento do osso (GUYTON, 1997).

Alguns trabalhos relataram a efetividade do GH na cicatrização de defeitos osteocondrais (BAIL *et al.*, 2003) e uma maior proliferação celular (CHRISMAN, 1975 e LIVNE *et al.*, 1997), demonstrando efeitos promissores do hormônio na regeneração óssea e cartilaginosa.

2 JUSTIFICATIVA

A osteoartrite não possui aparência uniforme nem patogênese única (MOLLENHAUER, 2008). Várias terapias são propostas para controlar os sinais e sintomas desta patologia. A farmacologia tem avançado muito tanto no controle da dor como na tentativa de estagnação e reversão dos defeitos osteocondrais proporcionados pela osteoartrite.

Estudos têm demonstrado ação do hormônio do crescimento na cicatrização de defeitos osteocondrais característicos de OA. Estes resultados vislumbram a possibilidade da redução de ruídos articulares e principalmente da dor associada à esta patologia.

Este estudo é importante para observarmos se a adição intra-articular de GH na ATM pode gerar uma neoformação tecidual que proporcione a redução destes sinais.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

- Avaliar se a infiltração intra-articular de hormônio do crescimento reduz os defeitos osteocondrais de uma osteoartrite de ATM induzida em coelhos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Comparar histologicamente o grau de severidade da osteoartrite das articulações temporomandibulares de coelhos, após a infiltração intra-articular de rhGH (hormônio do crescimento recombinante humano) na ATM direita e NaCl (cloreto de sódio) 0,9% na ATM esquerda em 21, 28 e 35 dias.

- Comparar tomograficamente o grau de severidade da osteoartrite das articulações temporomandibulares de coelhos, após a infiltração intra-articular de rhGH na ATM direita e NaCl 0,9% na ATM esquerda em 21, 28 e 35 dias.

- Comparar as articulações dos coelhos que sofrerão infiltração de rhGH e NaCl 0,9% com as articulações que não sofrerão infiltração, afim de observar a diferença no processo cicatricial.

- Observar se algum animal desenvolverá anquilose da articulação temporomandibular.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

Aproximadamente na 10ª semana de vida intra-uterina surgem os primeiros indícios dos constituintes da futura articulação temporomandibular (BHASKAR, 1989).

A ATM (Figuras 1 e 2) é uma articulação sinovial biaxial complexa que realiza movimentos de rotação e translação (FIGUN e GARINO, 1988). Esta diartrose é composta por côndilo mandibular, fossa mandibular, disco, cápsula e ligamentos acessórios (DUBRUL, 1991).

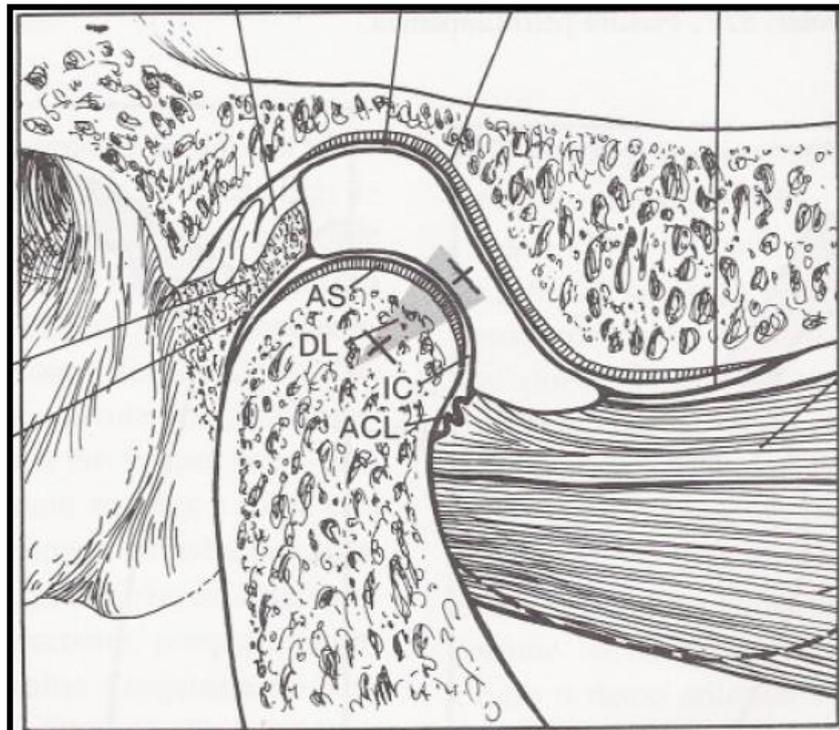


Figura 1: Visão lateral da ATM.

Fonte: Okeson (1992).

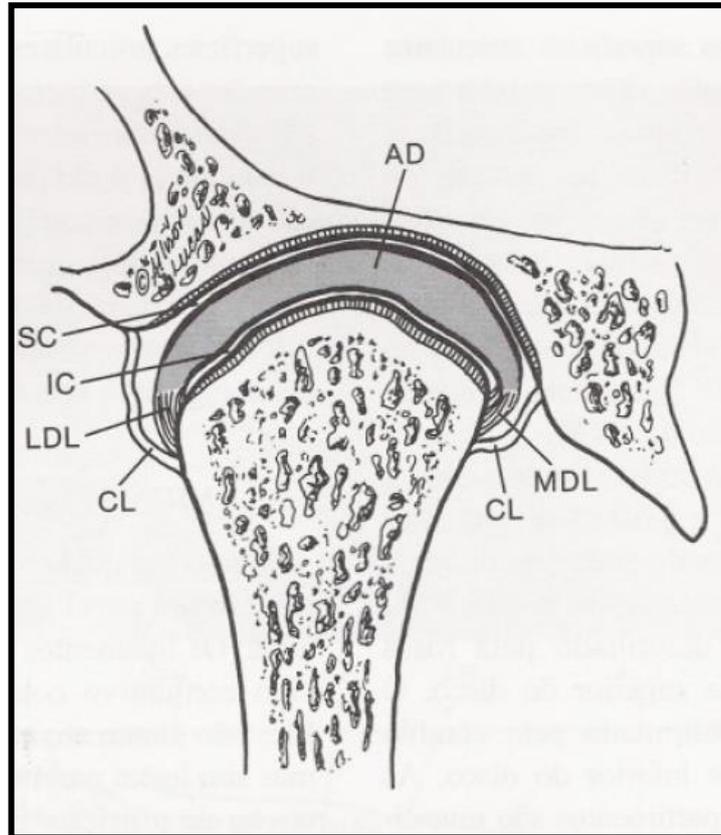


Figura 2: Visão Frontal da ATM.
Fonte: Okeson (1992).

O côndilo mandibular ao nascimento é arredondado e com uma espessa camada de cartilagem na superfície. Com a maturidade, ele adquire a forma ovalada coberta por fibrocartilagem (AVERY, 2001). Anatomicamente, o côndilo apresenta 2 polos: o medial e o lateral, que representam o longo eixo condilar, perpendicular ao plano do ramo. A distância entre os polos é de aproximadamente 15 a 20 mm, enquanto que a porção ântero-posterior mede de 8 a 10 mm (DUBRUL,1991).

A fossa mandibular é formada por uma eminência na porção anterior e por uma cavidade na parte inferior do osso temporal (Figura 3). A parede anterior forma um tubérculo para o deslizamento condilar em abertura bucal. Na parede posterior está a fissura petrotimpânica. Em repouso, o côndilo mandibular fica posicionado na fossa (AVERY, 2001).

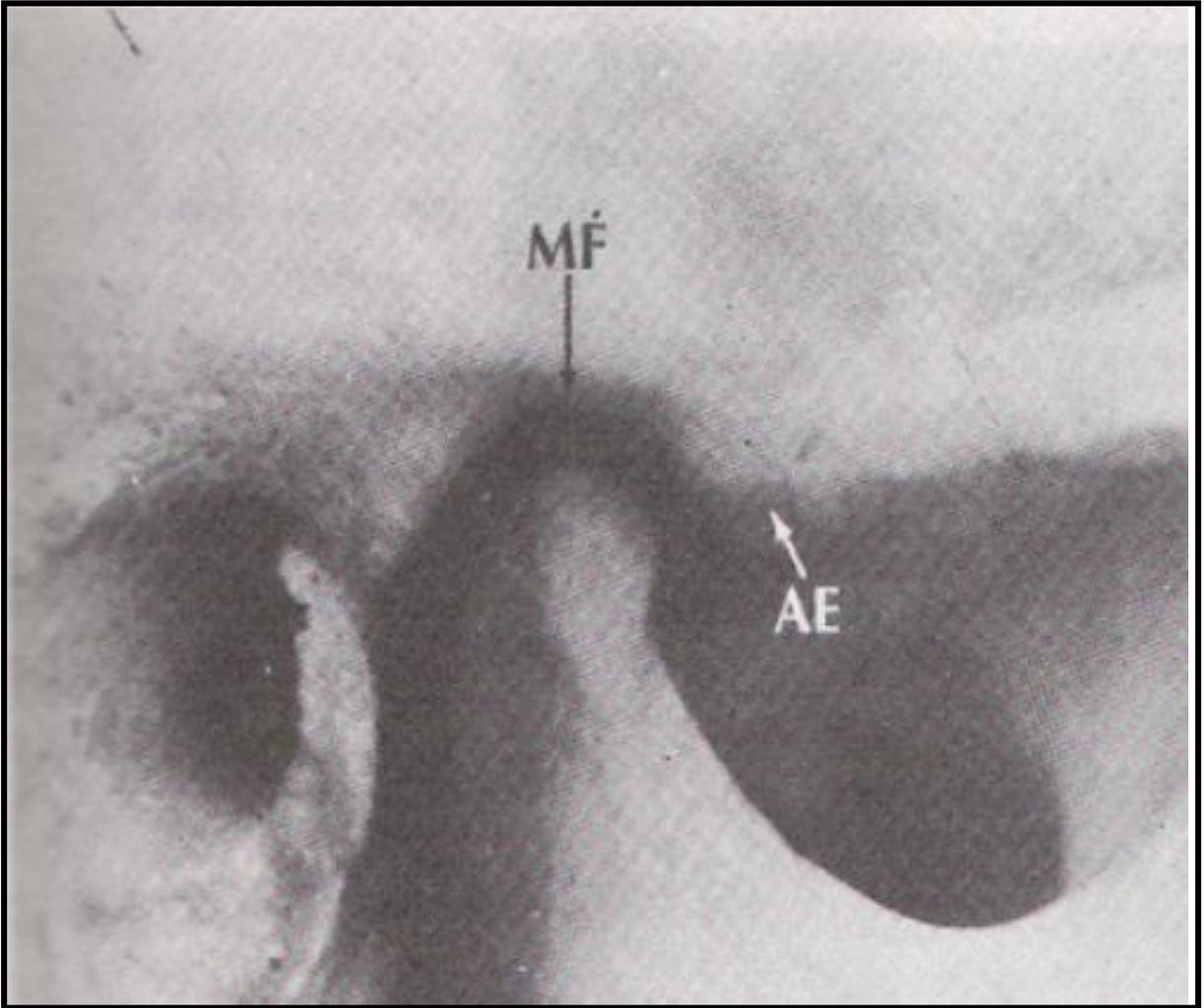


Figura 3: Côndilo em repouso na fossa mandibular (MF). Anteriormente a ele a eminência articular (AE).

Fonte: Okeson (1992).

O disco articular é um tecido fibroso bicôncavo que divide a ATM em compartimentos superior e inferior (BHASKAR, 1989). Este disco se insere na porção anterior e posterior da superfície interna da cápsula, médio-lateralmente está inserido nos polos condilares. Posteriormente também está frouxamente conectado ao tecido retrodiscal, e anteriormente, a algumas fibras do feixe superior do músculo pterigoideo lateral (DUBRUL, 1991). O disco articular cumpre papel amortecedor dos impactos dos movimentos mandibulares (Figura 4).

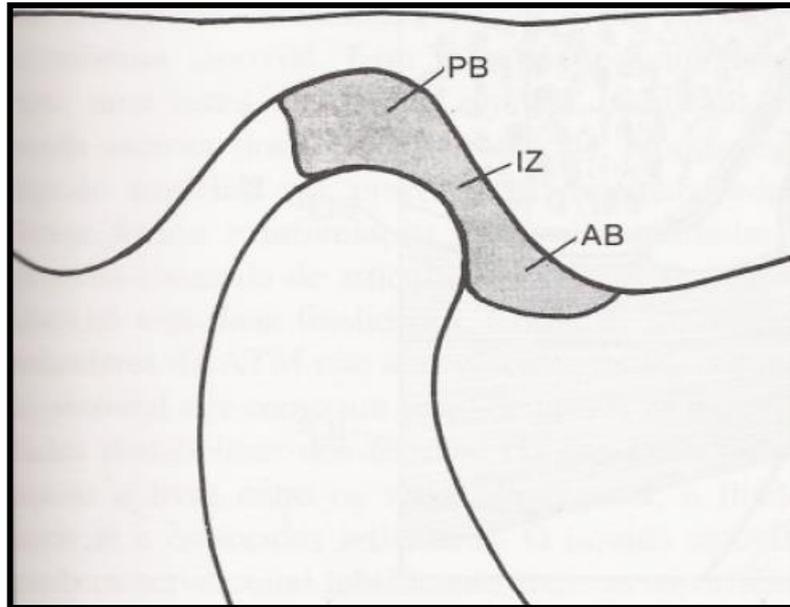


Figura 4: Disco articular com formato bicôncavo.
Fonte: Okeson (1992).

A cápsula articular (Figura 5) é um envoltório fino e frouxo preso superiormente na circunferência da superfície articular cranial e inferiormente no colo do côndilo mandibular (GRAY, 1946). A cápsula fecha a articulação e é reforçada externamente pelo ligamento temporomandibular. Internamente é revestida pela membrana sinovial (AVERY, 2001).

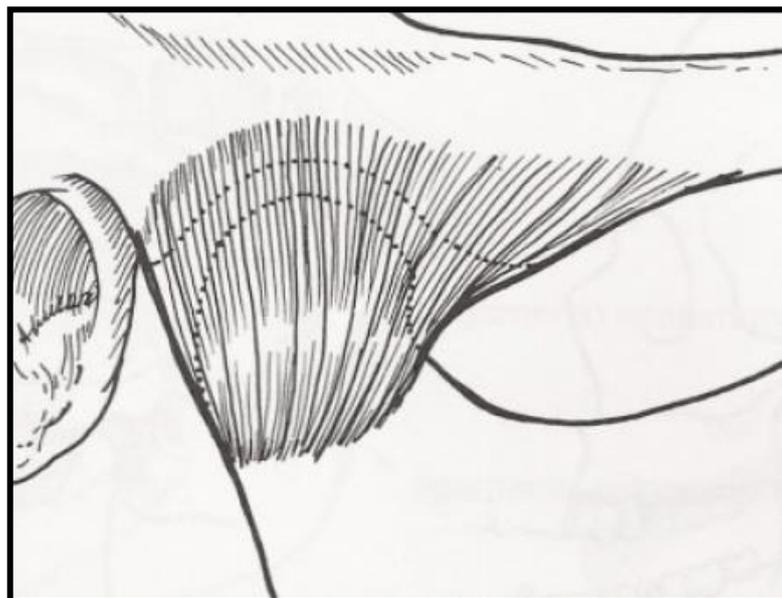


Figura 5: Cápsula articular.
Fonte: Okeson, 1992.

Os ligamentos acessórios são: ligamento temporomandibular, esfenomandibular e estilomandibular. Eles possuem a função de proteger a articulação, limitando os movimentos condilares (DUBRUL, 1991).

Histologicamente, a superfície articular do côndilo e dos ossos longos apresentam diferenças. Nos ossos longos as células cartilaginosas são organizadas em fileiras longas à medida que se aproximam do tecido ósseo, enquanto que nos côndilos elas ficam espalhadas (Figura 6). Em relação à plasticidade biológica, ambos os tipos de condroblastos calcificam na junção osso/cartilagem, formando novo tecido ósseo. Essa habilidade de modificar a forma dos côndilos através de remodelação ósseo-cartilaginosa permite adaptação ao estresse funcional (AVERY, 2001).

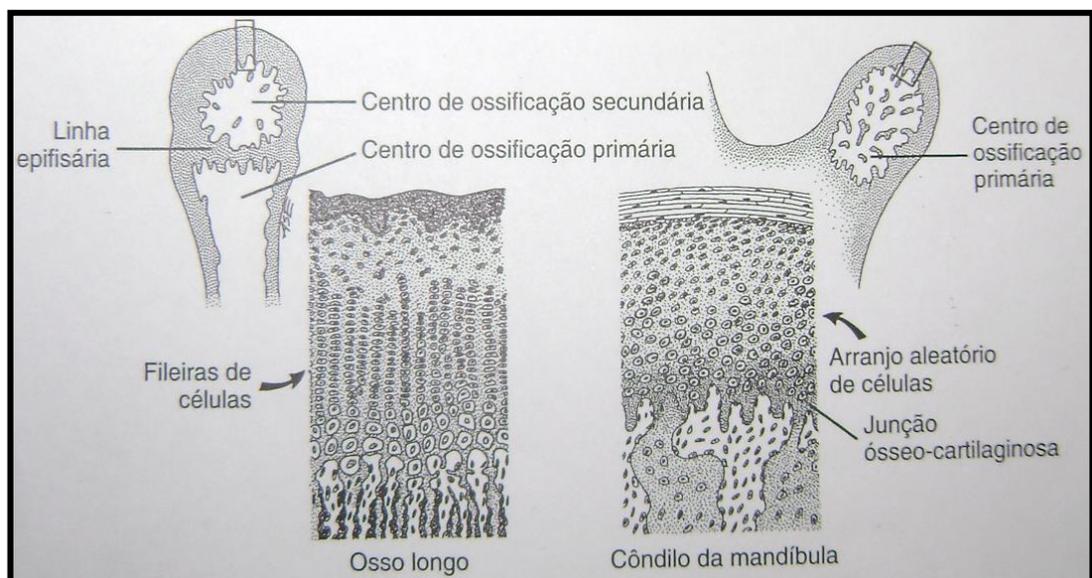


Figura 6: Configuração celular do osso longo e do côndilo mandibular.
Fonte: Avery, 2001.

Singh e Detamore (2009) relatam que a cartilagem articular da ATM é formada por um tecido viscoelástico com matriz extracelular heterogênea, o que reflete na capacidade de resposta à demanda funcional. A superfície articular é didaticamente

dividida em 4 zonas: zona fibrosa, zona proliferativa, zona de maturação e zona hipertrófica (Figura 7).

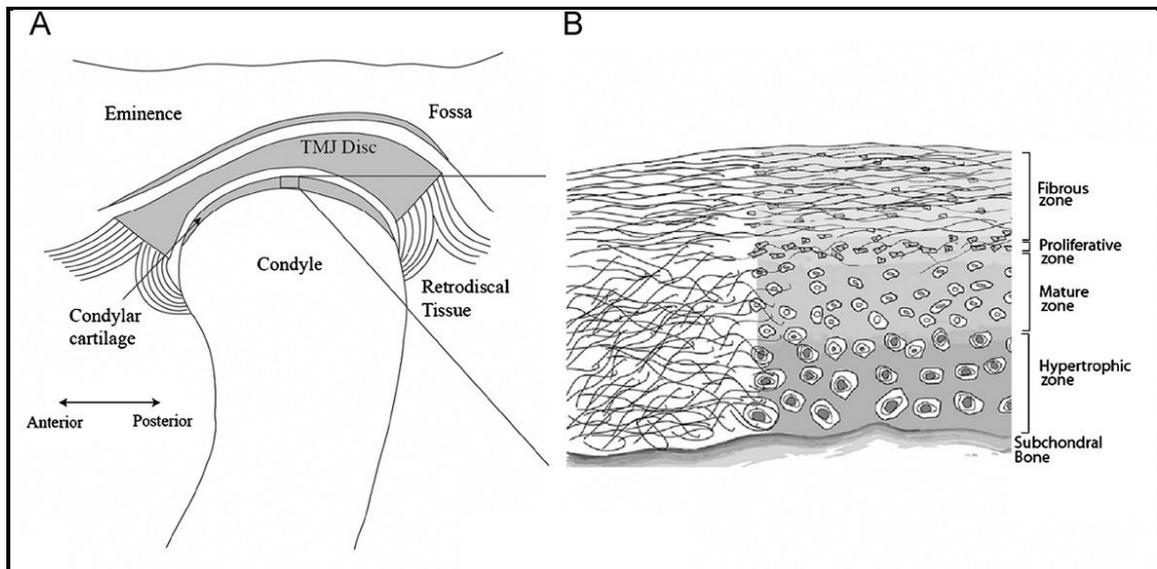


Figura 7: (A) Esquema da anatomia da ATM. (B) Divisão da superfície articular em zonas.
Fonte: Singh e Datamore (2009).

Em relação ao modelo animal utilizado em estudos de ATM, são encontrados na literatura trabalhos com diversos animais. Segundo Weijs e Dantuma (1981), o coelho da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) apresenta a articulação mais próxima da ATM humana anatomicamente e funcionalmente.

4.2 OSTEOARTRITE

A osteoartrite é caracterizada pela deterioração das superfícies articulares, e simultâneo remodelamento do osso adjacente. A degeneração e a destruição das superfícies articulares ocorrem quando os processos reparativos não conseguem manter o mesmo ritmo que as mudanças degenerativas (NITZAN, 2003).

Esta patologia não possui uma aparência uniforme nem uma patogenia única. A doença é clinicamente caracterizada por dor e disfunção, geradas por alterações das superfícies articulares, tais como irregularidades ou perda da cartilagem articular e remodelação do osso subcondral (MOLLENHAUER, 2008).

Uma série de fatores podem levar a estrutura cartilaginosa a um colapso. As alterações de lubrificação articular são causadas pela quebra no equilíbrio biomecânico. Em uma ATM normal, as superfícies articulares e o disco são cercados por uma superfície ativa de fosfolipídeos, protegidos por ácido hialurônico. Em uma situação patológica de sobrecarga, ocorre a hipóxia tecidual e a geração de radicais livres que inibem a síntese e degradam o ácido hialurônico, desprotegendo desta forma a superfície articular de enzimas como a fosfolipase A2, que agirá quebrando essa camada de fosfolipídeos (Figura 8). Esta falta de proteção articular reduz a viscosidade do líquido sinovial, gerando fenômenos de adesão de disco, deslocamento de disco e osteoartrite (NITZAN, 2003 e TANAKA *et al.*, 2008).

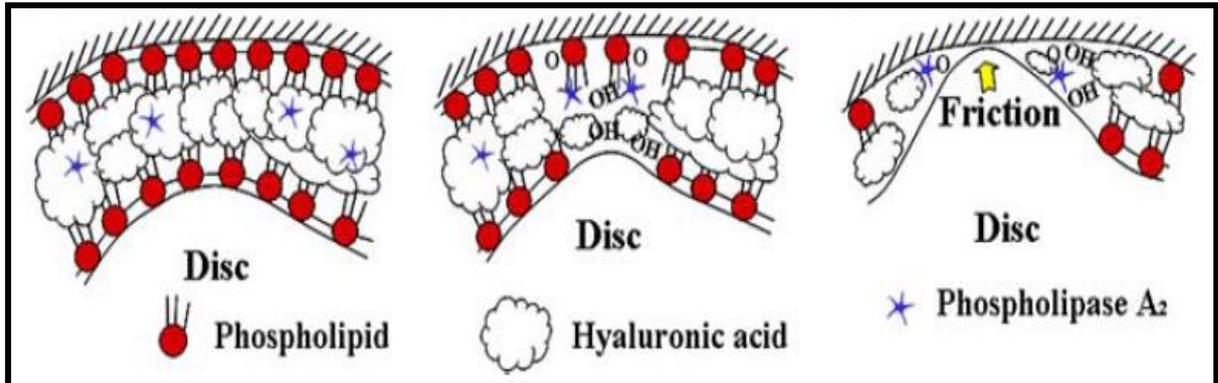


Figura 8: Mecanismo de desproteção articular sob sobrecarga.

Fonte: Tanaka, 2008.

Fatores sistêmicos também contribuem na sintomatologia e progressão da osteoartrite. Condições inflamatórias como artrite reumatoide e psoríase artropática apresentam características osteoartriticas em várias articulações do corpo humano, inclusive da ATM (SIDEBOTTOM e SALHA, 2012; DERVIS e DERVIS, 2005 e MELCHIORRE *et al.*, 2003). Estas patologias apresentam como sinais e sintomas: ruídos na articulação, dor em função, rigidez matinal e limitação de abertura bucal. Em alguns casos, o agravamento destas patologias leva à anquilose articular (KOBAYASHI *et al.*, 2001 e SIDEBOTTOM e SALHA, 2012).

Com relação ao diagnóstico de osteoartrite (Figura 9), Rando e Waldron (2012) consideram algumas características morfológicas como indício da doença, incluindo porosidade (as vezes associada com cistos subcondrais), formação de osteófito (neoformação óssea além dos limites lineares do tecido ósseo), alteração de contorno articular e ossificação da superfície articular, característico no contato osso / osso. Os autores consideram que a ossificação de forma isolada não é um sinal de osteoartrite, mas quando conjugada com outro sinal descrito pode ser considerado OA.

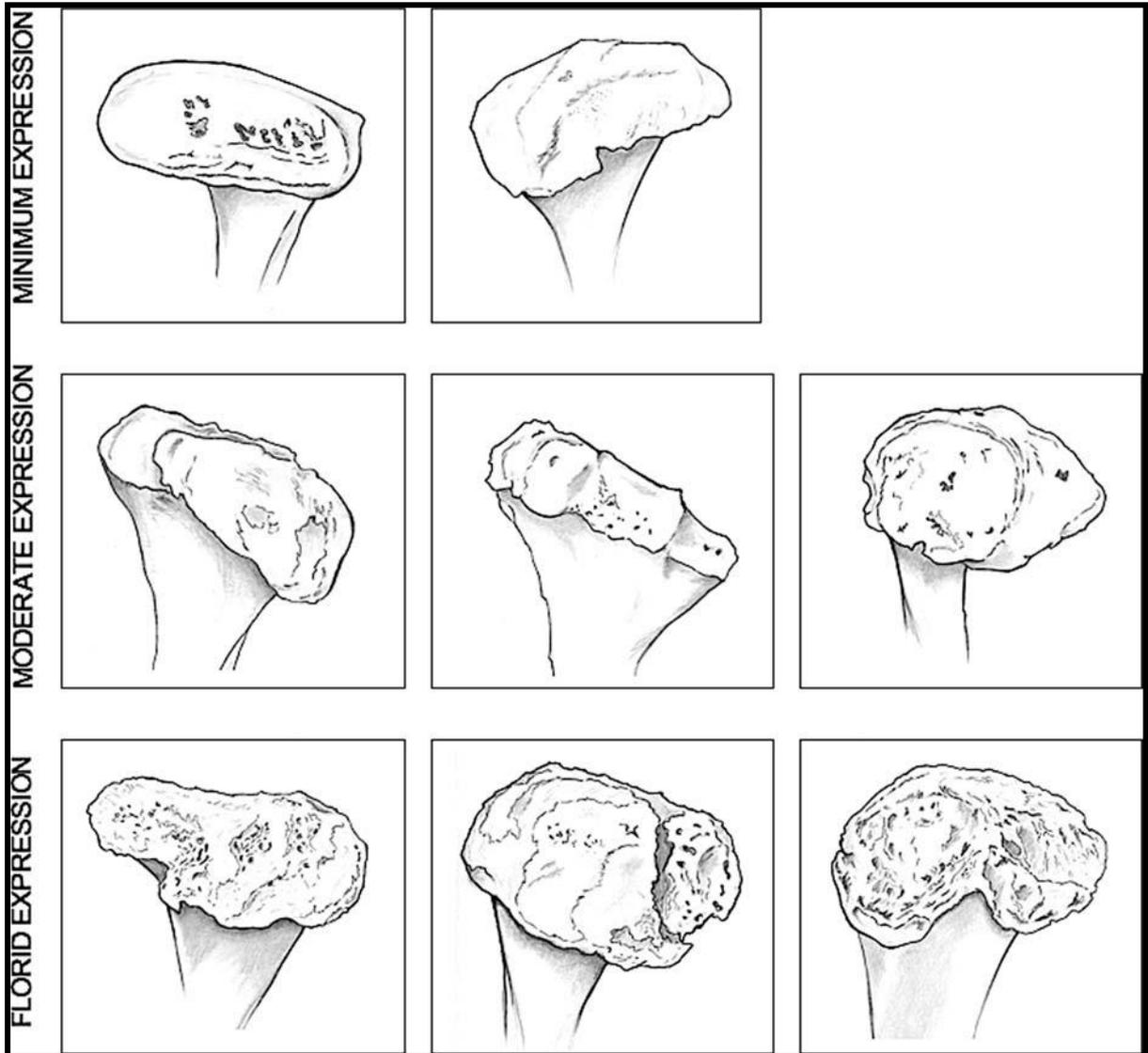


Figura 9: Exemplos de diferentes expressões de osteoartrite: leve, moderado e severo.
Fonte: Rando e Waldron (2012).

De maneira complementar ao exame clínico, muitas vezes o exame de imagem atua como diagnóstico diferencial e final das patologias de ATM (ALEXIOU *et al.*, 2009). Algumas técnicas têm sido utilizadas para avaliação da ATM, entre elas a radiografia panorâmica (WINOCUR *et al.*, 2010), ultrasonografia (BAS *et al.*, 2011 e MANFREDINI e GUARDA-NARDINI, 2009), ressonância magnética (PIANCINO *et al.*, 2012 e IWASAKI *et al.*, 2012), tomografia computadorizada convencional (LEE *et al.*, 2011 e MOYSTAD *et al.*, 2008) e tomografia computadorizada cone beam

(BARGHAN *et al.*, 2012; PONTUAL *et al.*, 2012, PALCONET *et al.*, 2012; CEVIDANES *et al.*, 2010 e ALEXIOU *et al.*, 2009).

Alexiou *et al.* (2009), realizaram estudo com 71 pacientes de várias idades (de 20 a 75 anos) com algum grau de osteoartrite. Foi realizada TC (tomografia computadorizada) cone beam da ATM dos pacientes e foi observado que a severidade da osteoartrite era maior nos doentes de maior idade, caracterizando assim, a OA como uma doença progressiva (Figura 10).

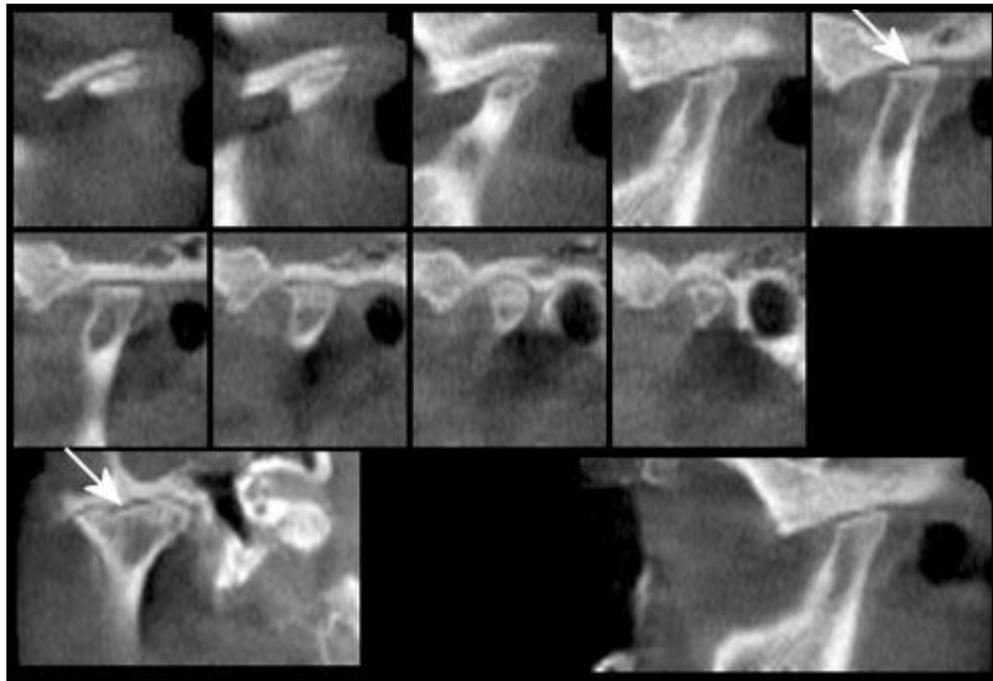


Figura 10: Aplainamento e reabsorção condilar de uma paciente de 75 anos.
Fonte: Alexiou *et al.*, 2009.

Hussain *et al.* (2008) realizaram uma revisão sistemática comparando os métodos de imagem para avaliação de erosões e osteófitos, e consideraram a tomografia sagital corrigida axialmente o melhor método. A tomografia cone beam foi considerada uma excelente opção à primeira, por apresentar alta qualidade de diagnóstico e uma dose de radiação menor que a tomografia computadorizada convencional.

Em relação ao tratamento da osteoartrite não há um consenso na literatura. Sidebottom e Salha (2012) sugerem o controle da dor com antiinflamatórios não esteroidais e placas oclusais (KURT *et al.* 2011) como primeira escolha de tratamento destes pacientes, seguido de artrocentese (MACHON *et al.*, 2011 e NITZAN *et al.*, 2006) e cirurgia aberta para os casos não responsivos. Rashid *et al.* (2012) também relatam bons resultados com fisioterapia.

A bioengenharia tecidual tem avançado muito com o intuito de estagnar a progressão da osteoartrite e regenerar os defeitos ósseo-cartilaginosos deixados por ela. A utilização de fatores de crescimento e arcabouços prometem reduzir os sintomas da OA e criar condições favoráveis para uma neoformação tecidual adequada (WANG e DETAMORE, 2007).

Man *et al.*, (2009) realizaram perfuração no disco articular de 24 coelhos para induzir osteoartrite. A articulação direita seria tratada com TGF- β (*transforming growth factor-beta*), e a esquerda com soro fisiológico. Os resultados demonstraram uma menor severidade da OA na articulação experimental, onde a camada superficial se apresentou mais espessa que na articulação controle em 12 e 24 dias (Figuras 11 e 12). Agrecan e colágeno tipo II também foram mais encontrados no grupo experimental em 12 dias.

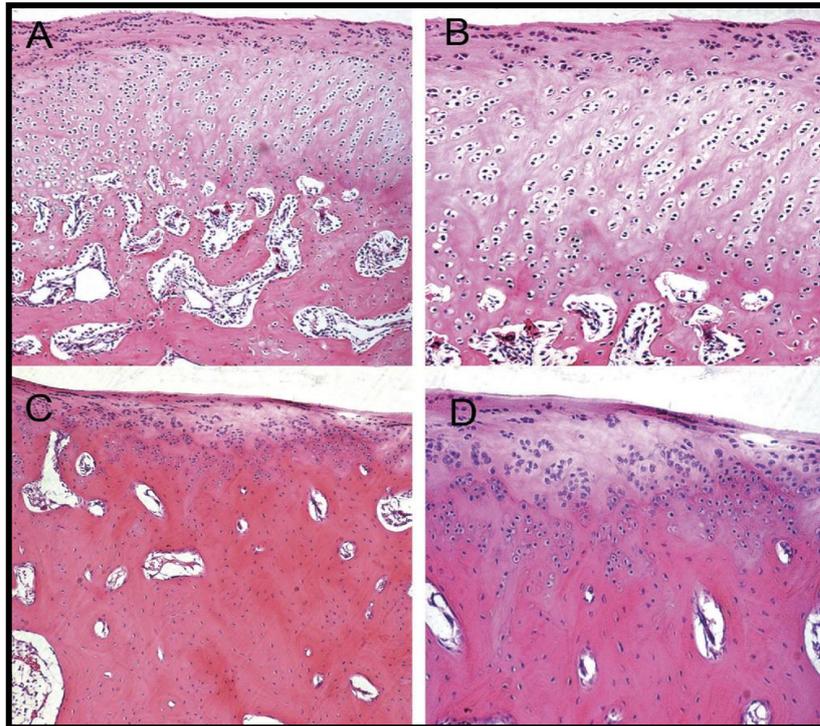


Figura 11: (A e B) Articulação experimental em 12 dias, com maior espessura de cartilagem articular e celularidade. (C e D) Articulação controle em 12 dias, com menor espessura de cartilagem articular e baixa celularidade.

Fonte: Man *et al.* (2009).

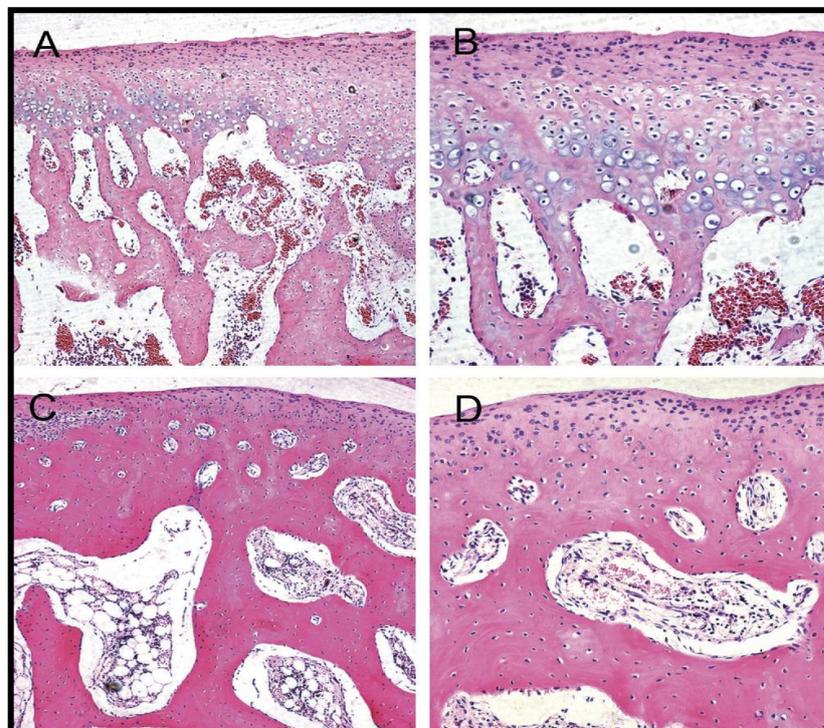


Figura 12: (A e B) Articulação experimental em 24 dias, com maior espessura de cartilagem articular e celularidade. (C e D) Articulação controle em 24 dias, com menor espessura de cartilagem articular e baixa celularidade.

Fonte: Man *et al.* (2009).

Suzuki *et al.* (2002) realizaram um estudo onde foi feita uma perfuração de 2 mm de diâmetro em côndilo de coelhos, e aplicado rhBMP-2 (*recombinant human bone morphogenetic protein-2*) com colágeno em diferentes doses. Em 3 semanas foi observado que a cavidade havia sido coberta por tecido cartilaginoso nas doses mais altas, e por tecido fibroso nas doses mais baixas. Os autores concluíram que BMP-2 é útil na regeneração da superfície articular da ATM.

Takafuji *et al.* (2007) observaram a cicatrização de um defeito de 10mm³ criado no côndilo mandibular de 12 coelhos. Estes animais foram divididos em 4 grupos de tratamento, onde a cavidade foi preenchida com colágeno, colágeno com 0,1 µg de FGF-2 (fibroblast growth factor 2), colágeno com 1 µg de FGF-2 e sem preenchimento. Os autores relataram que em 3 semanas, as cavidades preenchidas com colágeno e 0,1 µg FGF-2 foram totalmente preenchidas por tecido cartilaginoso (Figura 13), enquanto que no grupo com colágeno e 1 µg de FGF-2 as cavidades apresentavam parcialmente cobertas com cartilagem e fibrose (Figura 14). O grupo que foi tratado apenas com colágeno não apresentou resquício de cartilagem, apenas tecido mole (Figura 15). No grupo sem tratamento não foi observado reparo (Figura 16).

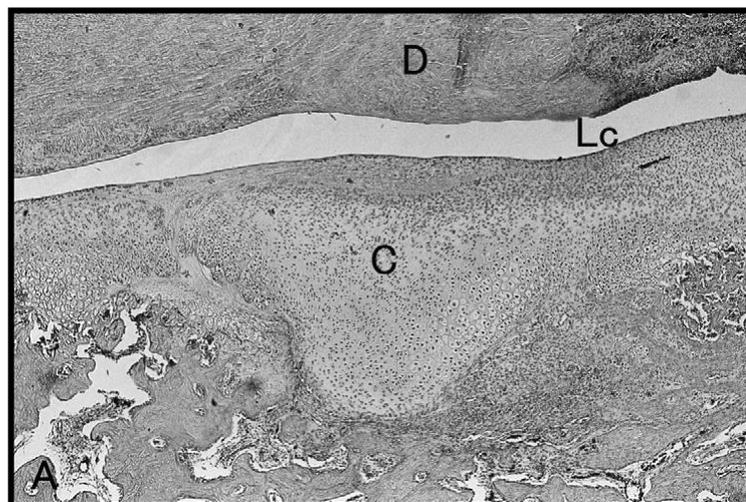


Figura 13: Côndilo tratado com colágeno e 0,1 µg de FGF-2.
Fonte: Takafuji *et al.* (2007).

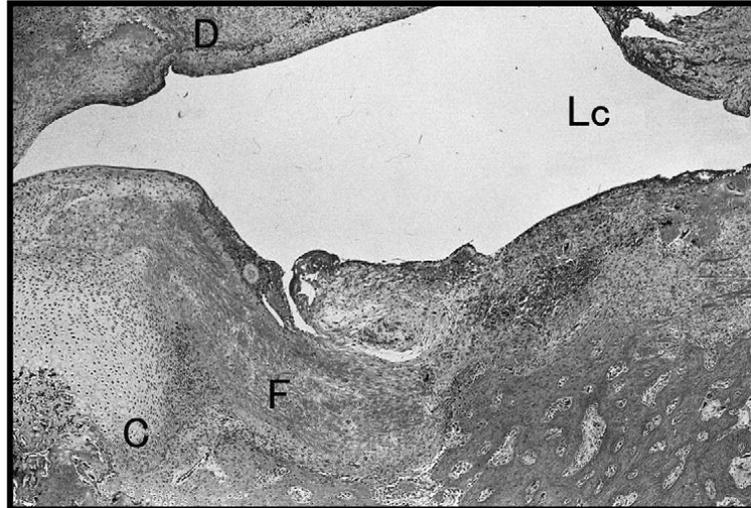


Figura 14: Côndilo tratado com colágeno e 1 µg de FGF-2.
Fonte: Takafuji *et al.* (2007).

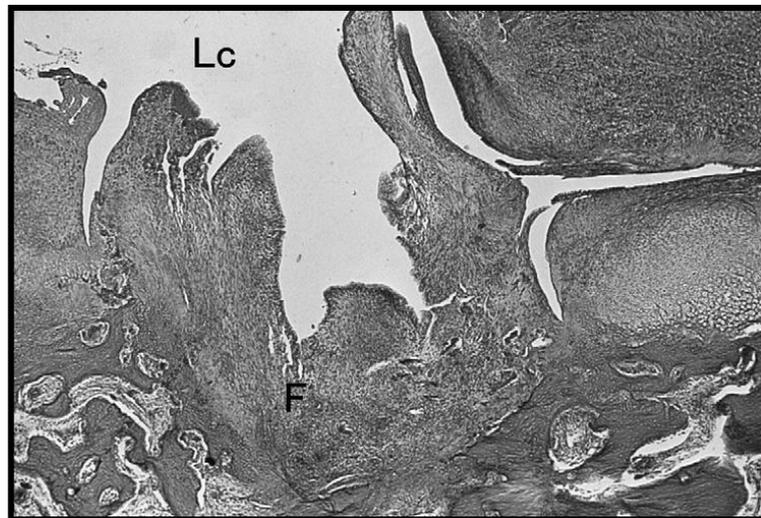


Figura 15: Côndilo tratado com colágeno.
Fonte: Takafuji *et al.* (2007).

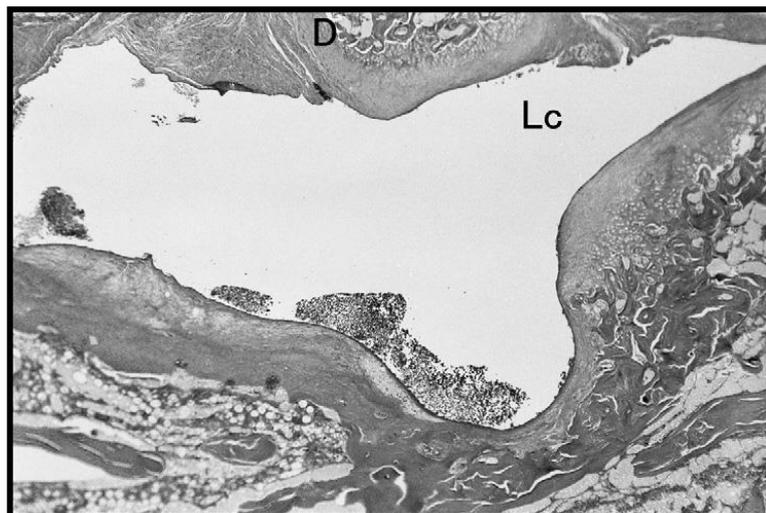


Figura 16: Côndilo sem tratamento.
Fonte: Takafuji *et al.* (2007).

Xinmin e Jian (2005) induziram osteoartrite na ATM de coelhos com MMP-1 (*matrix metalloproteinase-1*) e dividiram os animais em 3 grupos de tratamento: artrocentese, viscosuplementação com ácido hialurônico (AH), e artrocentese mais viscosuplementação. Os resultados demonstraram uma menor severidade de osteoartrite nos grupos tratados com viscosuplementação de AH e artrocentese somada ao AH.

4.3 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

O hormônio do crescimento ou somatotropina é produzido na glândula pituitária anterior (Figura 17) e possui como funções principais o crescimento, principalmente via secreção de IGF-I (*insuline-like growth factor-1*), um fator de crescimento peptídico induzido pelo GH e produzido em vários órgãos, principalmente no fígado (MARTINELLI JR. *et al.*, 2008). Também age no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios (VANDER *et al.*, 2001).

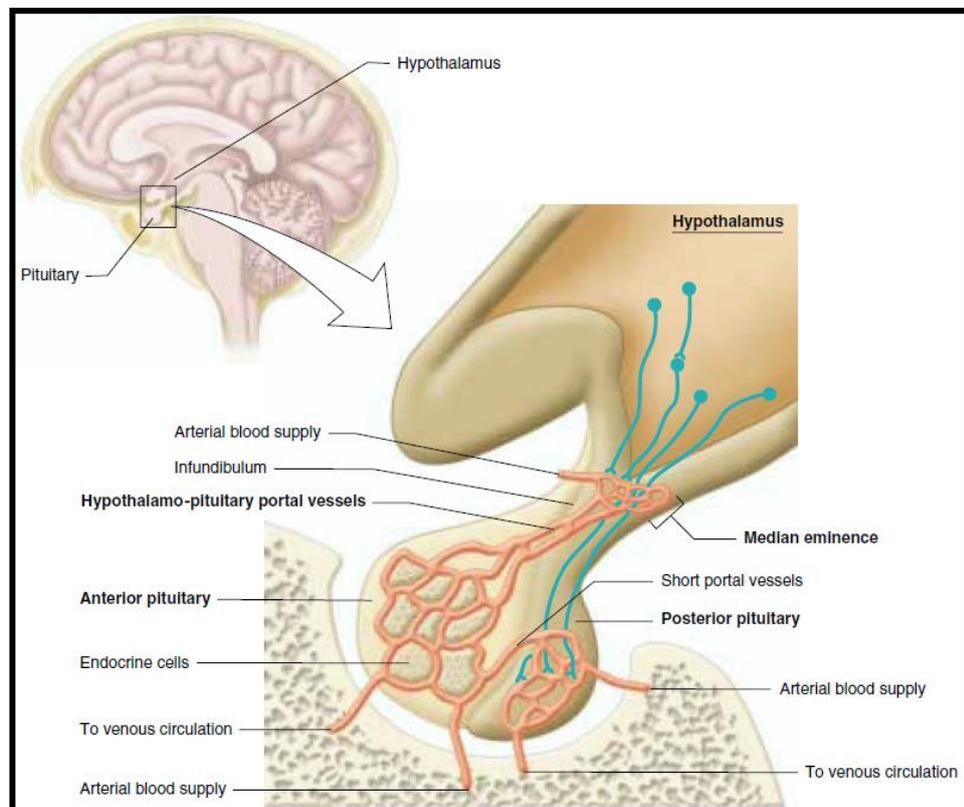


Figura 17: Glândula pituitária, onde é produzido o GH.

Fonte: Vander *et al.* (2001).

A produção de GH é estimulada e inibida por múltiplos reguladores externos e internos. Estímulos para a liberação de GH incluem hipoglicemia, níveis elevados de insulina, stress, exercício e sono profundo. Em crianças, os períodos de crescimento rápido funcionam como estímulos fortes para a liberação do hormônio. Os inibidores

da liberação do GH incluem hiperglicemia, obesidade e aumento dos níveis de glicocorticóides (ELIJAH *et al.*, 2011).

O hormônio do crescimento é indicado no tratamento do nanismo ou deficiência no crescimento, decorrente da secreção diminuída ou ausência do hormônio de crescimento endógeno (DAHLGREN *et al.*, 2011 e DEODATI E CIANFARANI, 2011). Também há relatos na literatura de bons resultados no tratamento da lipodistrofia (MOYLE *et al.*, 2004; SIVAKUMAR *et al.*, 2011) e caquexia (GELATO *et al.*, 2007) associada ao HIV.

Nos últimos anos o hormônio do crescimento tem sido estudado em alguns trabalhos que abordam a cicatrização óssea e articular. Isaksson *et al.* (1991) relataram que os estudos têm demonstrado *in vitro* o estímulo do GH e IGF-I às culturas de condrócitos. Ohlsson *et al.* (1998), em revisão de literatura, observaram nos estudos *in vitro* e *in vivo* que o hormônio do crescimento é um importante biomodulador da plasticidade biológica, agindo na formação e reabsorção óssea. O aumento da formação óssea ocorre em 2 vias: via uma interação direta com os receptores de GH nos osteoblastos e via indução de IGF-I.

4.3.1 AÇÃO NO TECIDO ÓSSEO

Eriksen *et al.* (1996), em revisão de literatura, descreveram diversos efeitos do GH no tecido ósseo. Os autores concluíram que o hormônio do crescimento exerce pronunciados efeitos não apenas no crescimento ósseo, mas também em seu remodelamento. Uma única dose de GH dada por 7 dias pode ativar a remodelação óssea por mais de 6 meses.

Millis *et al.* (1998) observaram os efeitos da somatropina (2mg/dia por 42 dias) recombinante canina na cicatrização de osteotomia realizada no osso rádio de 8 cães beagle (4 cães do grupo controle e 4 cães do grupo teste). Os resultados demonstraram cicatrização mais avançada no grupo teste em relação ao controle analisada por radiografia. Uma densidade óssea duas à cinco vezes maior no grupo tratado com somatropina foi observada.

Raschke *et al.* (1999) avaliaram os efeitos do hormônio do crescimento recombinante suíno em porcas Yucatan submetidas a distração osteogênica. Os resultados demonstraram que a carga para ruptura sob torção e a rigidez torcional foram 131% e 231% maior no grupo teste, respectivamente, o que demonstra que o GH acelera a regeneração óssea. Os níveis séricos de IGF-I, fatores de crescimento peptídicos promovidos pelo GH, aumentaram 440% no grupo teste.

Raschke *et al.* (2001) estudaram 24 porcos com defeito ósseo de 1cm na tíbia. Um grupo recebeu hormônio do crescimento recombinante suíno, e outro grupo recebeu placebo. A carga para ruptura sob torção foi 70% maior no grupo de animais que receberam o hormônio. A rigidez torcional também foi maior no grupo teste. O nível sérico de IGF-I aumentou 382% nos animais que receberam o

hormônio, e reduziu 69% no grupo controle. Os autores consideraram o GH um mecanismo para estimular a cicatrização da fratura, resultando em maior resistência mecânica e rigidez do calo.

Bail *et al.* (2002) analisaram o efeito do hormônio do crescimento recombinante suíno (100µg/kg) em porcos Yucatan em distração osteogênica de tíbia e fíbula. Os 10 animais do grupo teste receberam injeção diária do hormônio, enquanto os 10 animais do grupo controle receberam cloreto de sódio como placebo, ambos por 25 dias. Em análise histomorfométrica foi observado uma formação de calo ósseo maior no grupo teste, porém sem diferença na estrutura do calo nos 2 grupos. Os animais que receberam as doses do hormônio apresentaram grande ossificação durante a distração. Os autores consideraram o hormônio do crescimento uma boa ferramenta para acelerar a maturação óssea no processo reparador.

Kolbeck *et al.* (2003) observaram a cicatrização óssea de 24 porcos Yucatan que tiveram as tíbias do lado esquerdo osteotomizadas e estabilizadas com placa de fixação. Os 24 animais foram divididos em 2 grupos de 12, onde um grupo recebeu solução salina e o outro recebeu 100µg/kg de hormônio do crescimento recombinante suíno, em injeções subcutâneas diárias por 4 semanas. Os resultados demonstraram que a carga para ruptura sob torção e a rigidez torcional foram 91% e 61% maior no grupo teste, respectivamente. Em análise histomorfométrica foram observadas maior formação de calo ósseo e maior área de mineralização nos animais que receberam o hormônio. A densidade óssea foi similar nos grupos.

Yang *et al.* (2012), em revisão sistemática do uso do hormônio do crescimento em fraturas de quadril, constataram que a utilização do GH pode ser efetiva no

tratamento destas fraturas, mas devido à baixa evidencia, sugeriu mais estudos a respeito do tema.

4.3.2 AÇÃO NAS ARTICULAÇÕES

Chrisman (1975) realizou estudo experimental em coelhos, onde foram criados diversos tipos de defeitos na cartilagem patelar. Os animais receberam tratamento com salicilato de sódio, hormônio do crescimento e salicilato associado ao hormônio. O grupo controle ficou sem receber medicação. Os resultados demonstraram que sob o estímulo do hormônio do crescimento, a contagem de células quase dobrou em comparação ao grupo controle, o conteúdo de DNA aumentou e a qualidade histológica da matriz foi aumentada. A adição de salicilato de sódio ao hormônio aumentou levemente a contagem de células e a marcação da matriz.

Halbrecht *et al.* (1990) imobilizaram os membros posteriores do lado esquerdo de 72 coelhos causando degeneração articular do côndilo femoral. Metade dos coelhos recebeu 1mg/kg IM de hormônio do crescimento humano 5 vezes por semana. A outra metade recebeu o mesmo protocolo de solução salina. Após 4 semanas, as articulações foram remobilizadas em metade dos coelhos dos grupos e a outra metade foi eutanasiada. Os coelhos remanescentes permaneceram vivos mais 4 semanas até a eutanásia. O côndilo femoral dos coelhos recebeu análise bioquímica, biomecânica e histológica. Os resultados demonstraram que nas 4 primeiras semanas, com os animais imobilizados, não houve diferença entre os grupos. Os animais apresentaram formação de osteófitos e irregularidades na superfície articular. Após a remobilização, em 8 semanas, foram notadas algumas diferenças. Os coelhos do grupo teste apresentaram menor grau de deformação à carga, melhor pigmentação da matriz, maior conteúdo de proteoglicanos e uma tendência de cartilagem mais espessa e rígida em relação ao grupo controle.

Livne *et al.* (1997) realizaram cultura com cndilos mandibulares de camundongos velhos (20 meses) com osteoartrite. A cartilagem condilar da cultura controle (48 horas) dos camundongos revelou irregularidades e fissuras, tpicas de OA ao longo da superfície articular. Condrócitos achatados foram vistos nesta região e o resto da cartilagem continha poucos condrócitos circundados por regiões de matriz acelular. A adição de GH recombinante de rato na cultura resultou em hipertrofia da camada de condrócitos da superfície articular. Os autores concluíram que a superfície articular de ratos com OA responderam *in vitro*  adição de GH através da proliferação de células, síntese de proteoglicanos e possibilidade de melhor mineralização.

Visnapuu *et al.* (2001) localizaram receptores de GH e IGF-I no côndilo mandibular de ratos entre 1 e 21 dias de idade através de análise imunohistoquímica. Foram encontrados receptores de IGF-I na superfície articular. O GH não esteve presente na superfície articular, e ficou bem marcado no osso subcondral. Os autores recomendaram estudos com ratos mais velhos para avaliar a presena de IGF-I e GH no côndilo mandibular.

Bail *et al.* (2003) avaliaram o uso de hormônio do crescimento recombinante suíno (r-pGH) na cicatrização de defeitos osteocondrais do côndilo femoral de porcos. Foi criado um defeito de 6 mm de diâmetro e 1,5 mm de profundidade no osso subcondral dos animais. Foram utilizados 48 porcas Yucatan fêmeas maduras divididas em 2 grupos. O grupo controle (n = 24) recebeu cloreto de sódio (placebo), e o grupo de tratamento (n = 24) recebeu 100 µg/kg de r-pGH. Os animais receberam as injeções subcutâneas diariamente até o dia do sacrifício em 4 e 6 semanas. Em 4 semanas os autores não encontraram diferenas entre o grupo de tratamento e o placebo, os defeitos osteocondrais criados estavam

predominantemente cobertos por tecido fibroso. Em 6 semanas observou-se maior preenchimento da cavidade com osso neoformado no grupo de tratamento, enquanto no grupo controle as cavidades eram similares às das 4 semanas. A formação de tecido fibroso e cartilaginoso também mostrou melhores resultados com o uso de r-pGH, porém sem diferença significativa. Os autores concluíram que a utilização de hormônio do crescimento pode acelerar a cicatrização de defeitos osteocondrais através da estimulação à formação de tecido ósseo e cartilaginoso sem a necessidade de abrir a articulação.

Ramirez-Yañez *et al.* (2004) observaram os efeitos do hormônio do crescimento na cartilagem do côndilo mandibular de ratos. Foram analisados 6 ratos anões, 6 ratos normais (ambos como controle) e 6 ratos anões com 2 suplementações diárias de GH (660µg/kg) por 6 dias. Os resultados demonstraram maior atividade mitótica nos animais que receberam a suplementação com GH, entretanto foram observados atraso na maturação celular da cartilagem do côndilo mandibular, e menor espessura da cartilagem.

Kim *et al.* (2010) realizaram experimento com 30 coelhos divididos em 3 grupos, onde foram induzidos osteoartrite na articulação do joelho. O grupo 1 recebeu 1 infiltração semanal de soro fisiológico por 4 semanas. O grupo 2 recebeu 1 infiltração semanal de ácido hialurônico (6 mg) por 4 semanas. O grupo 3 recebeu 1 infiltração semanal da associação de AH (0,6 mg) e hormônio do crescimento recombinante humano (3 mg). Os resultados demonstraram que o grupo 3 apresentou um menor escore de OA em relação ao grupo 1 e 2 (Figura 18), demonstrando uma melhor ação do GH associado ao AH no controle da osteoartrite.

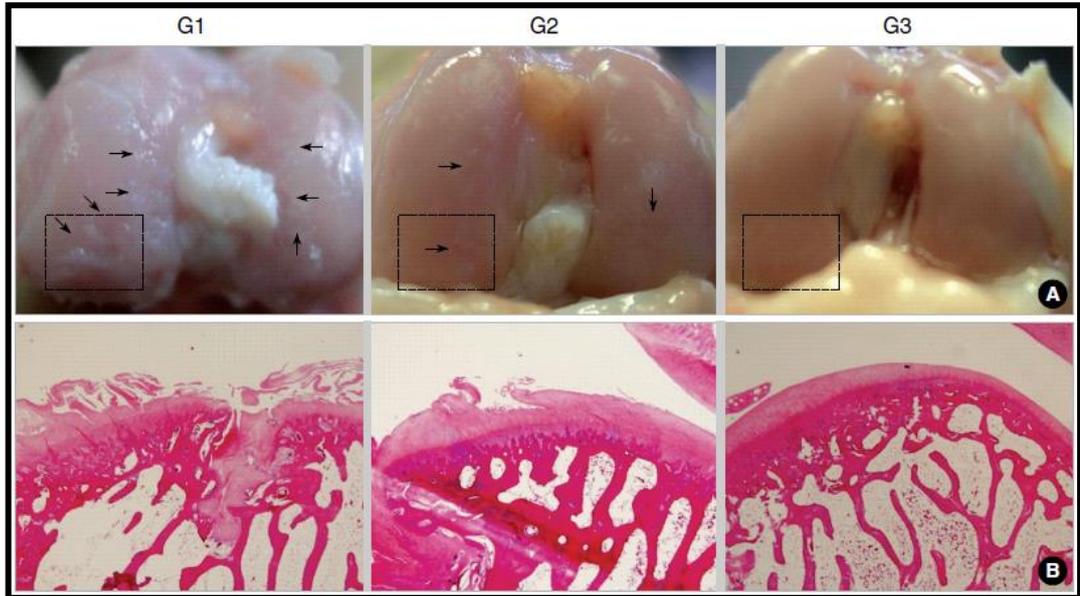


Figura 18: Graus de severidade osteoartrítica da cartilagem patelar de coelhos. O G1 tratado com solução salina. O G2 tratado com AH. O G3 tratado com AH/GH.
Fonte: Kim *et al.* (2010).

5 METODOLOGIA

5.1 RESPALDO ÉTICO

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS sob protocolo nº 0086/10 (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética para Uso de Animais sob protocolo nº 10/00217 (ANEXO B).

Os princípios éticos relacionados a experimentação animal foram regidos pela lei nº11.794 da Constituição Federal de 08 de outubro de 2008 e pela resolução nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002.

5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Desenho experimental de boca dividida.

5.3 AMOSTRA

Foram utilizados no estudo vinte e três coelhos machos adultos jovens, com 4 meses de idade, pesando entre 2,5 e 3,1 kg (média de 2,7kg) da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), obtidas comercialmente (Pegoraro & Pegoraro LTDA / Feliz - RS) e mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Cada animal ficou em uma gaiola padrão, de 60 cm de largura, 60 cm de altura e 45 cm de profundidade em ambiente com temperatura entre 15° e 21° celsius e umidade relativa do ar de 45 a 55 % (Figura 19). O ambiente foi iluminado artificialmente com ciclo claro/escuro de 12 horas. A alimentação foi realizada com água e ração pelitizada *ad libidum* com adição de fibras 3 vezes por semana. Os animais tiveram ambientação de 7 dias previamente ao procedimento cirúrgico. O tamanho da amostra foi baseado em trabalhos similares encontrados na literatura (MIYAKE *et al.*, 1994 e DIMITROULIS e SLAVIN, 2006).



Figura 19: Gaiola dos animais.

5.4 GRUPOS DO EXPERIMENTO

Foram utilizados no estudo 23 animais, dos quais 4 foram descartados devido à infecção no período pós-operatório. Os 19 animais restantes foram divididos em 3 grupos de 6 coelhos operados mais 1 coelho controle não operado. Os animais operados passaram 14 dias em função mastigatória sem os discos articulares para a indução da osteoartrite. Após esse período iniciaram-se os protocolos experimentais, com infiltração de rhGH (Saizen®, Laboratório Merck) e NaCl 0,9% (Texon ®).

No primeiro grupo de animais (grupo A), 5 coelhos receberam 1 infiltração intra-articular de rhGH (0,5UI/kg) na ATM direita e soro fisiológico (NaCl 0,9%) na ATM esquerda em 14 dias. O sexto coelho não recebeu infiltrações. A eutanásia ocorreu em 21 dias.

No segundo grupo de animais (grupo B), 5 coelhos receberam 1 infiltração semanal intra-articular de rhGH (0,5UI/kg) na ATM direita e soro fisiológico (NaCl 0,9%) na ATM esquerda em 14 e 21 dias. O sexto coelho não recebeu infiltrações. A eutanásia ocorreu em 28 dias.

No terceiro grupo de animais (grupo C), 5 coelhos receberam 1 infiltração semanal intra-articular de rhGH (0,5UI/kg) na ATM direita e soro fisiológico (NaCl 0,9%) na ATM esquerda em 14, 21 e 28 dias. O sexto coelho não recebeu infiltrações. A eutanásia ocorreu em 35 dias.

O coelho não operado não sofreu infiltrações, e serviu como controle em relação às articulações operadas.

Tabela 1: Cronograma de infiltrações:

	DISCECTOMIA	1º INFILTRAÇÃO	2º INFILTRAÇÃO	3º INFILTRAÇÃO
1º DIA	A, B e C			
14º DIA		A, B e C		
21º DIA			B e C	
28º DIA				C

5.5 PROTOCOLO ANESTÉSICO DOS ANIMAIS

O protocolo anestésico foi iniciado com a medicação pré-anestésica para tranquilização do animal e realização da tricotomia. Foi administrado por via intramuscular cetamina 15mg/kg, midazolam 1mg/kg e meperidina 5mg/kg. A indução da anestesia geral foi realizada com Isoflurano 5% em O₂ 100%, através de máscara facial. Ao se observar a perda do reflexo de retirada do membro anterior, foi realizada a entubação orotraqueal, para manutenção da anestesia inalatória (Figura 20). Foram aferidos os seguintes parâmetros anestésicos: frequência cardíaca e respiratória, capnometria, oximetria e temperatura retal (Figura 21). A profilaxia antibiótica foi realizada imediatamente antes da cirurgia, com a administração intramuscular de enrofloxacino 5mg/kg.



Figura 20: Entubação orotraqueal.

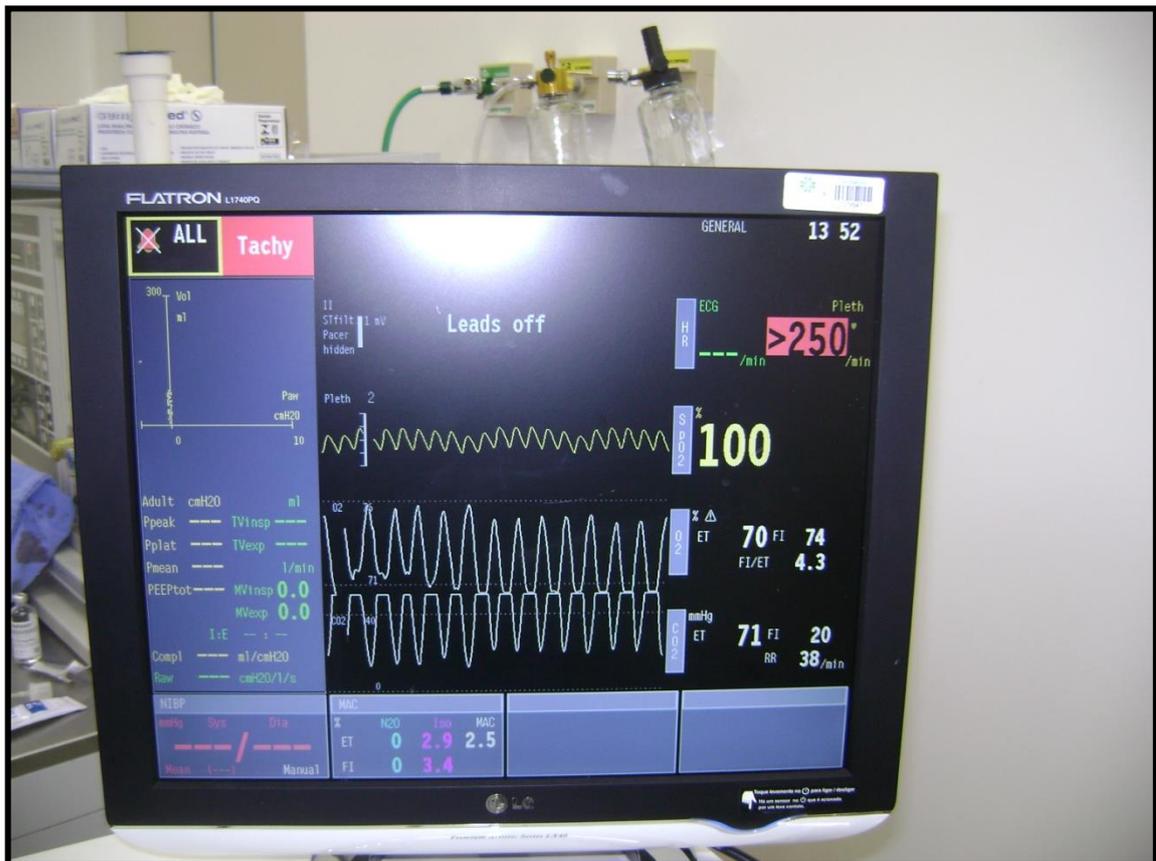


Figura 21: Controle dos sinais vitais do animal no procedimento cirúrgico.

5.6 PROTOCOLO CIRÚRGICO PARA A INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE

Previamente ao ato cirúrgico foi realizada, com máquina (Oster ®), tricotomia na região pré-auricular bilateral com o animal sedado (Figura 22).

Foi realizada anti-sepsia da área cirúrgica com digluconato de clorexidine 2% (Riohex, Laboratório Rioquímica ®) previamente à aposição do campo cirúrgico fenestrado. A localização da incisão da pele foi marcada com azul de toluidina. Uma lâmina 15 (B. Braun ®) foi utilizada na incisão vertical de 2 cm realizada na pele 3 mm atrás do processo zigomático-temporal. Os planos foram divulsionados com Tesoura de Matsebaum até a exposição da sutura zigomático-escamosa e a cápsula (Figura 23). Uma incisão horizontal com lâmina 15 foi realizada na cápsula, e o disco articular foi removido com descolador periostal, pinça hemostática e lâmina de bisturi número 11(B. Braun)(Figuras 24 e 25). Os planos internos foram suturados com fio de Vicryl 4.0 (Ethicon ®)(Figura 26) e a pele foi suturada com fio de Nylon 5.0 (B. Braun ®)(Figura 27). Ambas as articulações temporomandibulares foram operadas. O tempo cirúrgico variou entre 40 e 63 minutos (média de 52 minutos) por animal.

Os animais receberam analgesia no pós-operatório com cloridrato de tramadol (2mg/kg) a cada 12h durante três dias e enrofloxacino (5mg/kg) por 3 dias, ambos por via intramuscular.

Durante o período pós-operatório os animais foram controlados em relação à peso, alimentação e infecção. Foram descartados 4 animais do experimento por terem apresentado abscesso na área operada. Os animais restantes mantiveram

função mastigatória por 14 dias, induzindo desta forma, conforme alguns estudos (MIYAKE *et al.*, 1994; AYMAN E SHARAWY, 1996 e SHARAWY *et al.*, 2003), características osteoartíticas na superfície articular.



Figura 22: Tricotomia pré-cirúrgica.



Figura 23: Exposição cirúrgica da ATM.

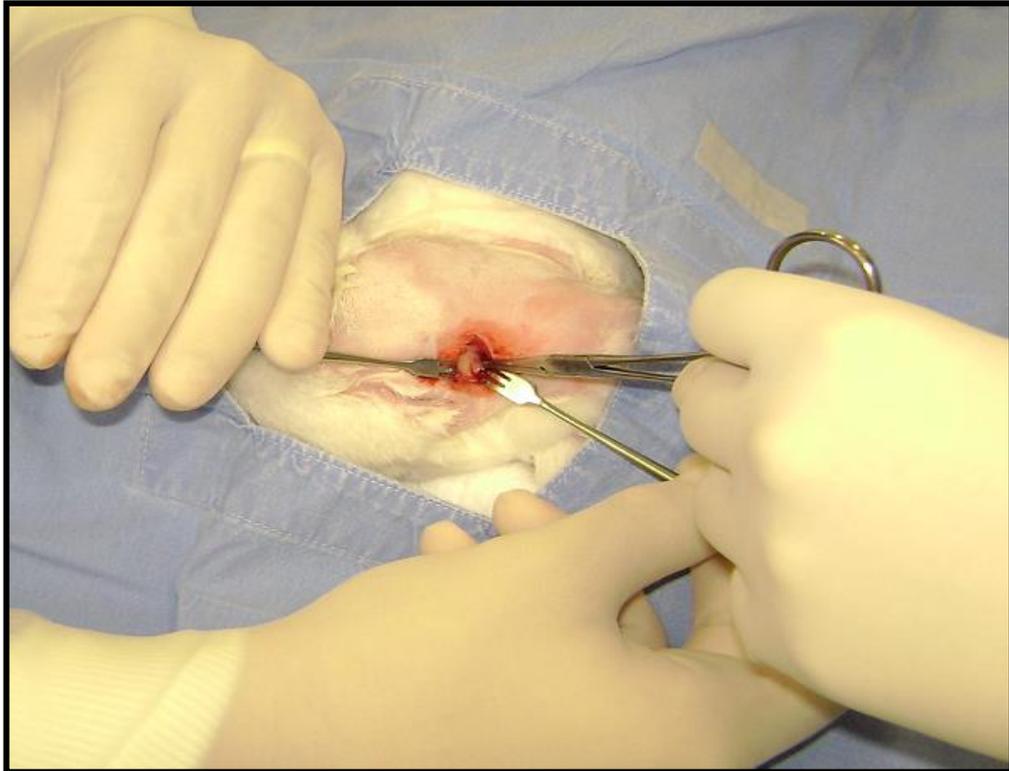


Figura 24: Remoção cirúrgica do disco articular.

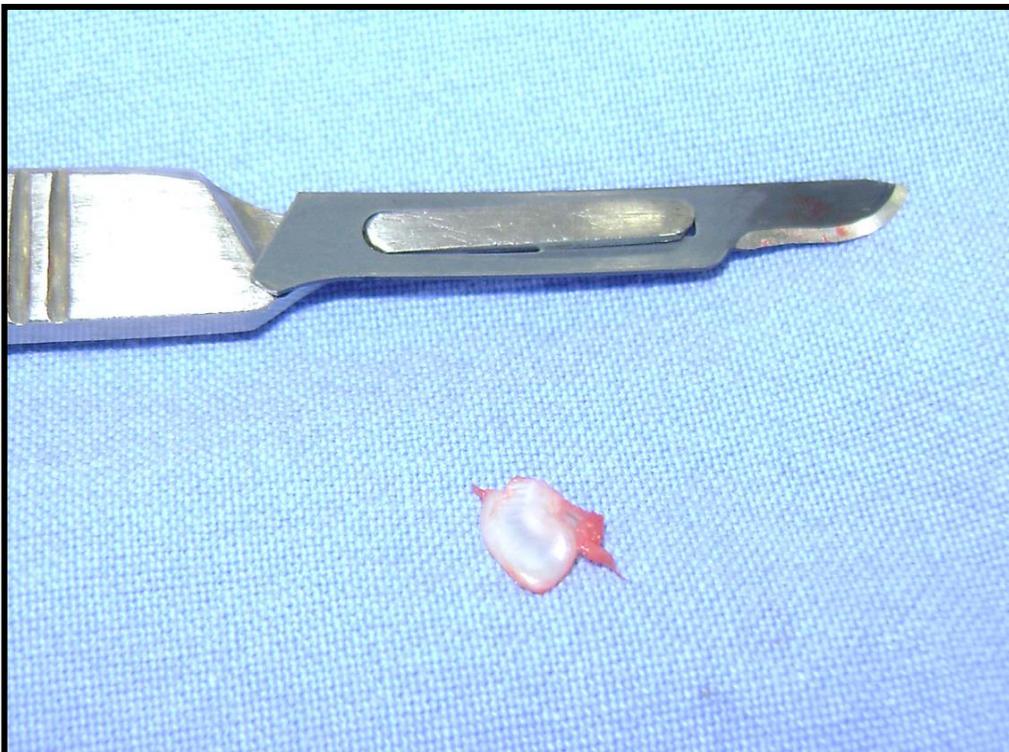


Figura 25: Disco articular removido.

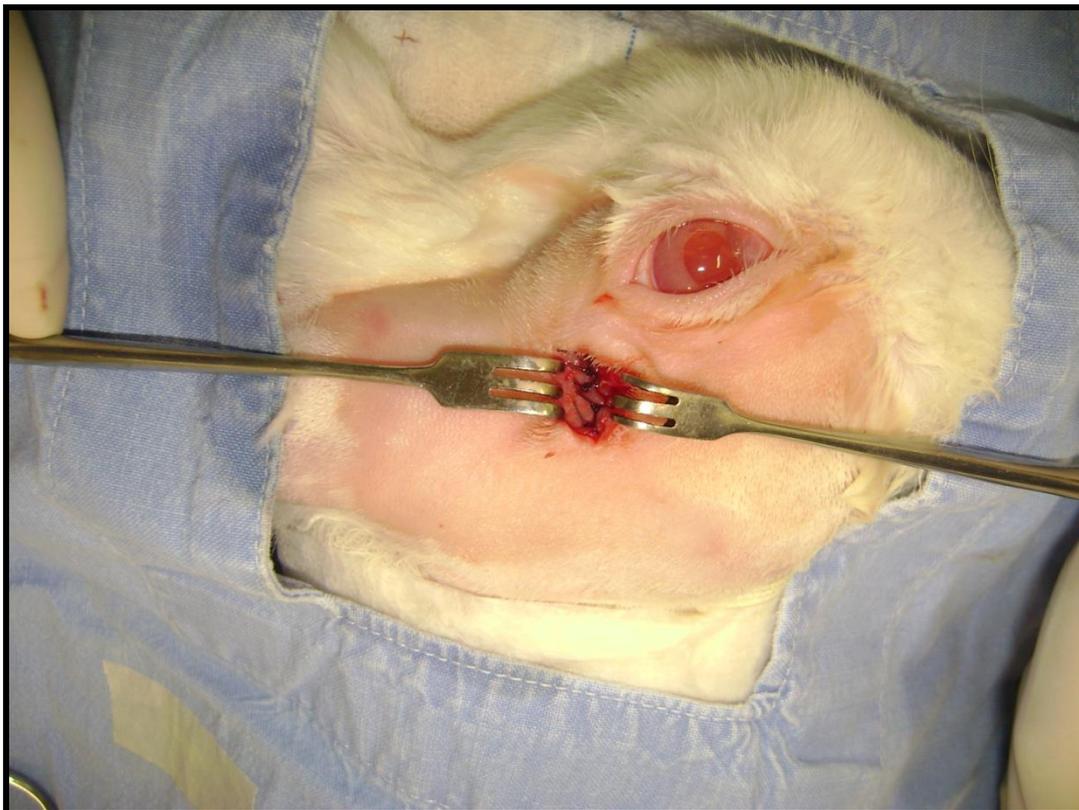


Figura 26: Sutura dos planos.



Figura 27: Sutura da pele.

5.7 PROTOCOLO DE INFILTRAÇÕES

Os animais foram sedados com Cetamina (15mg/kg) e midazolam (1mg/kg). Após constatada a sedação, foi realizada a antissepsia da articulação temporomandibular com digluconato de clorexidine 2% (Riohex, Laboratório Rioquímica ®). A ATM foi localizada através de palpação, sendo a articulação direita infiltrada com 0,5 UI/kg de GH (aproximadamente 0,3 ml), e a articulação esquerda infiltrada com a quantidade correspondente em mililitros de NaCl 0,9% (Figuras 28 e 29).



Figura 28: Preparo das seringas de NaCl 0,9% e rhGH para infiltração.



Figura 29: Palpação e infiltração do hormônio na articulação direita.

5.8 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA E BIÓPSIA

A morte dos animais foi conduzida com o animal tranqüilizado (conforme protocolo citado anteriormente) por overdose anestésica de propofol (10mg/kg) e posterior parada cardíaca com cloreto de potássio 10% (1ml/kg), ambos por via intravenosa. As articulações foram dissecadas e removidas em bloco através de osteotomia com broca esférica nº6, formão reto e martelo. Cada bloco de biópsia da amostra incluiu o côndilo mandibular. A peça cirúrgica foi fixada em formol tamponado a 10%.

5.9 ANÁLISE TOMOGRÁFICA

Os côneilos foram retirados do formol e posicionados em uma plataforma de isopor, onde 12 peças foram alinhadas em semi-círculo para a aquisição da imagem (Figuras 30 e 31). A primeira tomada foi realizada sem água, enquanto que a segunda tomada foi realizada com água no interior da plataforma, com o intuito de simular os tecidos moles, cobrindo todas as peças. Para facilitar a identificação dos côneilos na interpretação das imagens, um mini-implante foi posto ao lado da primeira peça da plataforma, deixando claro, desta forma, a ordem em que as peças foram posicionadas na mesma. O mesmo protocolo foi repetido 3 vezes, totalizando 36 côneilos. A aquisição da imagem dos 2 côneilos restantes foi realizada na mesma plataforma (com água e sem água), porém apenas com as 2 peças.

A interpretação das imagens foi realizada por 3 observadores cegos e calibrados sob as mesmas condições de iluminação através de 2 programas distintos: CS 3D Imaging Software® e Planmeca Romexis Viewer ®. Foi realizada a manipulação das imagens no sentido do longo eixo do côneilo para que os avaliadores pudessem visualizar o sentido sagital da peça para classificar de acordo com o escore estabelecido (Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37)(Tabela 2). Os dados dos escores foram preenchidos em ficha padrão (apêndice A).

A aquisição das imagens tomográficas foi realizada no aparelho Cone Beam Planmeca Pro Max, com parâmetros de 60kv, 20mA e 200 Voxel (Figura 38).

Tabela 2: Grau tomográfico da severidade da osteoartrite.

Análise Tomográfica do Côndilo Mandibular	Escore
Normal	0
Irregularidade leve na superfície articular	1
Irregularidade moderada na superfície articular	2
Formação de osteófitos	3
Alteração de contorno do côndilo	4

**Figura 30:** Inserção das peças cirúrgicas em uma plataforma de isopor.**Figura 31:** Plataforma posicionada para a aquisição de imagem.

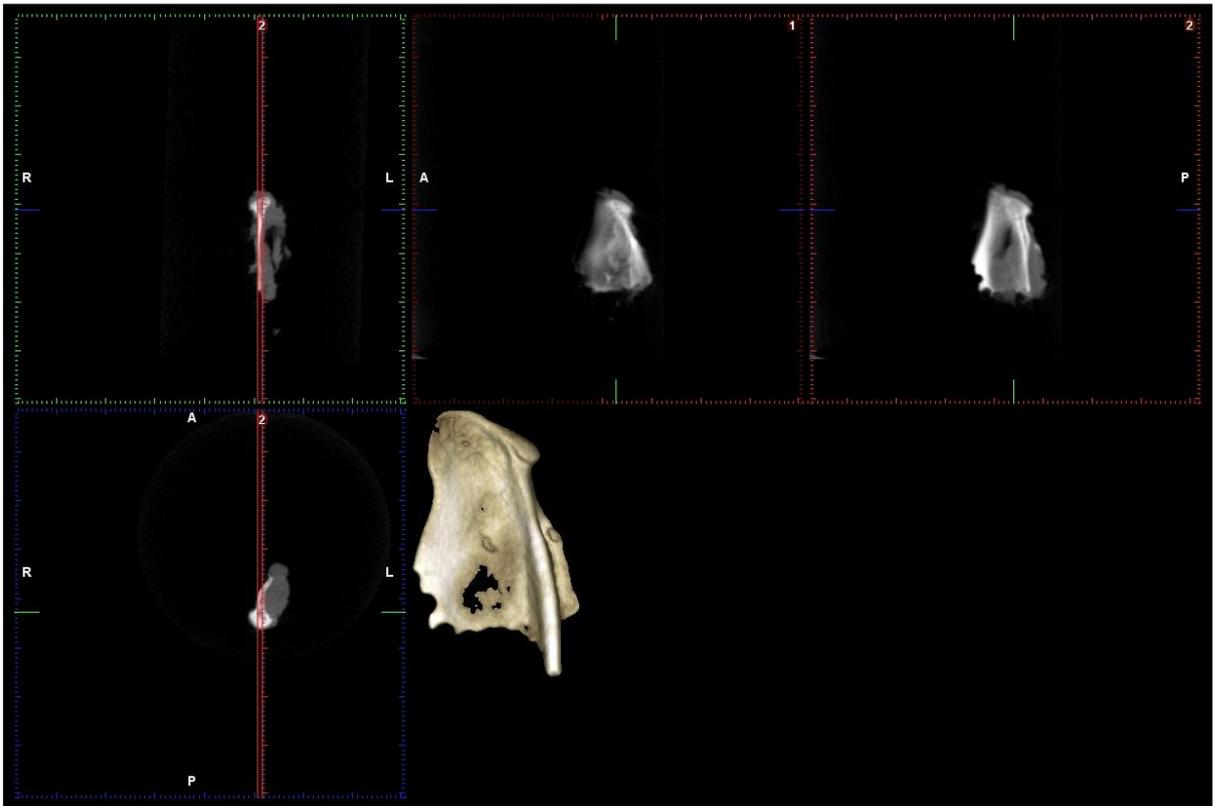


Figura 32: Imagem tomográfica de um côndilo com aparência normal (Planmeca Romexis Viewer ®).



Figura 33: Imagem tomográfica de uma irregularidade leve (CS 3D Imaging Software®).

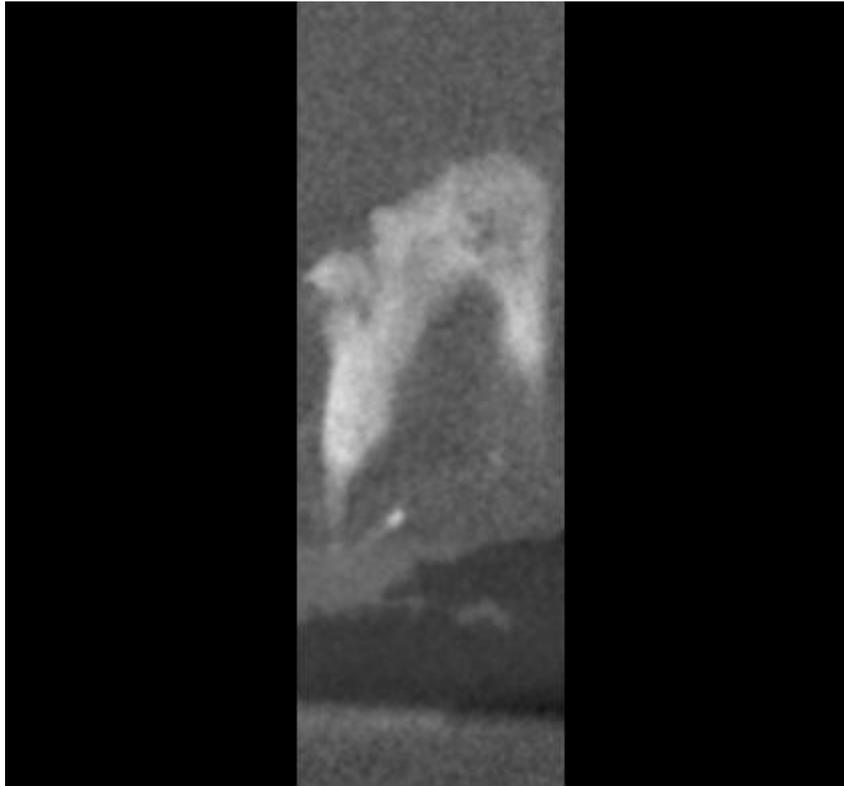


Figura 34: Imagem tomográfica de uma irregularidade severa (CS 3D Imaging Software®).



Figura 35: imagem tomográfica sugestiva de osteófito (CS 3D Imaging Software®).



Figura 36: Imagem tomográfica sugestiva de alteração de contorno condilar (CS 3D Imaging Software®).

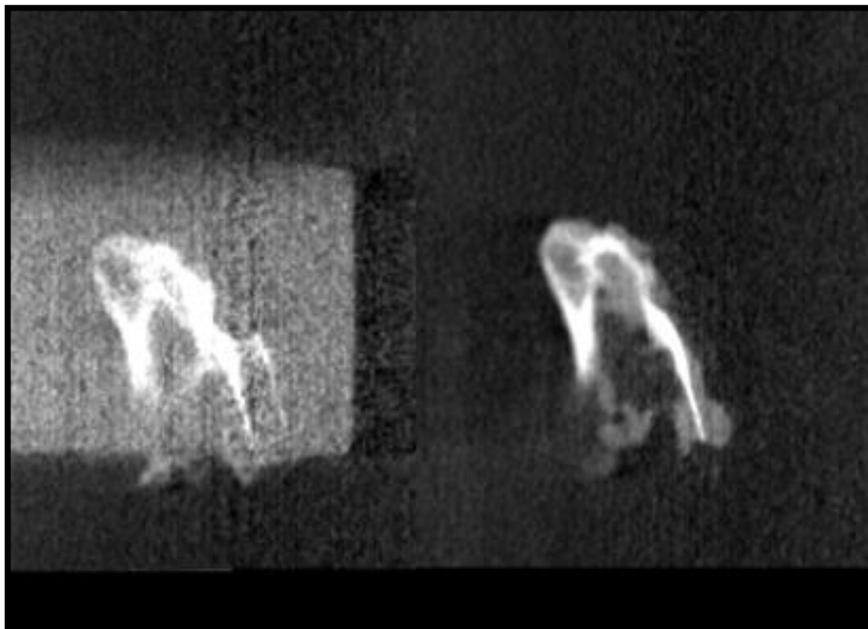


Figura 37: Imagem tomográfica com água e sem água, respectivamente (CS 3D Imaging Software®).



Figura 38: Aparelho Planmecca Pro Max.

5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As peças foram descalcificadas em Ácido Nítrico 10%, com trocas diárias da solução por 2 dias, para atingir uma consistência adequada para o corte. Após a descalcificação ocorreu o embebimento dos cêndilos em parafina, ficando as peças armazenadas em blocos próprios para os cortes. Secções de 5 µm de espessura foram realizados no micrótomo e corados com hematoxilina/eosina (HE). Para cada peça, 3 cortes escolhidos aleatoriamente foram selecionados para a aquisição das imagens no microscópio óptico em 4x e 10x.

As imagens foram avaliadas por 3 observadores cegos e calibrados quanto ao grau histológico de severidade da osteoartrite (Tabela 3), baseado nos critérios utilizados por Man *et al.* (2009)(Figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 44). Os dados foram preenchidos em ficha padrão (apêndice B).

O preparo das lâminas foi realizado na Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Tabela 3: Grau histológico da severidade da osteoartrite.

Critério da cartilagem articular	Escore
Normal	0
Irregularidades na superfície	1
Espessamento da cartilagem condilar	2
Adelgaçamento da cartilagem condilar	3
Fissura na fibrocartilagem do cêndilo	4
Perda total da cartilagem condilar	5

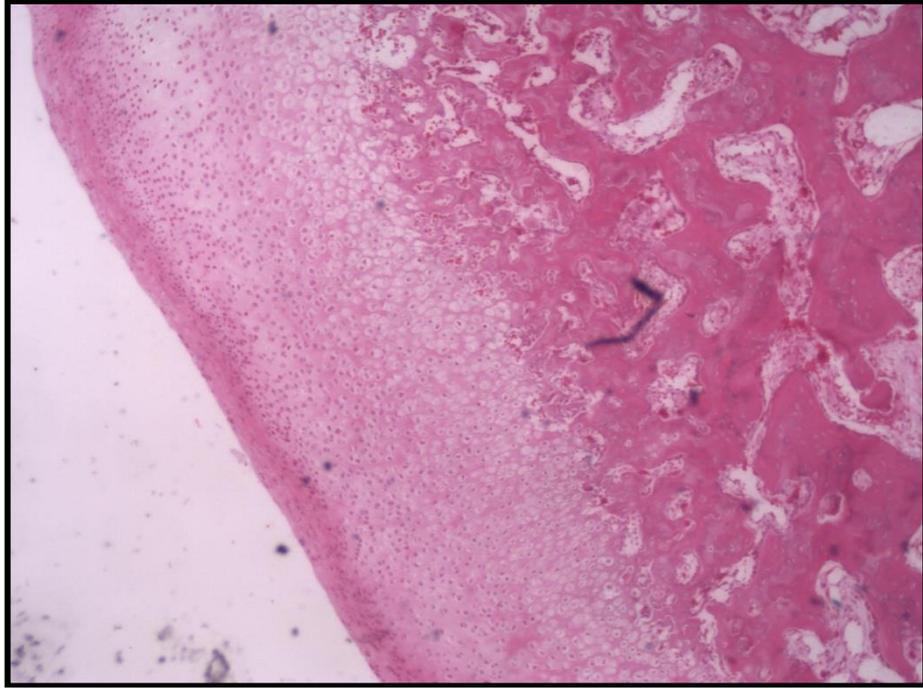


Figura 39: Côndilo normal – aumento de 4x (escore 0).

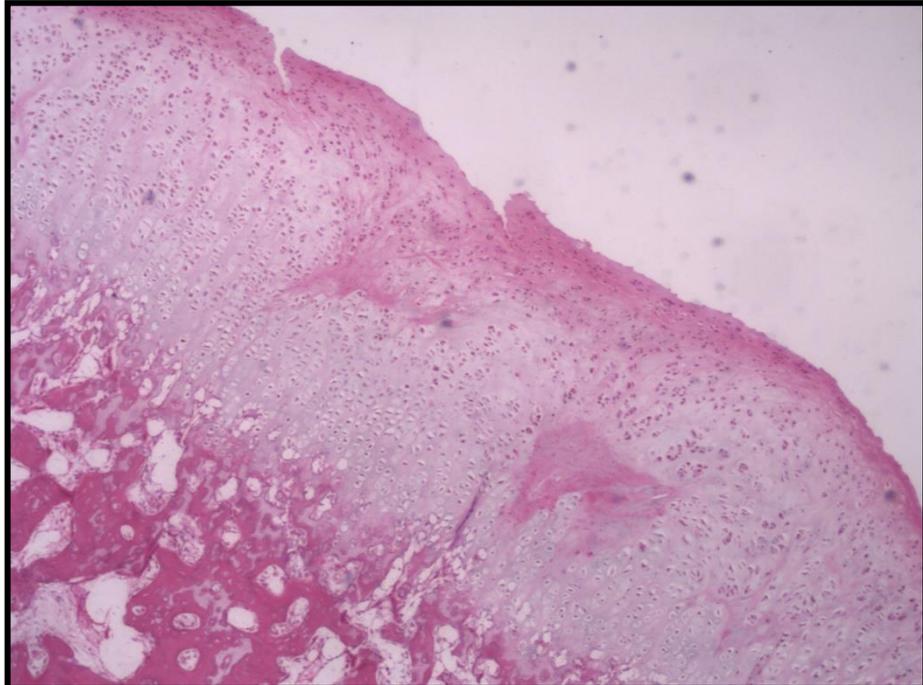


Figura 40: Irregularidades na superfície – aumento de 4x (escore 1).

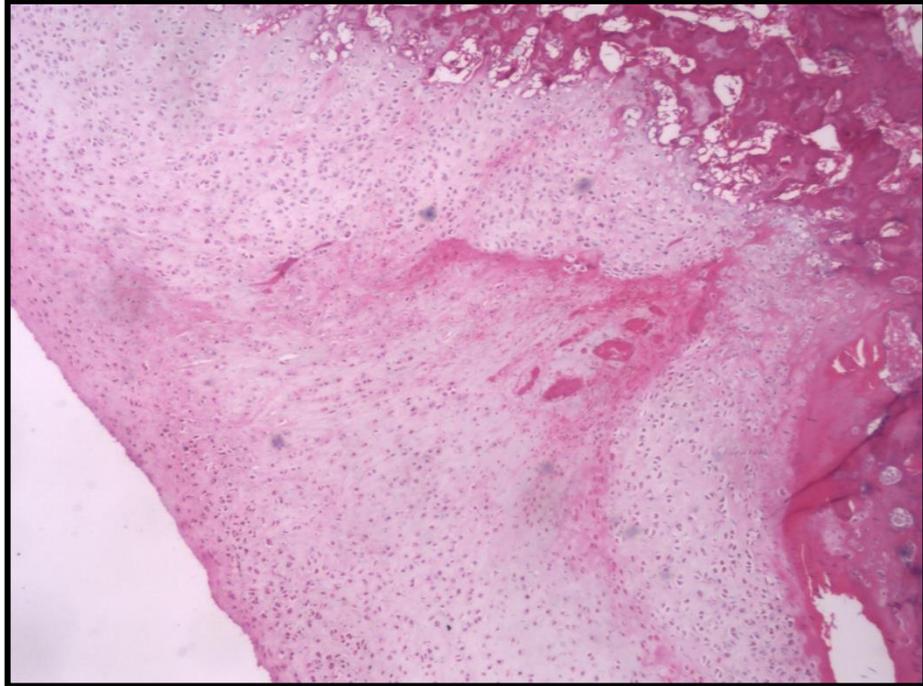


Figura 41: Espessamento da cartilagem condilar – aumento de 4x (escore 2).

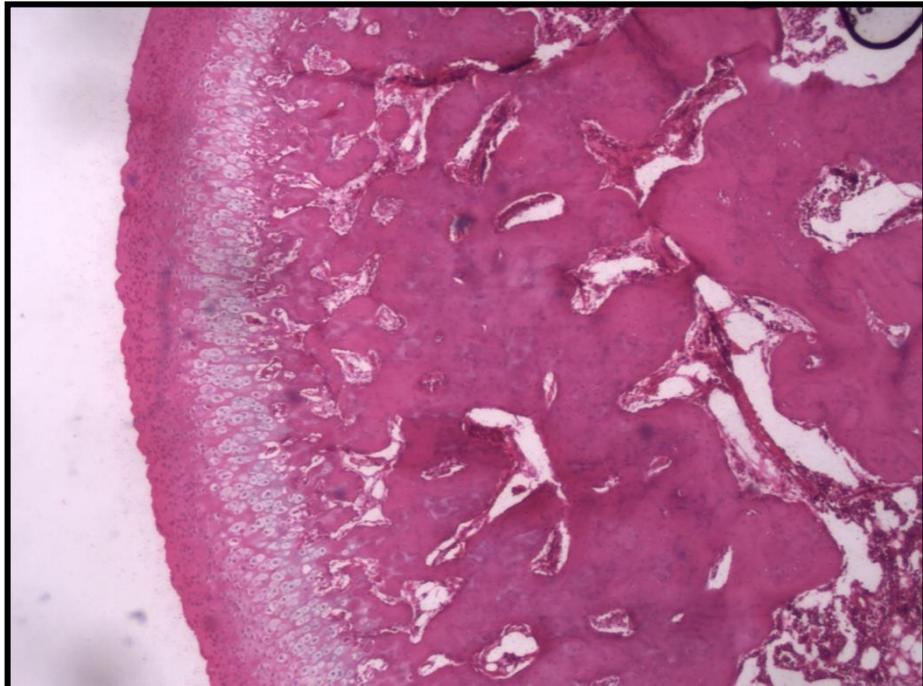


Figura 42: Adelgaçamento da cartilagem condilar – aumento de 4x (escore 3).

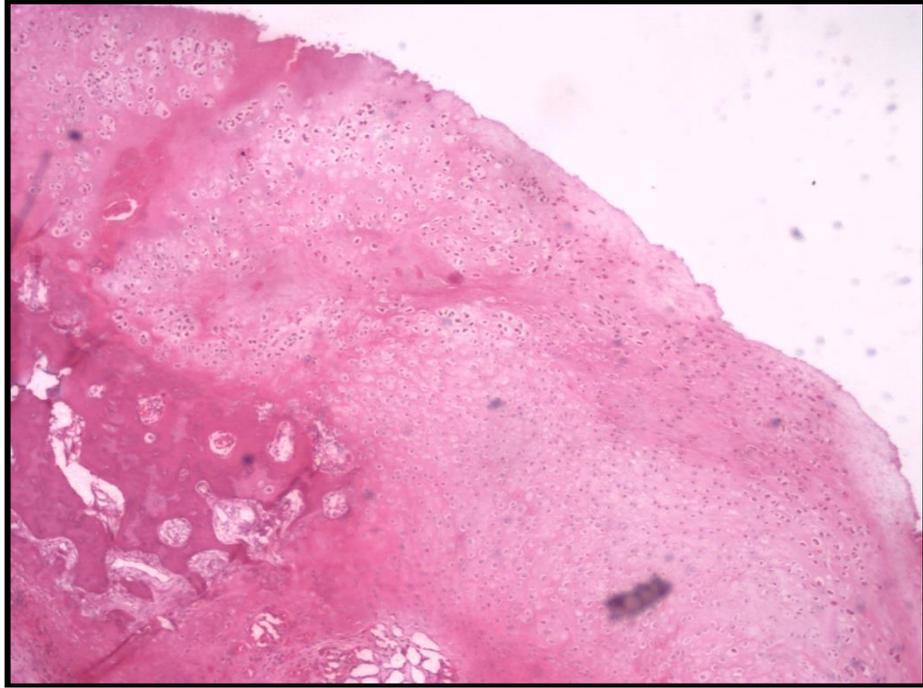


Figura 43: Fissura na fibrocartilagem do côndilo (escore 4).

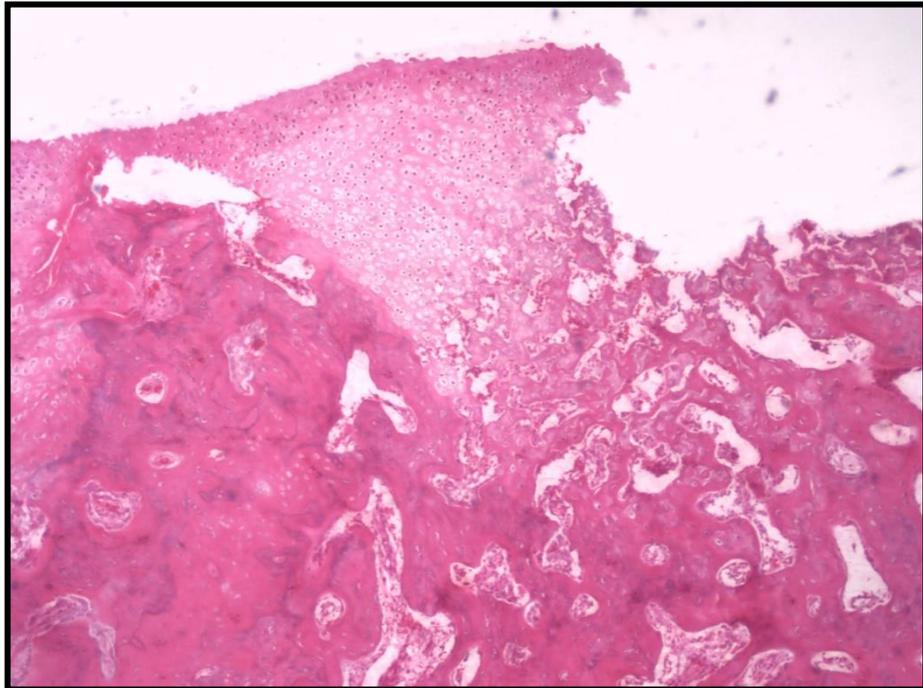


Figura 44: Perda total da cartilagem condilar (escore 5).

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS versão 18.0 para análise estatística. Foram descritos os escores pela mediana, o mínimo e o máximo e comparados entre grupos pelo teste de Kruskal Wallis. Foi realizada uma transformação por postos da variável e posteriormente realizada um teste post-hoc de Tukey para detectar entre que grupos existia a diferença. Para comparar os escores entre os lados, dentro dos grupos foi utilizado o teste de Wilcoxon. As variáveis peso e tempo cirurgico foram descritas pela média. Foi considerado um nível de significância de 5% para os testes realizados.

6 RESULTADOS

Na análise do exame de imagem, foram observadas diferenças de avaliação conforme o programa utilizado na observação. Nos grupos A, B e controle, os avaliadores classificaram a articulação direita (rhGH) com um maior grau de OA, porém sem significância estatística. No programa CS 3D Imaging Software® foi observado que as articulações tratadas com 3 infiltrações de NaCl 0,9% (ATM esquerda do grupo C) e o grupo controle obtiveram maiores índices de osteoartrite com significância estatística ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4.- Tabela das comparações dos valores obtidos na Análise Tomográfica do Côndilo Mandibular entre e dentro dos grupos.

Tomografia	A		B		C		Controle		P*	P*
	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda
CS 3D Imaging Software® com água	1 (0-2)	0 (0-1)	3 (0-3)	0 (0-1)	1 (1-2)	2 (1-3)	2 (0-2)	2 (1-3)	0,266	0,011
P**	0,083		0,063		0,317		0,157			
CS 3D Imaging Software® sem água	1 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-3)	2 (0-2)	2 (1-3)	0,860	0,373
P**	0,999		0,564		0,999		0,655			
Planmeca Romexis Viewer® com água	1 (0-2)	0 (0-2)	2 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-3)	4 (0-4)	1 (0-1)	0,579	0,383
P**	0,083		0,157		0,655		0,157			
Planmeca Romexis Viewer® sem água	1 (0-2)	1 (0-2)	2 (1-2)	1 (0-1)	4 (1-4)	1 (0-2)	2 (0-2)	0 (0-0)	0,189	0,109
P**	0,317		0,102		0,109		0,157			

Os dados são apresentados pela mediana (mínimo-máximo)

* Valor P obtido na comparação entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis

**Valor P obtido na comparação entre lado direito e esquerdo (dentro dos grupos) pelo teste de Wilcoxon

Na análise histológica não houve diferença estatística entre os grupos tratados com rhGH, NaCl 0,9% e controle (Tabela 5) independente do número de infiltrações.

Tabela 5.- Tabela das comparações dos valores obtidos no critério da cartilagem articular entre e dentro dos grupos.

	A		B		C		Controle		P*	P*
	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda
Histologia	2 (2-4)	1 (0-5)	2 (2-3)	2 (1-2)	2 (1-5)	2 (1-3)	3 (2-3)	2 (0-3)	0,563	0,968
P**	0,683		0,083		0,705		0,180			

Os dados são apresentados pela mediana (mínimo-máximo)

* Valor P obtido na comparação entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis

**Valor P obtido na comparação entre lado direito e esquerdo (dentro dos grupos) pelo teste de Wilcoxon

Na análise qualitativa dos cortes histológicos, podemos observar que no grupo A (1 infiltração) foi visualizado uma maior celularidade e maior espessura de cartilagem na ATM tratada com hormônio. A articulação tratada com NaCl (0,9%) também apresentou uma maior reparo em relação ao grupo controle, porém menor que no grupo do rhGH (Figura 45).

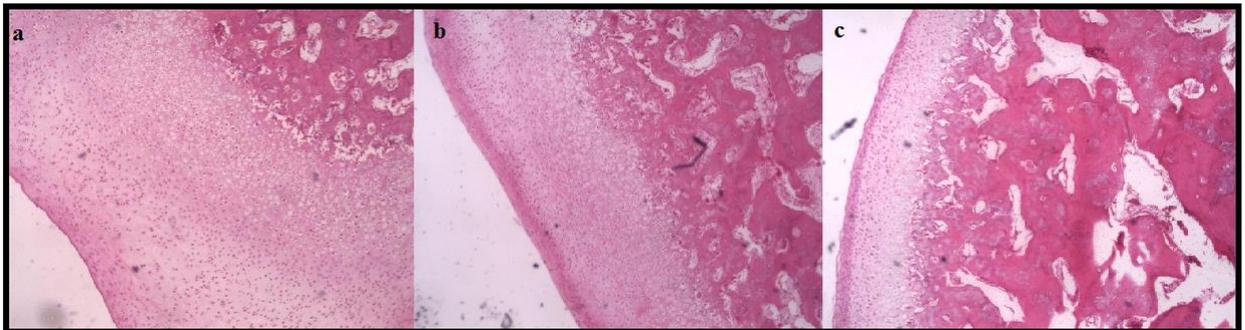


Figura 45: Maior espessura e celularidade no grupo rhGH (a) em relação aos grupos NaCl 0,9% (b) e controle (c).

No grupo B (2 infiltrações), os dois côneilos tratados apresentaram celularidade e espessura maior que no coelho controle, porém sem diferenças entre os grupos de tratamento (Figura 46).

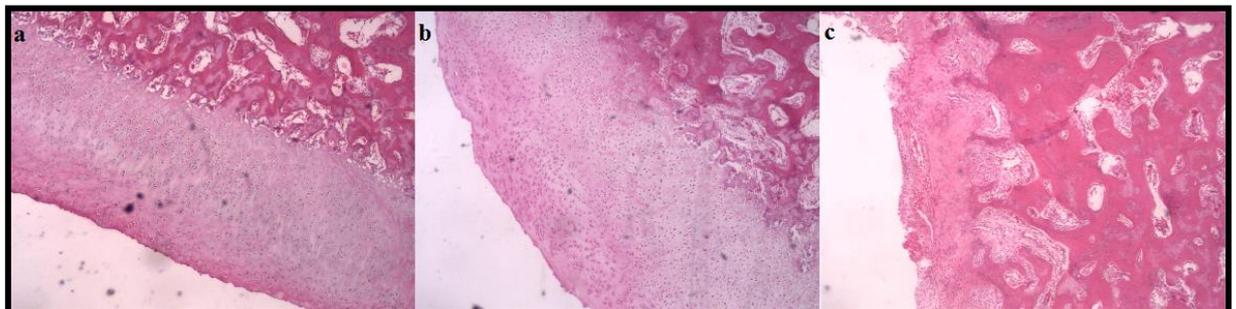


Figura 46: Maior espessura e celularidade nos grupos rhGH (a) e NaCl 0,9% (b) em relação ao grupo controle (c).

No grupo C (3 infiltrações) não foi encontrado similaridade nas imagens, foram observados cortes com variados graus de celularidade e espessura de cartilagem nos cortes dos côndilos direito, esquerdo e controle.

Em relação ao peso dos animais, a maioria dos coelhos aumentou ou manteve o peso. As cobaias não tratadas (grupo controle) dos grupos A, B e C apresentaram perda de peso, mas mantiveram a função (Tabela 6).

Tabela 6: Peso pré-cirúrgico e no momento da eutanásia dos animais

	Peso Inicial	Peso Final
Grupo A	2,5 kg	2,5 kg
	2,7 kg	2,9 kg
	2,6 kg	2,8 kg
	2,7 kg	2,7 kg
	3,1 kg	3,1 kg
<i>controle grupo A</i>	2,8 kg	2,7 kg
Grupo B	2,5 kg	2,5 kg
	2,3 kg	2,5 kg
	2,5 kg	2,7 kg
	2,7 kg	2,7 kg
	2,6 kg	2,7 kg
<i>controle grupo B</i>	2,8 kg	2,7kg
Grupo C	2,6 kg	2,6 kg
	3,0 kg	3,2 kg
	2,8 kg	2,9 kg
	2,6 kg	2,9 kg
	2,9 kg	2,9 kg
Controle grupo C	2,5 kg	2,3 kg

Os escores tomográficos estão descritos nas figuras 47 a 54. Os escores histológicos estão descritos nas figuras 55 e 56.

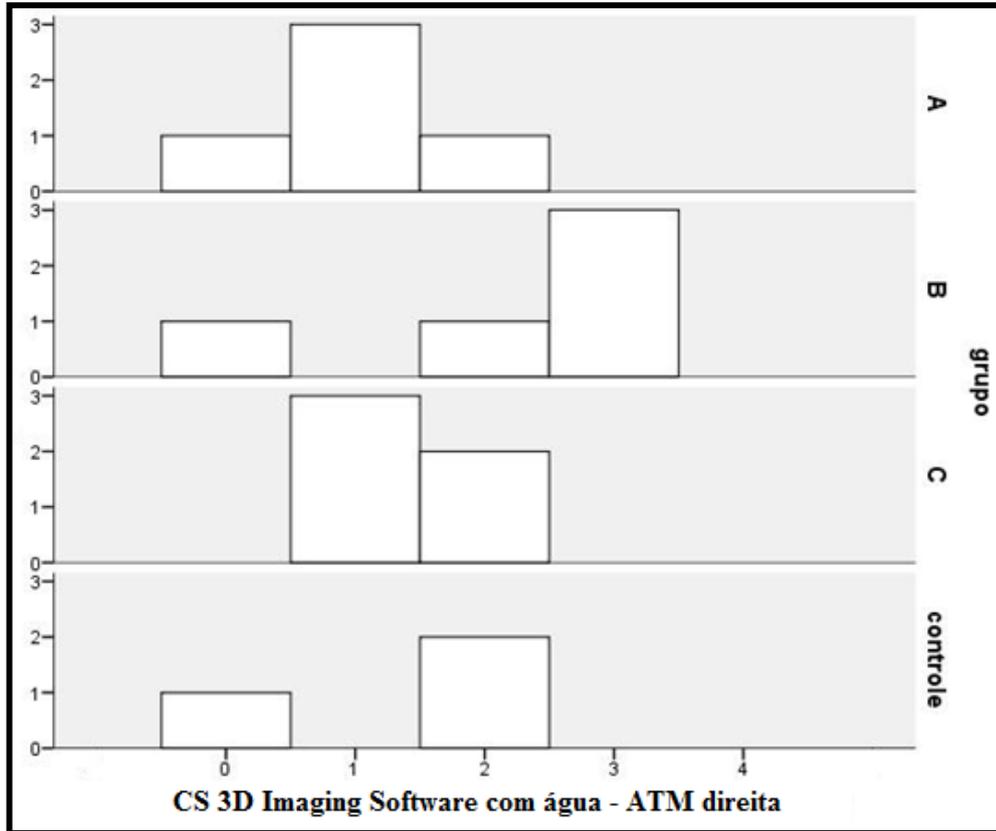


Figura 47- Gráfico TC ATM direita com água (CS 3D Imaging Software).

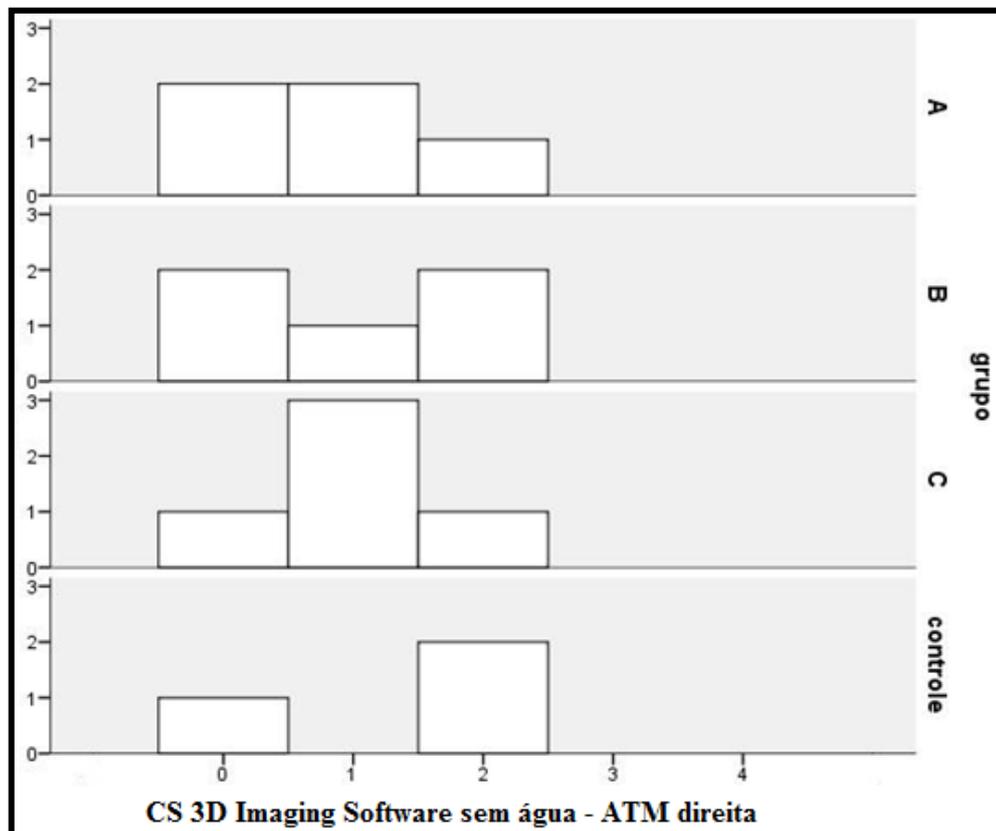


Figura 48: Gráfico TC ATM direita sem água (CS 3D Imaging Software).

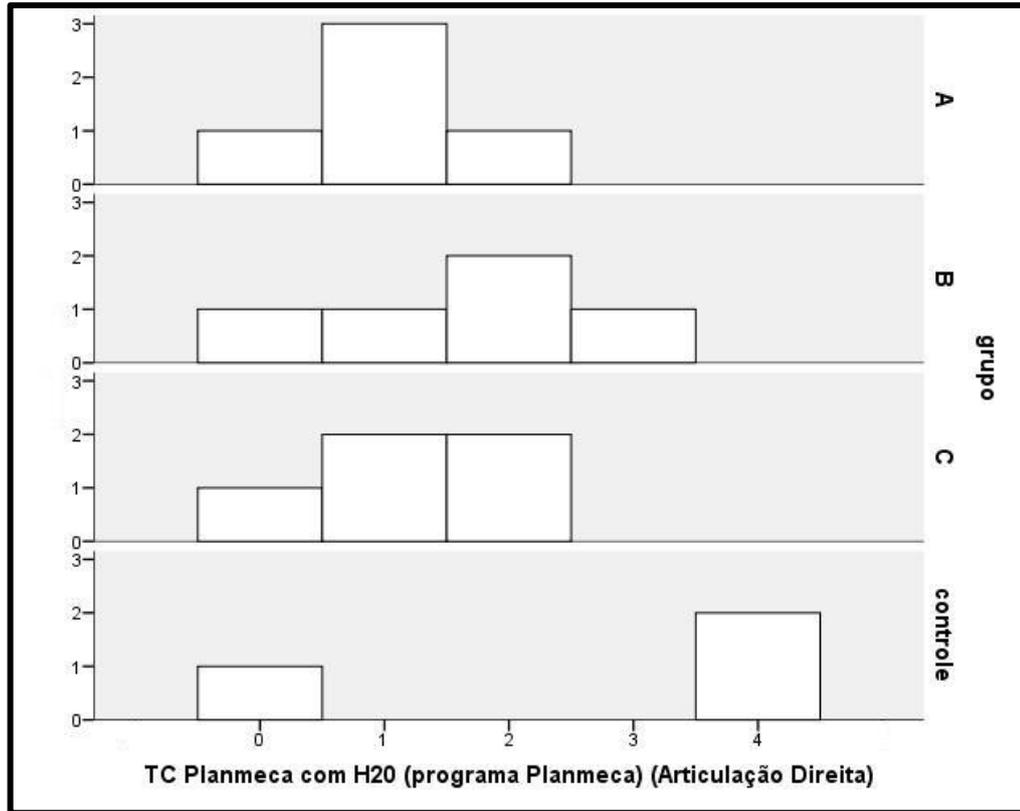


Figura 49: Gráfico TC ATM direita com água (Planmeca Romexis Viewer).

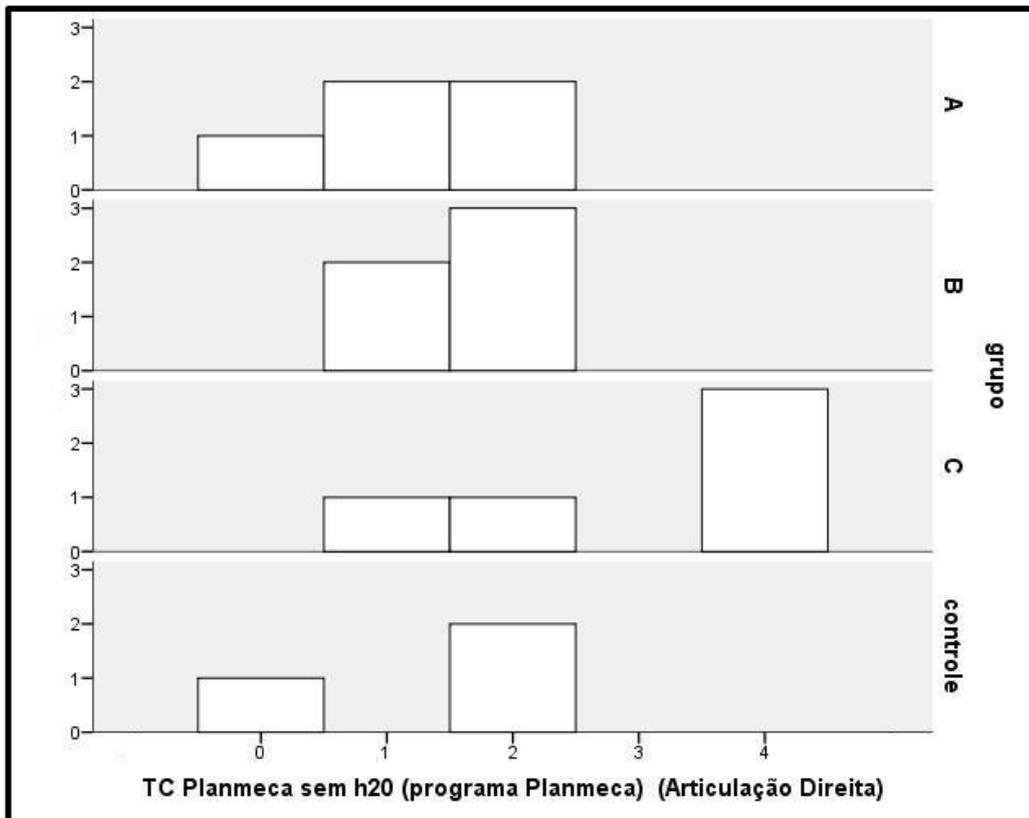


Figura 50 – Gráfico TC ATM direita sem água (Planmeca Romexis Viewer).

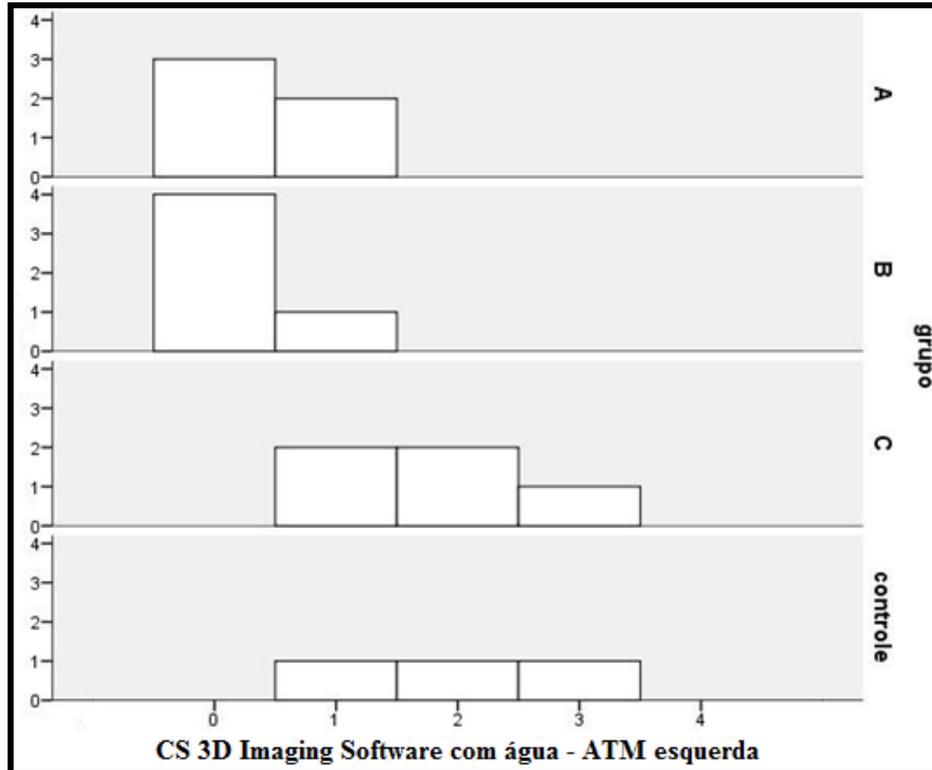


Figura 51: Gráfico TC ATM esquerda com água (CS 3D Imaging Software).

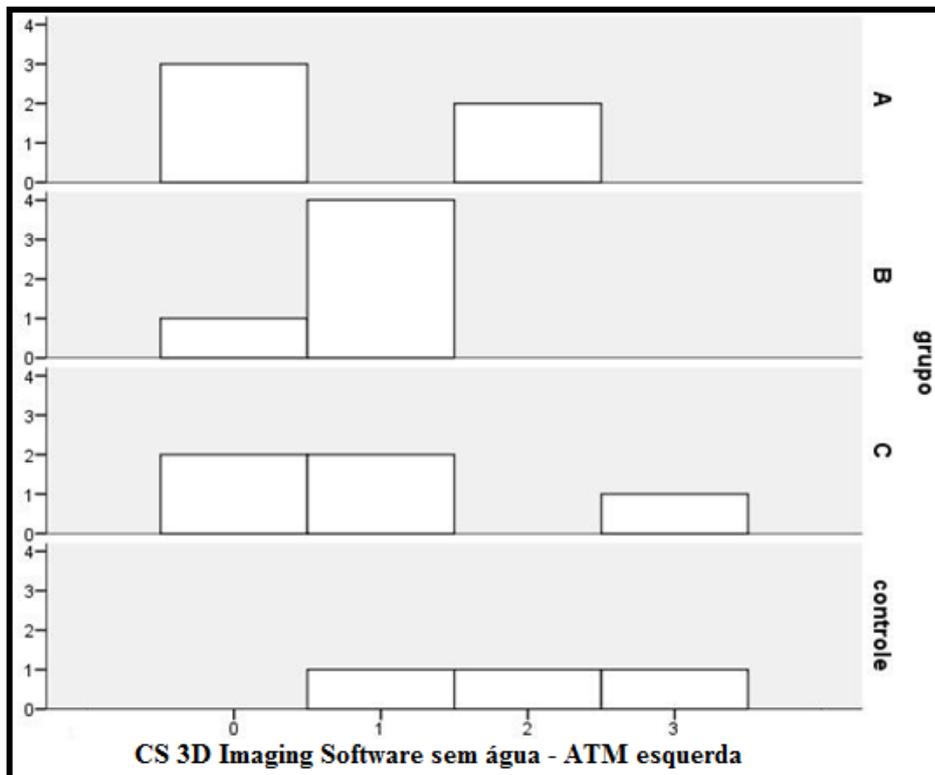


Figura 52: Gráfico TC ATM esquerda sem água (CS 3D Imaging Software).

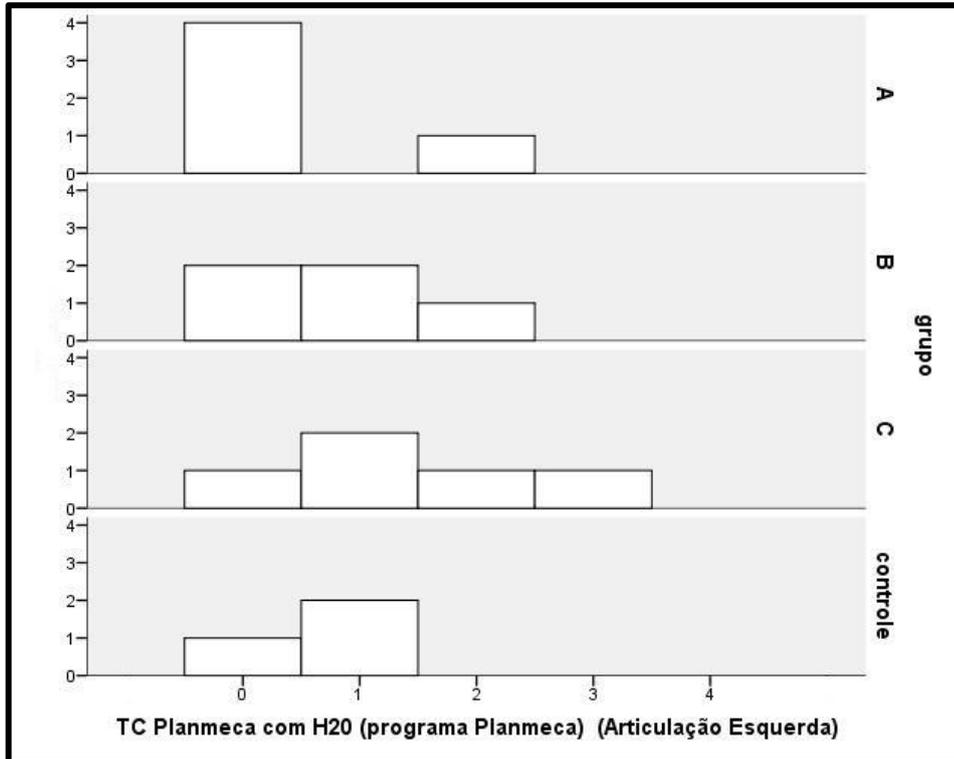


Figura 53: Gráfico TC ATM esquerda com água (Planmeca Romexis Viewer).

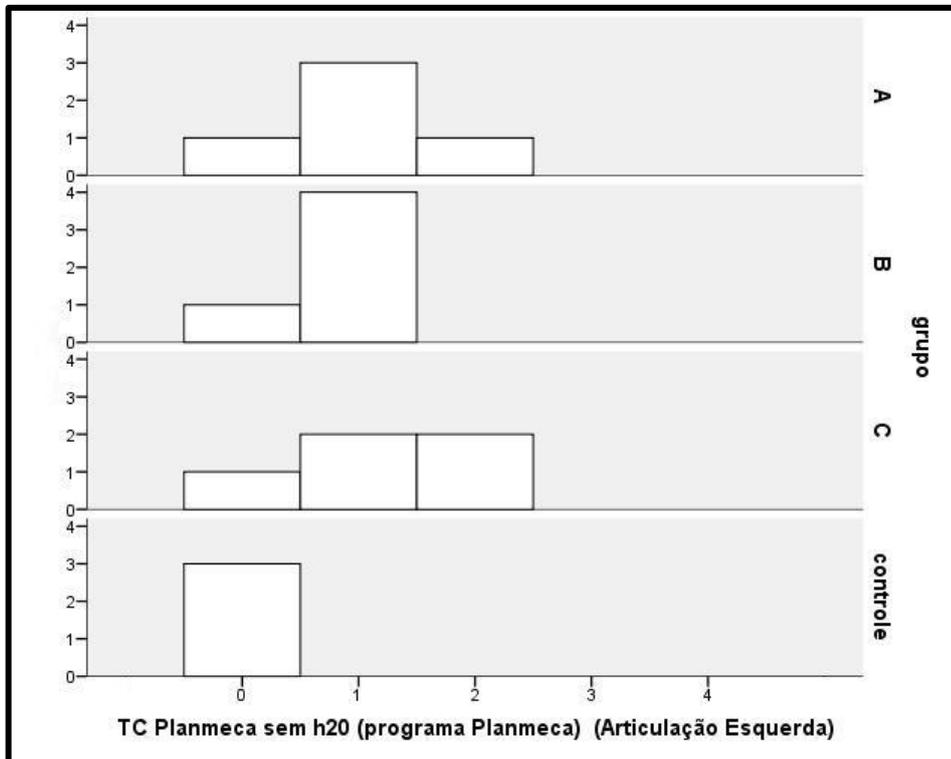


Figura 54: Gráfico TC ATM esquerda sem água (Planmeca Romexis Viewer).

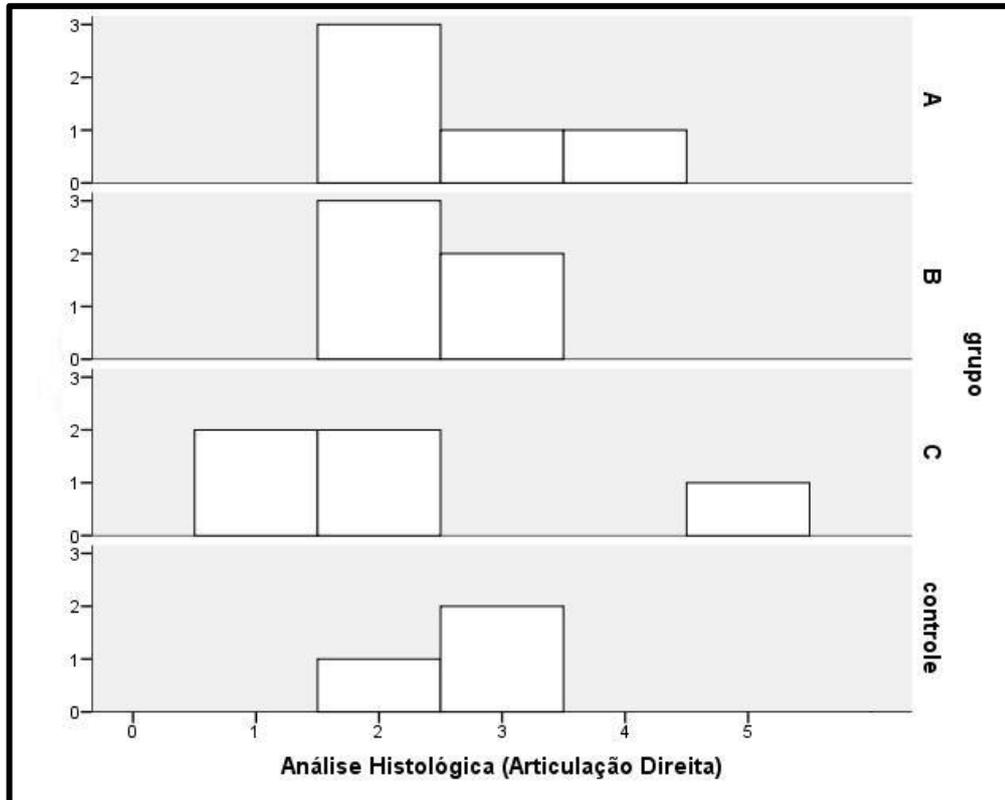


Figura 55: Gráfico dos escores da análise histológica na ATM direita.



Figura 56: Gráfico dos escores da análise histológica da ATM esquerda.

7 DISCUSSÃO

A ação do hormônio do crescimento tem sido estudada em várias articulações, demonstrando bons resultados (CHRISMAN, 1975; HALBRECHT *et al.*, 1990 e BAIL *et al.*, 2003). Na ATM, existem uma série de estudos com a aplicação intra-articular de fatores de crescimento demonstrando boa capacidade de regeneração cartilaginosa dos espécimes (MAN *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2002 e TAKAFUJI *et al.* 2007), porém não há relato da utilização de GH na articulação temporomandibular em experimento *in vivo*. Livne *et al.* (1997) demonstraram *in vitro*, que o GH adicionado a uma cultura de côndilos mandibulares com sinais de OA, apresentaram proliferação de células, maior síntese de proteoglicanos e possibilidade de melhor mineralização.

No presente estudo, a análise das imagens histológicas não demonstrou diferença estatística quanto ao grau de severidade da osteoartrite com a utilização do rhGH, enquanto outros trabalhos apresentaram bons resultados, como nos trabalhos de Man *et al.* (2009), que constataram o efeito protetor do TGF- β na superfície articular, e Suzuki *et al.* (2002), onde os autores observaram um completo reparo cartilaginoso da cavidade com BMP-2.

Na análise qualitativa das imagens, pode se observar um aumento da celularidade e espessura da cartilagem quando comparado a um padrão normal nos grupos A e B, sendo o hormônio do crescimento o responsável no primeiro grupo, e o hormônio e o soro fisiológico no segundo. Chrisman (1975) demonstrou também essa característica regenerativa nos defeitos ósseos, onde observaram um maior

número de células na cartilagem patelar de coelhos tratados com GH. Halbrecht *et al.* (1990), observaram uma maior conteúdo de proteoglicanos e uma tendência de cartilagem mais espessa e rígida em relação ao grupo controle em análise do côndilo femoral com osteoartrite induzida.

O fato do espessamento da cartilagem articular ser um dos graus de osteoartrite cria um fenômeno histológico no estudo, onde é difícil diferenciar um espessamento devido ao trauma osso /osso de um espessamento pela neoformação tecidual regenerativa. Um fator que ajuda a discernir este imbróglio é a celularidade presente e a constatação de fendas ou fissuras articulares. Em áreas com espessamento regular e sem cavidades ou fissuras é possível acreditar que houve ação regenerativa da infiltração. Em áreas espessas com formação de fendas e cavidades é presumível três raciocínios: a regeneração ainda não alcançou seu estágio final e ainda possui áreas osteoartíticas; a infiltração gerou uma nova proliferação celular, mas sem frear a progressão da osteoartrite, independente do tempo; ou o espessamento é devido apenas a um estágio mais avançado da OA. Mais estudos deveriam ser realizados para elucidar esta característica.

Este fenômeno histológico pode ter gerado a grande variação de escores na avaliação da superfície articular, onde os avaliadores definiam o espessamento como um fator exclusivo da osteoartrite, baseado no trabalho de Man *et al.* (2009). Porém quando analisamos as imagens dos grupos e comparamos com seus controles, podemos observar que há uma diferença de volume e qualidade celular do tecido cartilaginoso, o que podemos considerar como efeito dos tratamentos.

Em relação a avaliação das imagens tomográficas, o presente estudo apresentou diferentes escores para imagens similares devido ao programa e a

presença ou não de água na aquisição da imagem. A presença da água simula tecidos moles porém dificulta a interpretação das imagens. As articulações infiltradas com solução salina por 3 semanas e o grupo controle apresentaram graus mais severos de osteoartrite quando comparados às articulações infiltradas por 1 e 2 semanas, o que pode significar que a degeneração articular foi mais presente nestes grupos. Para Cevidanez *et al.* (2010), o grau de severidade de osteoartrite constatada no exame de imagem é coerente e proporcional a intensidade e duração da dor dos pacientes, o que contrasta com o estudo de Lee *et al.* (2011) que relatam não ter encontrado relação estatística entre as imagens tomográficas e a sintomatologia dos pacientes, dificultando o prognóstico da patologia. Para Nitzan (2003), a inconsistência entre os sintomas clínicos e o exame de imagem, onde o exame clínico pode diagnosticar uma patologia severa enquanto a imagem não aponta nada, e vice-versa, é característica da osteoartrite. Esta situação paradoxal realça a necessidade de exames bioquímicos que indiquem o estágio da OA, para a melhor escolha terapêutica.

Outro ponto a ser observado, foi a não anquilose das articulações operadas no período do estudo. O fato do GH não ter causado a união das estruturas ósseas foi um fator positivo. Os animais operados que não receberam nenhum tipo de infiltração (controle) apresentaram uma superfície articular mais delgada e um estágio mais avançado de OA, estando mais próximos de uma possível anquilose que as articulações tratadas com hormônio. Outro fator que embasa esse pensamento é o peso dos animais antes da cirurgia e no momento da eutanásia. Os animais mantiveram função mastigatória durante o período pós-operatório e os coelhos do grupo controle apresentaram peso menor que o inicial, enquanto que os animais tratados apresentaram o mesmo peso ou um ganho de até 0,3 kg, o que

pode significar um maior desconforto dos animais do grupo controle, resultando em limitação de função.

A dose utilizada no trabalho também é um dado a ser mais explorado nas futuras pesquisas, uma vez que em 21 e 28 dias as articulações tratadas com rhGH apresentaram uma maior celularidade e espessura de cartilagem quando comparados ao grupo controle, porém em 35 dias este dado não se confirmou. Esse raciocínio leva a crer que repetidas doses do hormônio podem não ser efetivos no tratamento da patologia, o que é contraditório em relação à outros estudos que tiveram dose e frequência maior de aplicação e geraram bons resultados (CHRISMAN, 1975; HALBRECHT *et al.*, 1990 e BAIL *et al.*, 2003).

A via de acesso é relevante se considerarmos a ação sistêmica do hormônio. A aplicação intra-articular elimina ou reduz esse fator, considerando que o GH permanece em contato direto com as superfícies articulares, podendo teoricamente otimizar os resultados do tratamento. O fato dos controles A e B terem apresentado uma celularidade menor pode indicar que esse fator sistêmico foi menor com a aplicação intra-articular.

No presente estudo foi infiltrado semanalmente 0,5 UI/kg (aproximadamente 0,5 mg por coelhos) de rhGH por semana. Outros estudos tiveram diferentes doses de infiltração por tempos distintos. Chrisman (1975) aplicou intra-articularmente 3 mg de hormônio do crescimento 2 vezes por semana por 6 meses e 3 mg aplicado 3 vezes por semana durante 4 semanas. Halbrecht *et al.* (1990) aplicaram via intramuscular 1mg/kg (aproximadamente 3 mg) de hormônio 5 vezes por semana durante 4 semanas. Bail *et al.* (2003) utilizaram 100 µg, aplicados via subcutânea, de hormônio diariamente por 4 e por 6 semanas. Kim *et al.* (2010) também utilizaram a

dosagem de 3 mg por animal, aplicados intra-articularmente 1 vez por semana por 4 semanas. A pequena quantidade de estudos dificulta a padronização do protocolo terapêutico, sendo indicado mais estudos para elucidar o tema.

8 CONCLUSÕES

No programa CS 3D Imaging Software® foi observado que as articulações tratadas com 3 infiltrações de NaCl 0,9% (ATM esquerda do grupo C) e o grupo controle obtiveram maiores índices de osteoartrite com significância estatística ($p < 0,05$);

Não houve diferença estatisticamente significativa relativa ao grau de osteoartrite analisada histologicamente entre os grupos;

As articulações tratadas com rhGH apresentaram maior celularidade e espessura de cartilagem quando comparados à articulação infiltrada com soro fisiológico e grupo controle em 21 dias;

As articulações tratadas com rhGH e NaCl (0,9%) apresentaram maior celularidade que o grupo controle em 28 dias.

Não foi observada anquilose em nenhum caso até 35 dias.

Os resultados demonstraram que o hormônio do crescimento pode ser utilizado como tratamento da osteoartrite, porém mais estudos devem ser realizados para a determinação do protocolo adequado.

REFERÊNCIAS

ALEXIOU, K. E.; STAMATAKIS, H. C.; TSIKLAKIS, K. Evaluation of the severity of temporomandibular joint osteoarthritic changes related to age using cone beam computed tomography. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 38, n. 3, p. 141-147, 2009.

ALI, A. M.; SHARAWY, M. Histochemical and immunohistochemical studies of the effects of experimental anterior disc displacement on sulfated glycosaminoglycans, hyaluronic acid, and link protein of the rabbit craniomandibular joint. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 54, n. 8, p. 992-1004, 1996.

AVERY, J. K. **Fundamentos de histologia e embriologia bucal : uma abordagem clínica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 200 p.

BAIL, H.; KLEIN, P.; KOLBECK, S.; KRUMMREY, G.; WEILER, A.; SCHMIDMAIER, G.; HAAS, N. P.; RASCHKE, M. J. Systemic application of growth hormone enhances the early healing phase of osteochondral defects: a preliminary study in micropigs. **Bone**. v. 32, n. 5, p. 457-467, 2003.

BAIL, H.J.; RASCHKE, M.J.; KOLBECK, S.; KRUMMREY, G.; WINDHAGEN, H. J.; WEILER, A.; RAUN, K.; MOSEKILDE, L.; HAAS, N. P. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. **Bone**., v. 30, n.1, p. 117-24, 2002.

BARGHAN, S.; TETRADIS, S.; MALLYA, S. Application of cone beam computed tomography for assessment of the temporomandibular joints. **Aust Dent J**, v.57, n. 1, p. 109-118, 2012.

BAS, B.; YILMAZ, N.; GÖKCE, E.; AKAN, H. Diagnostic value of ultrasonography in temporomandibular disorders. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 69, n. 5, p. 1304-1310, 2011.

BHASKAR, S. N. **Histologia e Embriologia Oral de Orban**. 10ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1989. 501 p.

CEVIDANES, L. H.; HAJATI, A. K.; PANIAGUA, B.; LIM, P. F.; WALKER, D. G. PALCONET, G.; NACKLEY, A. G.; STYNER, M.; LUDLOW, J. B.; ZHU, H.; PHILLIPS, C. Quantification of condylar resorption in temporomandibular joint osteoarthritis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.110, n. 1, p. 110-117, 2010.

CHRISMAN, O. D. The effect of growth hormone on established cartilage lesions. A presidential address to the Association of Bone and Joint Surgeons, 1974. **Clin Orthop Relat Res**, v.107, p. 232-238, 1975.

DAHLGREN, J. Metabolic benefits of growth hormone therapy in idiopathic short stature. **Horm Res Paediatr**, v.76, n.3, p. 56-58, 2011.

DE BONT, L.G.; DIJKGRAAF, L. C. STEGENGA, B. Epidemiology and natural progression of articular temporomandibular disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.. 83, n. 1, p. 72-76, 1997.

DEODATI, A.; CIANFARANI, S. Impact of growth hormone therapy on adult height of children with idiopathic short stature: systematic review. **BMJ**. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/342/bmj.c7157.pdf%2Bhtml>

DERVIS, E.; DERSIS, E. The prevalence of temporomandibular disorders in patients with psoriasis with or without psoriatic arthritis. **J Oral Rehabil**, v. 32, n.11, p. 786-793, 2005.

DUBRUL, E. L. **Anatomia Oral de Sicher e Dubrul**. 8ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1991. 390 p.

ELIJAH, I. E.; BRANSKI, L. K.; FINNERTY, C. C.; HERNDON, D. N. The GH/IGF-1 system in critical illness. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.25, n. 5, p. 759-767, 2011.

ERIKSEN, E. F.; KASSEM, M. LANGDAHL, B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodelling. **Eur J Clin Invest**, v.26, n.7, p. 525-534, 1996.

FIGUN, M. E.; GARINO, R. R. **Anatomia odontológica funcional e aplicada**. São Paulo: Panamericana; 1989. 658 p.

GELATO, M.; MCNURLAN, M.; FREEDLAND, E. Role of recombinant human growth hormone in HIV-associated wasting and cachexia: pathophysiology and rationale for treatment. **Clin Ther**, v.29, n. 11, p. 2269-2288, 2007.

GRAY, H. **Tratado de anatomia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara; 1946. 810 p.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. 831p.

HALBRECHT, J.; CARLSTEDT, C. A.; PARSONS, J. R.; GRANDE, D. A. The influence of growth hormone on the reversibility of articular cartilage degeneration in rabbits. **Clin Orthop Relat Res**, v. 259, p. 2455-255, 1990.

HUSSAIN, A. M.; PACKOTA, G.; MAJOR, P. W; FLORES-MIR, C. Role of different imaging modalities in assessment of temporomandibular joint erosions and osteophytes: a systematic review. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 37, n. 2, p. 63-71, 2008.

ISAKSSON, O. G. P.; OHLSSON, C.; NILSSON, A.; ISGAARD, J.; LINDAHL, A. Regulation of cartilage growth by growth hormone and isuline-like growth factor I, **Pediatr Nephrol**, v.5, p. 451-453, 1991.

ISBERG, A. **Disfunção da articulação temporomandibular: Um guia para o clínico**. São Paulo: Artes Médicas; 2005. 204p.

IWASAKI, H.; KUBO, H.; HARADA, M.; NISHITANI, H. Temporomandibular joint and 3.0 T pseudodynamic magnetic resonance imaging. Part 1: evaluation of condylar and disc dysfunction. **Dentomaxillofac radiol**, v. 39, n. 8, p. 475-485, 2010.

KIM, S. B.; KWON, D. R.; KWAK, H.; SHIN, Y. B.; HAN, H.; LEE, J. H.; CHOI, S. H. Intra-articular Injection of Growth Hormone and Hyaluronic Acid in Rabbit Model of Collagenase-induced Osteoarthritis. **J Korean Med Sci**, v. 25, p. 776-780, 2010.

KOBAYASHI, R.; UTSUNOMIYA, T.; YAMAMOTO, H.; NAGURA, H. Ankylosis of the temporomandibular joint caused by rheumatoid arthritis: a pathological study and review. **J Oral Sci**, v. 43, n. 2, p. 97-101, 2001.

KOLBECK, S.; BAIL, H.; SCHMIDMAIER, G.; ALQUIZA, M.; RAUN, K. KAPPELGARD, A.; FLYVBJERG, A.; HAAS, N.; RASCHKE, M. Homologous growth hormone accelerates bone healing--a biomechanical and histological study. **Bone**. 2003 Oct;33(4):628-37.

KURT, H.; OZTAS, E.; GENÇEL, B.; TASAN, D. A.; OZTAS, D. An adult case of temporomandibular joint osteoarthritis treated with splint therapy and the subsequent orthodontic occlusal reconstruction. **Contemp Clin Dent**, v.2, n.4, p.364-367, 2011.

LEE, J. Y.; KIM, D. J.; LEE, S. G.; CHUNG, J. W. A longitudinal study on the osteoarthritic change of the temporomandibular joint based on 1-year follow-up computed tomography. **Craniomaxillofac Surg**. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010518211002381>

LIVNE, E.; LAUFER, D.; BLUMENFELD, I.. Comparison of in vitro response to growth hormone by chondrocytes from mandibular condyle cartilage of young and old mice. **Calcif Tissue Int**. v. 61, n. 1, p. 62-67, 1997.

MACHON, V.; HIRJAK, D. LUKAS, J. Therapy of the osteoarthritis of the temporomandibular joint. **J Craniomaxillofac Surg**, v.39, n. 2, p. 127-130, 2011.

MAN, C.; ZHU, S.; ZHANG, B.; HU, J. Protection of articular cartilage from degeneration by injection of transforming growth factor-beta in temporomandibular joint osteoarthritis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n. 3, p. 335-340, 2009.

MANFREDINI, D.; GUARDA-NARDINI, L. Ultrasonography of the temporomandibular joint: a literature review. **Int J Oral maxillofac Surg**. v. 38, n.12, p. 1229-1236, 2009.

MARTINELLI JR., C. E.; CUSTÓDIO, R. J. AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.52, n. 5, p. 717-725, 2008.

MELCHIORRE, D.; CALDERAZZI, A.; MADDALI BONGI, S.; CRISTOFANI, R.; BAZZICHI, L.; ELIGI, C.; MARESCA, M.; CIOMPI, M. A comparison of ultrasonography and magnetic resonance imaging in the evaluation of temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. **Rheumatology**, v.42, n.5, p.673-676, 2003.

MIYAKI, K.; MURAKAMI, K.; SEGAMI, N.; IIZUKA, T. Histological and immunohistochemical studies on the articular cartilage after experimental discectomy of the temporomandibular joint in rabbits. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 21, p. 299-310, 1994.

MILLIS, D.L.; WILKENS, B. E.; DANIEL, G.B.; HUBNER, K.; MATHEWS, A.; BUONOMO, F. C.; PATELL, K. R.; WEIGEL, J. P. Radiographic, densitometric, and biomechanical effects of recombinant canine somatotropin in an unstable osteotomy gap model of bone healing in dogs. **Vet Surg**, v. 27, n. 2, p. 85-93, 1998.

MOLLENHAUER, J. A. Perspectives on articular cartilage biology and osteoarthritis. **Injury**, v.39, p.5-12, 2008.

MOYLE, G. J.; SCHOELLES, K.; FAHRBACH, K.; FRAME, D.; JAMES, K.; SCHEYE, R. CURE-BOLT, N. Efficacy of selected treatments of HIV wasting: a systematic review and meta-analysis. **J Acquir Immune Defic Syndr**. v. 37, n. 5, p. 262-276, 2004.

MOYSTAD, A.; MORK-KNUTSEN, B. B.; BJORNLAND, T. Injection of sodium hyaluronate compared to a corticosteroid in the treatment of patients with temporomandibular joint osteoarthritis: a CT evaluation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 105, n. 2, p. 53-60, 2008.

NITZAN, D. W. 'Friction and adhesive forces' – Possible Underlying causes for Temporomandibular Joint Internal derangement. **Cells Tissues Organs**, v.174, p.6-16, 2003.

NITZAN, D. W. Arthrocentesis--incentives for using this minimally invasive approach for temporomandibular disorders. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, v. 18, n. 3, p. 311-328, 2006.

OHLSSON, C.; BENGTSSON, B.; ISAKSSON, O. G. P.; ANDREASSEN, T. T.; SLOOTWEG, M. C. Growth hormone and Bone. **Endocrine Reviews**, v. 19, n.1, p. 55-79, 1998.

OKESON, J. P. **Fundamentos de oclusão e desordens temporomandibulares**. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 1992. 450 p.

PALCONET, G.; LUDLOW, J. B.; TYNDALL, D. A.; LIM, P.F. Correlating cone beam CT results with temporomandibular joint pain of osteoarthritic origin. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 41, n.2, p.126-130, 2012.

PIANCINO, M. G.; CIRILLO, S.; FRONGIA, G.; CENA, F.; BRACCO, A.A., DALMASSO, P.; BRACCO, P. Sensitivity of magnetic resonance imaging and computed axiography in the diagnosis of temporomandibular joint disorders in a selected patient population. **Int J Prosthodont**. v. 25, n. 2, p. 120-126, 2012.

PONTUAL, M. L. A.; FREIRE, J. S.; BARBOSA, J. M.; FRAZÃO, M. A.; PONTUAL, A. A. Evaluation of bone changes in the temporomandibular joint using cone beam CT. **Dentomaxillofac Radiol**, v.41, n. 1, p. 24-29, 2012.

RAMIREZ-YAANEZ, G. O.; YOUNG, W. G.; DALEY, T. J.; WATERS, M. J. Influence of growth hormone on the mandibular condylar cartilage of rats. **Arch Oral Biol**, v. 49, n. 7, p. 585-590, 2004.

RANDO, C.; WALDRON, T. TMJ osteoarthritis: a new approach to diagnosis. **Am J Phys Anthropol**, v. 148, n. 1, p. 45-53, 2012.

RASCHKE, M. J.; BAIL, H.; WINDHAGEN, H. J.; KOLBECK, S. F.; WEILER, A.; RAUN, K.; KAPPELGARD, A.; SKIAERBAEK, C.; HAAS, N. P. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. **Bone**, v. 24, n. 2, p. 81-88, 1999.

RASCHKE, M. J.; KOLBECK, S. F.; BAIL, H.; SCHMIDMAIER, G.; FLYVBJERG, A.; LINDNER, T.; DAHNE, M.; ROENNE, I. A.; HAAS, N. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. **Bone**, v. 29, n. 4, p. 368-373, 2001.

RASHID, A.; MATTHEWS, N. S.; COWGILL, H. Physiotherapy in the management of disorders of the temporomandibular joint-perceived effectiveness and access to services: a national United Kingdom survey. **Br J Oral Maxillofac Surg**. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266435612000940>

SHARAWY, M.; ALI, M.; CHOI, W. S. Experimental induction of anterior disk displacement of the rabbit craniomandibular joint: an immuno-electron microscopic study of collagen and proteoglycan occurrence in the condylar cartilage. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n.3, p.176-184, 2003.

SIDEBOTTOM, A. J.; SALHA, R. Management of the temporomandibular joint in rheumatoid disorders. **Br J Oral Maxillofac Surg**. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266435612004123>

SINGH, M.; DETAMORE, M. S. Biomechanical properties of the mandibular condylar cartilage and their relevance to the TMJ disc. **J Biomech**, v. 42, n. 4, p. 405-417, 2009.

SIVAKUMAR, T.; MECHANIC, O.; FEHMIE, D. A.; PAUL, B. Growth hormone axis treatments for HIV-associated lipodystrophy: a systematic review of placebo-controlled trials. **HIV Med**, v. 12, n. 8, p.453-462, 2011.

SUZUKI, T.; BESSHO, K.; FUJIMURA, K.; OKUBO, Y.; SEGAMI, N.; IIZUKA, T. Regeneration of defects in the articular cartilage in rabbit temporomandibular joints by bone morphogenetic protein-2. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, n. 3, p. 201-206, 2002.

TAKAFUJI, H.; SUZUKI, T.; OKUBO, Y.; FUJIMURA, K.; BESSHO, K. Regeneration of articular cartilage defects in the temporomandibular joint of rabbits by fibroblast growth factor-2: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 10, p. 934-937, 2007.

TANAKA, E.; DETAMORE, M. S.; TANIMOTO, K.; KAWAI, N. Lubrication of the temporomandibular joint. **Ann Biomed Eng**, v. 36, n. 1, p. 14-29, 2008.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Fisiologia humana: mecanismos da função de órgãos e sistemas**. São Paulo: McGraw-Hill; 1981. 834p.

VISNAPUU, V.; PELTOMÄKI, T.; RÖNNING, O.; VAHLBERG, T.; HELENIUS, H. Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor I Receptors in the Temporomandibular Joint of the Rat. **J Dent Res**, v. 80, n. 10, p. 1903-1907, 2001.

WANG, L.; DETAMORE, M. S. Tissue engineering the mandibular condyle. **Tissue Eng**, v. 13, n.8, p. 1955-1971, 2007.

WEIJS, W. A.; DANTUMA, R. Functional anatomy of the masticatory apparatus in the rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.). **Neth Zool**, v. 31, p. 99-147, 1981.

WINOCUR, E.; REITER, S.; KRICHMER, M.; KAFFE, I. Classifying degenerative joint disease by the RDC/TMD and by panoramic imaging: a retrospective analysis. **J Oral Rehabil**, v. 37, n. 3, p. 171-177, 2010.

XINMIN, Y.; JIAN, H. Treatment of temporomandibular joint osteoarthritis with viscosupplementation and arthrocentesis on rabbit model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.100, n. 3, p. 35-38, 2005.

YANG, S.; CAO, L.; CAI, S.; YUAN, J.; WANG, J. A systematic review of growth hormone for hip fractures. **Growth Horm IGF Res**, v. 22, n. 3-4, p. 97-101, 2012.

APÊNDICE A – Ficha de Avaliação Tomográfica

Planmeca Romexis Viewer®/ CS 3D Imaging Software®

Análise Tomográfica do Côndilo Mandibular	Escore
Normal	0
Irregularidade leve na superfície articular	1
Irregularidade severa na superfície articular	2
Formação de osteófitos	3
Alteração de contorno do côndilo	4

AMOSTRA 1	COM ÁGUA	SEM ÁGUA
ATM 1		
ATM 2		
ATM 3		
ATM 4		
ATM 5		
ATM 6		
ATM 7		
ATM 8		
ATM 9		
ATM 10		
ATM 11		
ATM 12		

AMOSTRA 2	COM ÁGUA	SEM ÁGUA
ATM 1		
ATM 2		
ATM 3		
ATM 4		
ATM 5		
ATM 6		
ATM 7		
ATM 8		
ATM 9		
ATM 10		
ATM 11		
ATM 12		

AMOSTRA 3	COM ÁGUA	SEM ÁGUA
ATM 1		
ATM 2		
ATM 3		
ATM 4		
ATM 5		
ATM 6		
ATM 7		
ATM 8		
ATM 9		
ATM 10		
ATM 11		
ATM 12		

AMOSTRA 4	COM ÁGUA	SEM ÁGUA
ATM 1		
ATM 2		

APÊNDICE B – Ficha de Avaliação Histológica

Critério da cartilagem articular	Escore
Normal	0
Irregularidades na superfície	1
Espessamento da cartilagem condilar	2
Adelgaçamento da cartilagem condilar	3
Fissura na fibrocartilagem do côndilo	4
Perda total da cartilagem condilar	5

ATM	SCORE	ATM	SCORE
1		20	
2		21	
3		22	
4		23	
5		24	
6		25	
7		26	
8		27	
9		28	
10		29	
11		30	
12		31	
13		32	
14		33	
15		34	
16		35	
17		36	
18		37	
19		38	

ANEXO A



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 02 de Dezembro de 2010

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0086/10
Intitulado: Avaliação do uso do hormônio do crescimento recombinante humano na ATM de coelhos com osteoartrite induzida
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli
Pesquisadores Associados Anderson Pedroso Prock
Nível: Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em *02 de Dezembro de 2010*.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
 Presidente da Comissão Científica e de Ética da
 Faculdade de Odontologia da PUCRS

07 12 2010
 Anderson Pedroso Prock

ANEXO B



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 100/11 – CEUA

Porto Alegre, 11 de agosto de 2011.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00217 intitulado: **“Avaliação do uso do hormônio do crescimento recombinante humano na ATM de coelhos com osteoartrite induzida”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Rogério Pagnoncelli
Faculdade de Odontologia
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br