



**UNICAMP**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JEAN CARLOS MOREIRA

**EFEITO DO SULFATO DE GLICOSAMINA NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

PIRACICABA – SP

2019

JEAN CARLOS MOREIRA

**EFEITO DO SULFATO DE GLICOSAMINA NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO  
ALUNO JEAN CARLOS MOREIRA E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. SIDNEY  
FIGUEROBA RAIMUNDO

PIRACICABA – SP

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 134081/2018-8  
**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8434-6575>

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

M813e Moreira, Jean Carlos, 1980-  
Efeito do sulfato de glicosamina na articulação temporomandibular de ratas ovariectomizadas / Jean Carlos Moreira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Sidney Figueroba Raimundo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Articulação temporomandibular. 2. Citocinas. 3. Inflamação. 4. Glucosamina. I. Figueroba Raimundo, Sidney, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Titulo em outro idioma:** Effect of glucosamine sulphate in the temporomandibular joint of ovariectomized rats

**Palavras-chave em inglês:**

Temporomandibular joint

Cytokines

Inflammation

Glucosamine

**Área de concentração:** Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

**Titulação:** Mestre em Odontologia

**Banca examinadora:**

Sidney Figueroba Raimundo [Orientador]

Luiz Eduardo Nunes Ferreira

Yuri Nejaim

**Data de defesa:** 25-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia

- ORCID: 0000-0001-8434-6575

- Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0519739333322055>



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



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2019, considerou o candidato JEAN CARLOS MOREIRA aprovado.

PROF. DR. SIDNEY FIGUEROBA RAIMUNDO

PROF. DR. LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA

PROF. DR. YURI NEJAIM

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a Deus, que sempre esteve comigo nos meus momentos felizes e difíceis.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 134081/2018-8.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor, Prof. Dr. Marcelo Knobel.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP), na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

Ao departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, por meio do chefe de departamento, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Em especial ao Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo pela orientação deste trabalho. Além de professor, amigo e fonte de aprendizado, não apenas farmacológico, mas humano. Muito obrigado. Que o Senhor Deus possa retribuir-lhes em múltiplas alegrias a dedicação na orientação deste trabalho.

À minha família, aos amigos, o meu muito obrigado por fazerem parte da minha vida, por todo o apoio, incentivo, toda a torcida, confiança e carinho que me deram.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. José Ranali, e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia de Piracicaba.

Ao meu Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, minha gratidão pela orientação, pelos exemplos de seriedade, honestidade e esforço, pela disposição em sempre me ajudar, pelo incentivo, pela amizade, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos do mestrado, Jaiza, Gisele e Sindi, que fizeram parte da minha vida, pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos da farmacologia, com todo o carinho, Bruno, Josy, Bruno Muniz, Diego Romário, Klinger, Jonny, Rafaela, Karina e Janaina, por todos os momentos que passamos juntos, pela ajuda nos seminários, pela amizade e companheirismo.

À Eliane Melo Franco, excelente técnica de laboratório, sempre pronta a ajudar em todos os momentos.

À Maria Elisa dos Santos, secretária eficiente, sempre prestativa com sua delicadeza e generosidade, por sempre nos ajudar nas questões burocráticas. O meu sincero e afetuoso obrigado.

Ao José Carlos Gregório, técnico da Disciplina de Farmacologia, muito obrigado pela atenção e ajuda prestada.

À Maria Aparecida Santiago Varella técnica da Disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, ajuda no preparo do material de microscopia de luz, meu muito obrigado.

À Rogerio Liberato Porto, pelo apoio e incentivo, o meu mais sincero obrigado. Peço a Deus que te proteja sempre.

Aos amigos e pessoas que embora não citadas colaboraram e incentivaram, para que este trabalho fosse realizado.

## RESUMO

O processo degenerativo na cartilagem articular da articulação temporomandibular (ATM), é uma patologia mais frequente em mulheres do que em homens, sugerindo uma possível contribuição de hormônios gonadais na fisiopatologia dessa condição. A glicosamina é um amino-monossacarídeo presente em tecidos conjuntivos e cartilagosos que contribuem para a manutenção, resistência, flexibilidade e elasticidade desses tecidos. O sulfato de glicosamina tem sido usada para tratar osteoartrite em humanos. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar *in vivo* o efeito do sulfato de glicosamina na articulação temporomandibular de ratas ovariectomizadas (OVX) por meio de análise histomorfométrica e Imunoensaio de ELISA na quantificação das citocinas pró-inflamatórias: interleucinas (IL1- $\beta$ , IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Foram utilizadas 32 ratas distribuídas em 4 grupos ( $n$  8): G1 sham + solução salina; G2 sham+ sulfato de glicosamina 80 mg/kg via oral; G3 OVX + solução salina; G4 OVX + sulfato de glicosamina 80 mg/kg via oral. Os tratamentos foram realizados após 21 dias da indução da OVX, os grupos sham e OVX foram submetidos aos tratamentos propostos durante 7 dias. Após o término dos tratamentos as ATM de ambos os lados foram retiradas em bloco. Uma das ATM foi submetida, após fixação e descalcificação, ao processamento histológico. A ATM contralateral foi submetida à maceração e centrifugação em tampão de extração celular (tampão tris-hcl 50mM, ph 7,5). O sobrenadante submetido ao Imunoensaio (ELISA) para avaliação das citocinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ). A análise dos dados (Kruskal-Wallis e Dunn) revelou que o sulfato de glicosamina administrada às fêmeas OVX não alterou a espessura da cartilagem condilar quando comparada aos demais grupos ( $p > 0.05$ ). Entretanto, quando administrada às fêmeas sham, o sulfato de glicosamina causou aumento da cartilagem total quando comparada aos demais grupos. Não houve diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0.05$ ) entre os grupos controles. A concentração da citocina IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nas fêmeas sham foi significativamente menor do que a concentração verificada nas fêmeas OVX, indicando que a OVX por si só já foi potente indutor dessas citocinas. Não houveram diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0.05$ ) nas citocinas entre as fêmeas OVX que

receberam ou não o sulfato de glicosamina, a interleucina IL-6 mostrou maiores concentrações nas fêmeas sham do que nas OVX, independentemente de receberem ou não o sulfato de glicosamina. Também não houve efeito do sulfato de glicosamina sobre a concentração da IL-6, tanto nas fêmeas OVX quanto em sham. O sulfato de glicosamina não interfere no nível das citocinas avaliadas nos animais OVX e sham, nos animais sham o sulfato de glicosamina induziu um aumento na espessura total da cartilagem condilar da ATM.

Palavra-chave. Articulação temporomandibular, glicosamina, citocinas, inflamação.

## ABSTRACT

The degenerative process of the articular cartilage on temporomandibular joint (TMJ) is more frequent in women than in men, suggesting a possible contribution of gonadal hormones in the pathophysiology. Glucosamine is a monosaccharide amine present in conjunctive and cartilaginous tissues that contribute to the maintenance, resistance, flexibility and elasticity of these tissues. It has been used to treat osteoarthritis in humans. The objective of this research was to evaluate effects of glucosamine sulfate in vivo in the TMJ of female-rats after castration by ovariectomy (OVX) through histomorphometry analysis of the articular cartilage layers and by ELISA immunoassay to quantify pro-inflammatory cytokines (IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ). 32 rats were distributed into four groups ( $n=8$ ): G1 - sham + saline solution; G2 - sham + 80 mg/kg glucosamine; G3 - OVX + saline solution; G4 - OVX + 80 mg/kg glucosamine. The treatments were performed 21 days after OVX, and kept for 7 days. After the end of the treatments, the TMJ (both sides) were removed in block. The TMJ were processed for histological analyses and for cytokines quantification. The supernatant submitted to immunoassay (ELISA) for the evaluation of pro-inflammatory cytokines (IL1- $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ). Data analysis (Kruskal-Wallis and Dunn) revealed that glucosamine administered to castrated females did not alter the cartilage thickness when compared to other groups ( $p > 0.05$ ). However, when administered to non-castrated females, glucosamine increased the total of the condylar cartilage thickness when compared to the other groups. There were no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) between the control groups. The concentration of the cytokines IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  was low in non-castrated females and significantly lower than the concentration observed in castrated females, indicating that castration alone was a potent inducer of these cytokines. There were no differences ( $p > 0.05$ ) in the cytokine concentrations between castrated females receiving or not glucosamine. Cytokine IL-6 showed higher concentrations in non-castrated females than in castrates, regardless of whether they receive or not glucosamine. There was also no effect of glucosamine on IL-6 concentration in both castrated and non-castrated females. We concluded that glucosamine does not interfere with the level of cytokines evaluated in castrated and non-castrated animals, but in non-castrated glucosamine induced an increase in total condylar cartilage

thickness.

Key words: Temporomandibular joint, glucosamine, cytokines, inflammation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>39</b>
<b>Anexo 1 – Certificado do CEUA-UNICAMP .....</b>	<b>41</b>
<b>Anexo 2 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação do tipo sinovial, que se estabelece entre as extremidades ósseas da cabeça da mandíbula, a fossa mandibular e o tubérculo articular do osso temporal. As superfícies articulares da fossa mandibular e da cabeça da mandíbula são revestidas por tecido fibrocartilaginoso (Bag *et al.*, 2014).

Muitos fatores, como idade, sexo, fatores hormonais, traumas e estresse psicológico podem levar a uma adaptação fisiológica ou, caso contrário, à desorganização da ATM (Figueroba *et al.*, 2014a)

O processo degenerativo na cartilagem articular da articulação temporomandibular (ATM), é uma patologia mais frequente em mulheres do que em homens, sugerindo uma possível contribuição de hormônios gonadais na fisiopatologia dessa condição (Warren & Fried, 2001). O estrogênio é um hormônio esteroidal conhecido por regular diversos processos fisiológicos em tecidos-alvo de ambos os sexos (Galal *et al.*, 2008). Em concentrações fisiológicas, o estrogênio pode desempenhar um papel na remodelação da ATM (Yasuoka *et al.*, 2000).

Os hormônios gonadais têm um impacto significativo sobre o desenvolvimento de doenças autoimunes em humanos e roedores (Yoneda *et al.*, 2004). Na fisiopatologia da inflamação articular, os estrogênios desempenham funções especializadas. Na presença do estradiol em artrite reumatoide (AR), mostrou-se aumentado o nível de interleucina IL-1 $\beta$  e aumento de secreção de IL-6 em sinoviócitos (Kawasaki *et al.*, 2000). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) apresentaram-se aumentados em ratas ovariectomizadas (OVX), provavelmente devido a uma redução extrema na produção gonadal (Figueroba *et al.*, 2015).

A Inflamação também desempenha um papel na disfunção temporomandibular (DTM), especialmente nos casos associados com artrite, trauma agudo e desarranjo da cartilagem (Alstergren & Kopp 2000).

Níveis de interleucinas, como IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6 e do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) estão aumentados no líquido sinovial de pacientes com DTM. Algumas interleucinas, como IL-6 e IL-11, estão presentes na articulação temporomandibular (ATM), mas associadas ao processo adaptativo (Kaneyama *et al.*, 2004; Figueroba *et al.*, 2014a)

Distúrbios da ATM também são caracterizados por degeneração do colágeno e da quantidade de proteoglicanos (Damlar *et al.*, 2015). A glicosamina é um amino-monossacarídeo presente em tecidos conjuntivos e cartilagosos que contribuem para a manutenção, resistência, flexibilidade e elasticidade desses tecidos. O sulfato de glicosamina tem sido usada para tratar osteoartrite em humanos.

Modelos animais de osteoartrite têm apoiado o potencial terapêutico do sulfato de glicosamina. Sabe-se que o sulfato glicosamina ajuda na manutenção de proteoglicanos, inibe a degradação do colágeno tipo I e melhora a síntese de colágeno tipo II na cartilagem articular (Naito *et al.*, 2010).

Ratas OVX têm mostrado um espessamento da cartilagem e um aumento do volume de osso subcondral do côndilo mandibular. Embora, o espessamento da cartilagem articular esteja presente em ratas OVX, esse espessamento não pode ser considerado uma característica típica de osteoartrite (Chen *et al.*, 2014).

A principal hipótese deste estudo é comprovar o papel do estrógeno na manutenção da cartilagem condilar e volume ósseo subcondral normais e demonstrar o efeito do sulfato de glicosamina na articulação temporomandibular (ATM) de ratas OVX.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Os transtornos na articulação temporomandibular (ATM) tornam-se cada vez mais comuns na sociedade ao longo dos anos. Tem sido visto que esses transtornos resultam de várias etiologias (Kostrzewa-Janicka, 2013).

A degeneração das estruturas articulares causa a evolução de distúrbios não inflamatórios para o inflamatório. Esses estados degenerativos aumentam a destruição tecidual e a disfunção articular, causando liberação de mediadores inflamatórios no espaço articular (Kacena *et al.*, 2001).

A doença degenerativa da articulação temporomandibular é marcada por degradação e calcificação precoce da matriz extracelular da camada fibrosa da cartilagem do côndilo mandibular. Mulheres são 2 a 3 vezes mais propensas a sofrer as doenças degenerativas (Robinson *et al.*, 2018).

Transtornos da ATM podem afetar a mandíbula e os músculos mastigatórios. Muitos fatores, como idade, sexo, fatores hormonais, traumas e estresse psicológico podem levar a uma adaptação fisiológica ou, caso contrário, à desorganização da ATM (Figueroba *et al.*, 2014a). Além disso, doenças sistêmicas de caráter inflamatório e degenerativas, como osteoartrite e artrite, podem ter impacto significativo nessa articulação.

As citocinas estão predominantemente envolvidas nos processos degenerativos intra-articulares, sendo que concentrações elevadas de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-6 estão presentes no fluido sinovial de pacientes. A IL-6 e IL-11 também estão associadas com a adaptação da articulação (Kaneyama *et al.*, 2004). Em particular, a IL-6 desempenha um papel importante no desenvolvimento de osteoartrite (Kaneyama *et al.*, 2005)

Agentes anti-inflamatórios, analgésicos e relaxantes musculares têm sido usados para aliviar os principais sintomas (Dym & Israel, 2012). Outras estratégias, tais como fisioterapia, exercícios, ultrassom, terapia manual, acupuntura e laser também foram propostos (Rashid *et al.*, 2013; Figueroba *et al.*, 2014b).

Embora múltiplos hormônios gonadais possam influenciar no processamento da dor, o estrogênio tem sido o mais estudado e representa um fator de risco que pode contribuir para as diferenças na dor em relação às mulheres. A maior incidência ocorre em mulheres durante seus anos férteis, e não há diferença na

prevalência de disfunção temporomandibular (DTM) entre pré-adolescentes meninos e meninas (Ghurye & McMillan 2015).

Os efeitos do estrogênio são mediados pela ligação aos seus receptores. Três tipos de receptores estrogênicos são distinguidos, dois nucleares – alfa ( $ER\alpha$ ) e beta ( $ER\beta$ ), e um receptor de estrogênio acoplado à proteína G plasmática (GPER1) (Funakoshi *et al.*, 2006).

Desde 1986, quando receptores de estrogênio foram reconhecidos pela primeira vez em articulações temporomandibulares de babuíno, a influência do estrogênio na DTM tornou-se um assunto de interesse para muitos pesquisadores. Sabe-se agora que os receptores de estrogênio estão localizados em muitas estruturas do órgão estomatognático, particularmente nos tecidos da ATM, como nos tecidos retrodiscal e condróide do côndilo mandibular (Puri *et al.*, 2009).

Esses dados sugerem que a perda de estrogênio durante a menopausa pode potencializar o processo degenerativo da articulação temporomandibular. No entanto, pouco se sabe sobre o papel do estrogênio na mediação do crescimento, homeostase e degeneração da ATM. (Robinson *et al.*, 2018)

Na reposição com  $17\beta$ -estradiol houve um aumento de expressão e concentração das interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 na cartilagem articular de ATM de camundongo (Yun *et al.*, 2008). O estradiol pode agravar a inflamação da ATM através do núcleo via do fator nuclear kappa B (NF-kB), levando à indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (Chen *et al.*, 2014; Kou *et al.*, 2011).

A osteoporose é um problema importante para a mulher, principalmente em seu período pós-menopausa, e sabe-se que a deficiência de estrogênio desempenha um papel no seu desenvolvimento (Boling, 2001).

O estrógeno pode atuar direta ou indiretamente em osteoblastos e osteoclastos através de mecanismos mediados por receptores de estrogênio, (Christgau *et al.*, 2004) como a inibição da produção de citocinas ósseas que induzem reabsorção a partir de células estromais da medula, (Sykes & Kamps, 2003), inibição direta da atividade de osteoclastos (Kenny & Raisz, 2002)

O efeito anabólico definido na formação óssea pode ser encontrado em modelos animais com deficiência de estrogênio. (Hukkanen *et al.*, 2003). Não surpreendentemente, a terapia com estrogênio tem sido amplamente aceita como um tratamento eficaz em mulheres pós-menopausa para prevenir redução da densidade mineral óssea (Delaney, 2006). Entretanto, terapias prolongadas de

reposição de estrogênio têm-se provado aumentar os riscos de câncer de mama e de útero. (Conner, 2007; Russo & Russo, 2007)

Alterações morfológicas foram observada nas camadas fibrosa, hipertrófica, proliferativa e maturada da cartilagem articular da ATM de ratas ovariectomia (OVX) causando uma diminuição do tecido fibroso, desarranjo celular e um aumento no número de condrócitos na camada hipertrófica (Figueroba *et al.*, 2015).

Distúrbios da ATM também são caracterizados por degeneração do colágeno e uma quantidade reduzida de proteoglicanos. A glicosamina é uma glicoproteína essencial que é necessário para síntese de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Damlar *et al.*, 2015). Presente nos tecidos conjuntivos e cartilagosos que contribui para a manutenção, resistência, flexibilidade e elasticidade destes tecidos.

O sulfato de glicosamina tem sido usada no tratamento da osteoartrite em humanos (Naito *et al.*, 2010). Modelos animais de osteoartrite têm apoiado o potencial terapêutico da glicosamina. Por não possuir fontes naturais, o sulfato de glicosamina é extraída do exoesqueleto de crustáceos, tais como camarão, caranguejo e lagosta (Xu, Y.S. Wang, Y.M., 2004). Na análise histológica da cartilagem articular da ATM mostrou que agentes anti-inflamatórios e o sulfato de glicosamina promoveram um aumento nas concentrações de proteoglicanos (Figueroba *et al.*, 2018).

Atualmente, este composto tem sido comumente prescrito para o tratamento de distúrbios da ATM como remédio e suplemento nutricional, por ter efeitos colaterais menores (Jiang *et al.*, 2018).

Embora algumas investigações sugiram que o sulfato de glicosamina seja um tratamento eficaz para distúrbios da ATM, alguns outros ensaios clínicos não mostram qualquer vantagem para este tratamento em relação ao placebo (Haghigha *et al.*, 2013).

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo foi avaliar o efeito do sulfato de glicosamina na articulação temporomandibular de ratas ovariectomizadas através de análise histomorfométrica das camadas da cartilagem articular e pela quantificação de citoninas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) por Imunoensaio de ELISA.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP (Anexo 1).

### 4.2 Procedimentos experimentais

Este estudo observou a influência do sulfato de glicosamina na articulação temporomandibular de ratas na fase pós ovariectomia.

### 4.3 Fármacos

Os seguintes fármacos foram utilizados: cloridrato de quetamina (100mg/mL Dopalen injetável, laboratórios Vetbrands), cloridrato de xilasina (100mg/mL Anasedan injetável, laboratórios Vetbrands), solução salina estéril (NaCl a 0,89%) e 1,5 g de sulfato de glicosamina (Dinaflex® oral, Laboratórios Zodiac).

### 4.4 Estudo

#### 4.4.1 Animais

Foram utilizadas 32 ratas, (Ratos Heterogênicos HanUnib: WH Wistar, SPF<sup>1</sup>), jovens adultas (6 a 10 semanas de vida), com peso entre 200 a 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas antes do início do experimento. Foram mantidas em regime de água e alimentação *ad libitum*, à temperatura média de 23°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, sendo foto período de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7 às 19 horas.

Os 32 animais foram distribuídos nos seguintes grupos (n=8):

Grupo 1 – sham + solução salina via oral dose única durante 7dias;

Grupo 2 – sham + glicosamina 80 mg/kg via oral dose única durante 7dias;

Grupo 3 – OVX + solução salina via oral dose única durante 7dias;

Grupo 4 – OVX + glicosamina 80 mg/kg via oral dose única durante 7dias.

---

<sup>1</sup> S.P.F. = Specific Pathogen Free – livre de patógenos específicos.

#### 4.4.2 Exame colpocitológico

Todas as ratas foram submetidas à coleta de secreção vaginal, diariamente, durante três semanas, visando à avaliação da função ovariana. O material colhido em lâminas histológicas foi fixado em uma solução de álcool-éter (1:1), corado pelo método de Harris-Shorr (Shorr, 1941) e analisado ao microscópio de luz.

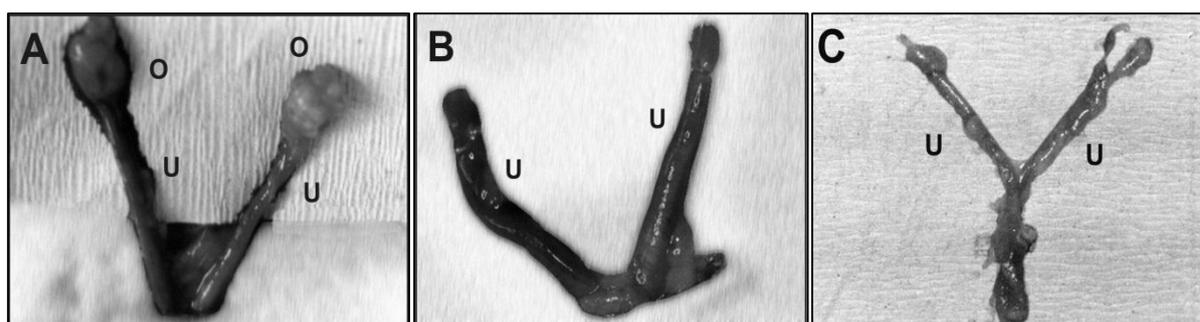
Somente as ratas apresentando dois ou mais ciclos estrais consecutivos de quatro dias foram incluídas no estudo (Montes & Luque, 1988).

#### 4.4.3. Castração

A ovariectomia foi feita sob anestesia intraperitoneal utilizando xilazina a 2% (10mg/kg) e quetamina a 10% (90mg/kg), por incisão dos flancos bilaterais, e feixes ovarianos foram ligados com sutura fio seda 4-0, em seguida remoção dos ovários. A ovariectomia teve como finalidade eliminar a produção gonadal de esteroides, produzindo um estado permanente de insuficiência estrogênica (Figura 1).

Foi realizada analgesia, no período pós-operatório imediato, com a administração de cloridato de meperidina na dose única de 2mg/kg/animal, por via intramuscular (Latt, 1976).

**Figura 1 - Útero com os ovários em (A), o útero sem os ovários submetidos à ovariectomia em (B) e o útero atrófico após 21 dias da ovariectomia em (C); (O) ovário, (U) útero.**



(A) útero normal

(B) ovariectomizado

(C) ovariectomizado (atrófico)

#### 4.4.4 Exame colpocitológico

Todas as ratas foram novamente submetidas à coleta de secreção vaginal, diariamente, durante 15 dias que sucederam à cirurgia. Somente as ratas que apresentaram esfregaços vaginais de padrão atrófico por 15 dias consecutivos foram incluídas no experimento.

#### 4.4.5 Tratamentos

Após 21 dias da ovariectomia e sham, os animais de todos os grupos foram submetidos ao tratamento com os fármacos em estudo com solução salina via oral dose única durante 7 dias (grupos 1 e 3) por gavagem; glicosamina 80 mg/kg via oral dose única durante 7 dias (grupos 2 e 4) por gavagem; Os animais foram sacrificados por anestesia profunda (xilazina a 2% (10mg/kg) e quetamina a 10% (90mg/kg). Após o período descrito, as ATM foram removidas e selecionadas aleatoriamente para coloração com Azul de Toluidina ou Imunoensaio (ELISA).

#### 4.4.6 Processamento histológico

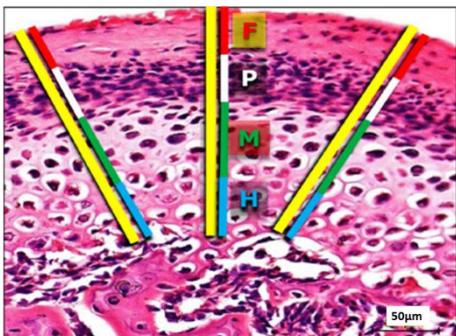
A ATM foi fixada em solução de paraformaldeído a 10% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), durante 24h a 4°C. Em seguida, foi realizada a descalcificação da estrutura em solução de EDTA a 6% (ácido etilenodiamino tetra-acético), dissolvido no mesmo tampão por um período de 3 meses.

Após desidratação em etanol 70%, 95% e 100%, diafanizada em xilol foram embebida/incluída em blocos de parafina a 65°C. Foram realizados nove cortes seriados coronais de 6 µm de espessura para cada animal em micrótomo manual (LEICA, RM 2145), os quais foram colhidos em lâminas histológicas e corados por Azul de Toluidina para visualização dos proteoglicanos (PGs) e para análise da estrutura geral da ATM.

#### 4.4.7 Morfometria

A região da cabeça do côndilo foi selecionada para as medições. Para verificar a espessura total e de cada camada da cartilagem condilar (fibrosa, proliferativa, maturada e hipertrófica), realizou-se três medidas, um raio central e outros raios adjacentes de cada lado, os resultados expressos em milímetros (Figura 2), mensurados através do Image-Pro Software Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA).

**Figura 2 - Corte coronal da ATM mostrando a região condilar – camadas (F = fibrosa; P = proliferativa; M = madura; e H = hipertrófica) da cartilagem articular medida em três diferentes regiões (coloração hematoxilina e eosina, ampliação × 20).**



Fonte: Figueroba *et al.*,2014a.

#### 4.4.8 Imunoensaio

A ATM contralateral foi submetida à maceração e centrifugação em tampão de extração celular (tampão tris-hcl 50mM, pH 7,5). O sobrenadante foi submetido ao imunoensaio (ELISA) de captura (PeproTech Inc., Rocky Hill,NJ, EUA), para avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ )

Para este teste, foram utilizadas placas de 96 poços, na qual foram adicionados 100 $\mu$ L/poço com anticorpo de captura para cada citocinas e deixada à temperatura ambiente *overnight* (durante a noite). Lavada em solução de Tween 20 a 0,05% em PBS (tampão fosfato em salina, Sigma), e então foi adicionado 300 $\mu$ L de tampão de bloqueio 1% BSA (albumina sérica bovina, Sigma) em PBS por poços em temperatura ambiente por 1 hora para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos.

Após este procedimento, as placas foram novamente lavadas, sendo acrescentado 100 $\mu$ L das amostras e de uma solução padrão diluída em sete concentrações, incubada em temperatura ambiente por 2 horas.

Após este período, a mesma foi lavada como descrito anteriormente e, então, foi adicionado 100 $\mu$ L dos anticorpos de detecção em cada poço, incubada em temperatura ambiente por mais 2 horas. Em seguida, a placa foi novamente lavada, acrescentado 100 $\mu$ L da solução de avidina-peroxidase conjugada (enzima) em cada poço. Após 30 minutos e, após nova lavagem, foi adicionada 100  $\mu$ L de solução para substrato – ABTS (solução de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico,

Sigma). A placa foi mantida em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor e, em seguida, a reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro por densidade óptica a 405nm com correção de comprimento de onda definido para 650nm.

#### **4.5 Análises dos dados**

Os dados foram submetidos aos testes de D'Agostino & Pearson para verificar a sua normalidade e ao teste de Bartlett para observar a homocedasticidade. Estes testes mostraram que não houve normalidade ou similaridade de variância para os grupos.

Os testes de Kruskal-Wallis e de Dunn (post-hoc) foram utilizados para observar o efeito da glicosamina e da castração sobre a cartilagem da ATM e suas diferentes camadas. A concentração das citocinas também foi analisada pelos mesmos testes.

Todas as análises foram realizadas considerando 5% de nível de significância, utilizando o software GraphPad Prism 7.05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Espessura da camada de cartilagem

A espessura total da cartilagem é mostrada na Tabela 1.

**Tabela 1 – Espessura da cartilagem da ATM das ratas ovariectomizada (OVX) e sham que receberam ou não a glicosamina.**

	Ratas OVX		Ratas Sham	
	Controle	Glicosamina	Controle	Glicosamina
<b>Espessura</b>	231.3	230.7	238.4	272.1
<b>Total das camadas</b>	(228.3 – 235)	(226.6 – 233.7)	(224.9 – 247.2)	(248.5 – 285)
	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>b</b>

Mediana (1°-3° quartil). Letras distintas significam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ ).

A análise dos dados (Kruskal-Wallis e Dunn) revelou que o sulfato de glicosamina administrado às ratas OVX não alterou a espessura da cartilagem quando comparada as ratas OVX controle ( $p > 0.05$ ). Entretanto, quando administrada as ratas sham, a glicosamina causou aumento da cartilagem total quando comparada aos demais grupos. Não houve diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0.05$ ) entre os grupos controles.

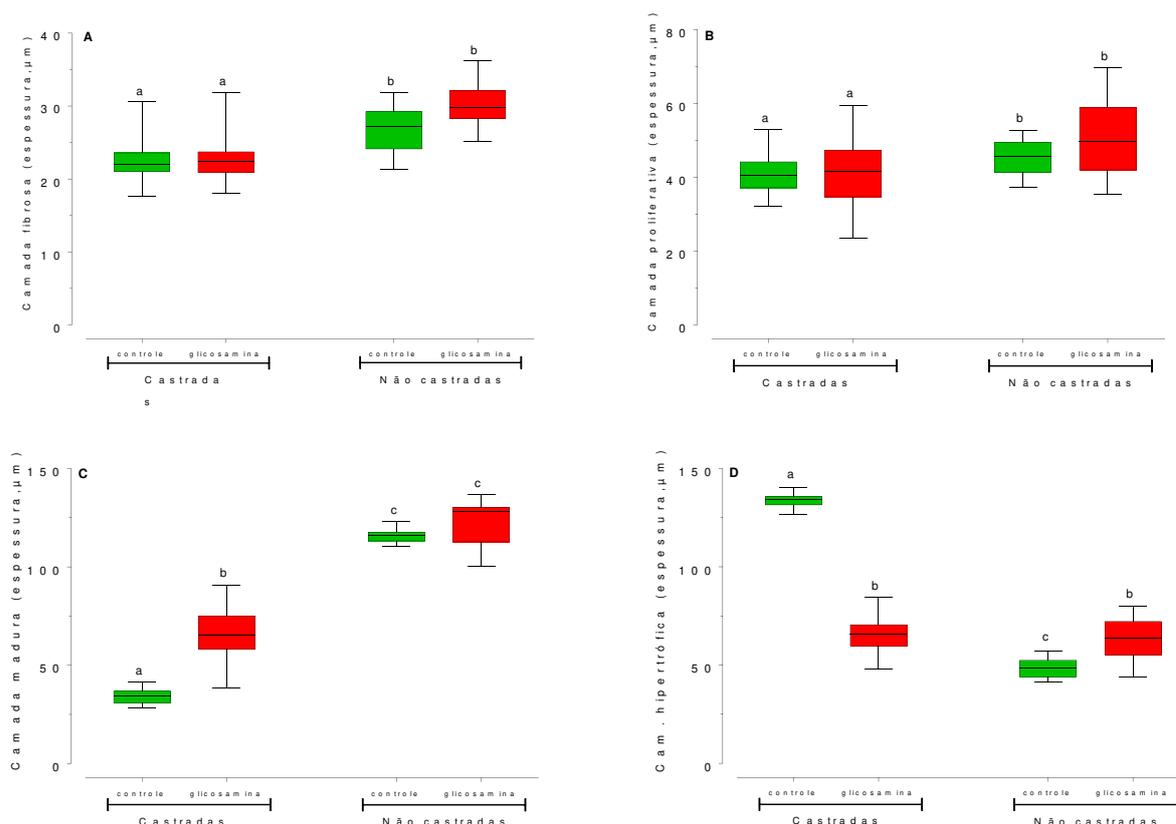
Para verificar o efeito dos tratamentos sobre as diferentes camadas da cartilagem, os dados foram analisados e são apresentados na Figura 3. Foi possível observar que não houve efeito da glicosamina sobre as camadas fibrosa e proliferativa tanto nas ratas OVX quanto naquelas ratas sham. Entretanto, a espessura dessas mesmas camadas foi maior nas ratas sham quando comparadas com as ratas OVX, independentemente do grupo controle ou tratado.

Já na camada madura, a glicosamina não produziu efeitos significativos nas ratas sham. A ovariectomia induziu uma diminuição significativa da espessura da camada madura quando comparada às ratas sham. Nas fêmeas ovariectomizadas, a glicosamina causou um aumento ( $p < 0.0001$ ) nessa camada.

Sob efeito da glicosamina houve aumento ( $p < 0.0001$ ) da espessura da camada hipertrófica nas ratas sham quando comparadas ao seu controle. Porém, houve diminuição significativa ( $p < 0.0001$ ) da espessura dessa camada nas ratas

OVX tratadas com a glicosamina. Não houve, entretanto, diferenças estatisticamente significantes entre as ratas OVX e sham que foram submetidas à glicosamina. A ovariectomia levou ao aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) da espessura da camada hipertrófica nas ratas controle.

**Figura 3 - Espessura das camadas fibrosa (A), hipertrófica (B), madura (C) e proliferativa (D) da cartilagem da ATM das ratas castradas e não castradas que receberam ou não a glicosamina (grupos n=8). Linha central=mediana; caixa= 1° e 3° quartis; suíças=valores máximo e mínimo.**



Letras distintas significam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ ).

A morfologia das camadas (fibrosa, proliferativa, maturada e hipertrófica) da cartilagem da ATM em ratas castradas e ratas não castradas (controle) são mostrados na figura 4, respectivamente. Alterações morfológicas foram observadas em ratas castradas em todas as camadas da cartilagem condilar (Figura 4 - C, G e K).

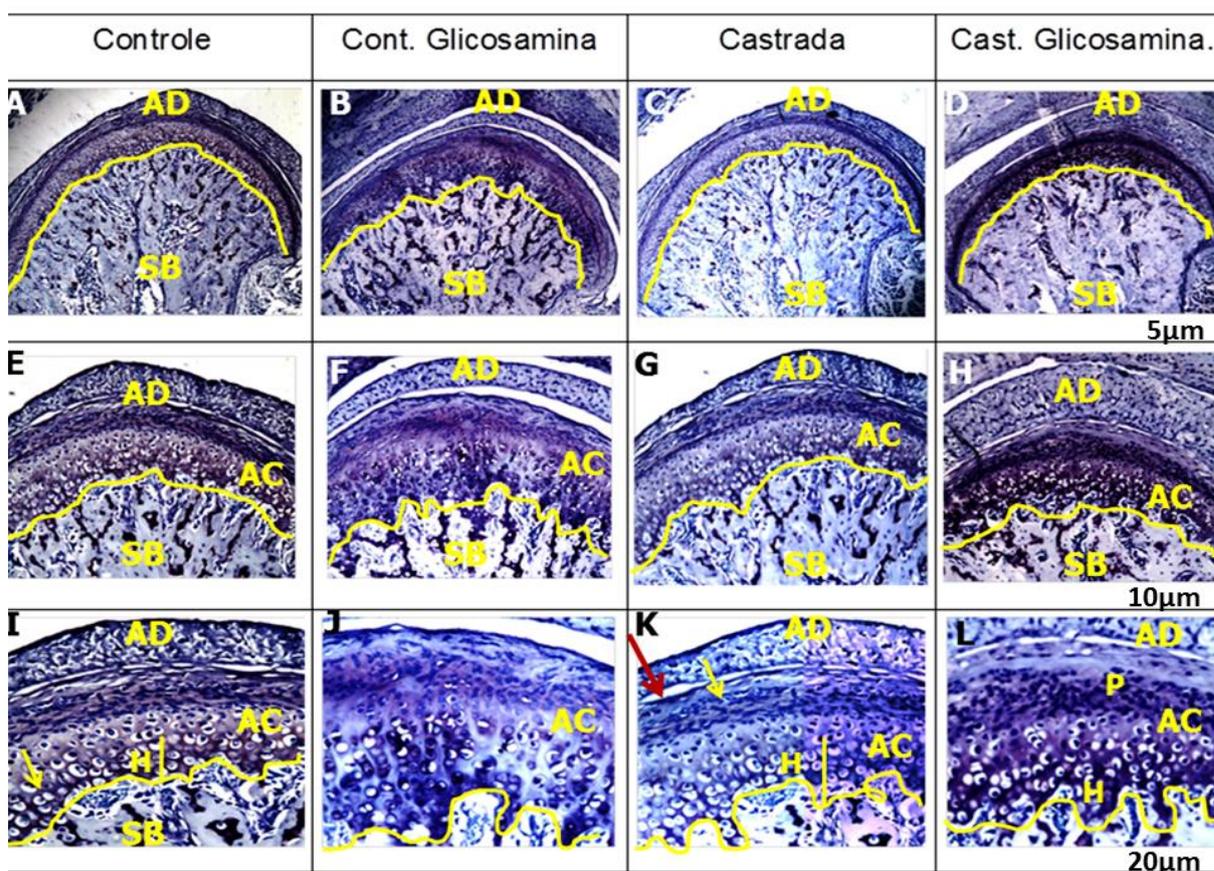
Um desarranjo celular e uma diminuição na espessura das camadas fibrosa, proliferativa e maturada foram observados (Figura 4 - K). Na camada fibrosa a morfologia irregular com zonas de remodelação aparente é mostrada pela seta vermelha (Figura 4 - K) nas ratas OVX, condrócitos amorfos (sem forma) e

achatados são observados na região da camada proliferativa seta amarela (Figura 4 - K).

Nos animais OVX observamos um aumento na espessura da camada hipertrófica e um aumento no número de condrócitos seta amarela (Figura 4 - K). Na figura 4 - C, G e K, observamos uma diminuição na densidade de cor azul nos animais OVX quando comparado com o controle (Figura 4 - A, E e I), um aumento na densidade de cor azul nos animais OVX tratado com sulfato de glicosamina (Figura 4 - D, H e L) comparado com OVX, e um aumento maior no grupo sham tratado com sulfato de glicosamina (Figura 4 - B, F e J) quando comparado com o seu controle.

Na figura 4 - L, observamos na camada proliferativa e hipertrófica uma reorganização celular (arredondadas sem achatamento) e um aumento no número de condrócitos.

**Figura 4 -** Secções coronais das ATMs; coloração com azul de toluidina. A – D: 5 X, barra de escala de 200 mm; E – H: 10X, barra de escala de 100 mm; I – L: 20X, barra de escala de 50 mm. As regiões do cõndilo são as seguintes: AD (disco articular); AC (cartilagem articular); SB (osso subcondral). As linhas amarelas tracejadas dividem a cartilagem e o osso subcondral. P= camada proliferativa; H = camada hipertrófica. As setas amarelas mostram condrocitos e vermelha erosão na fibrocartilagem.

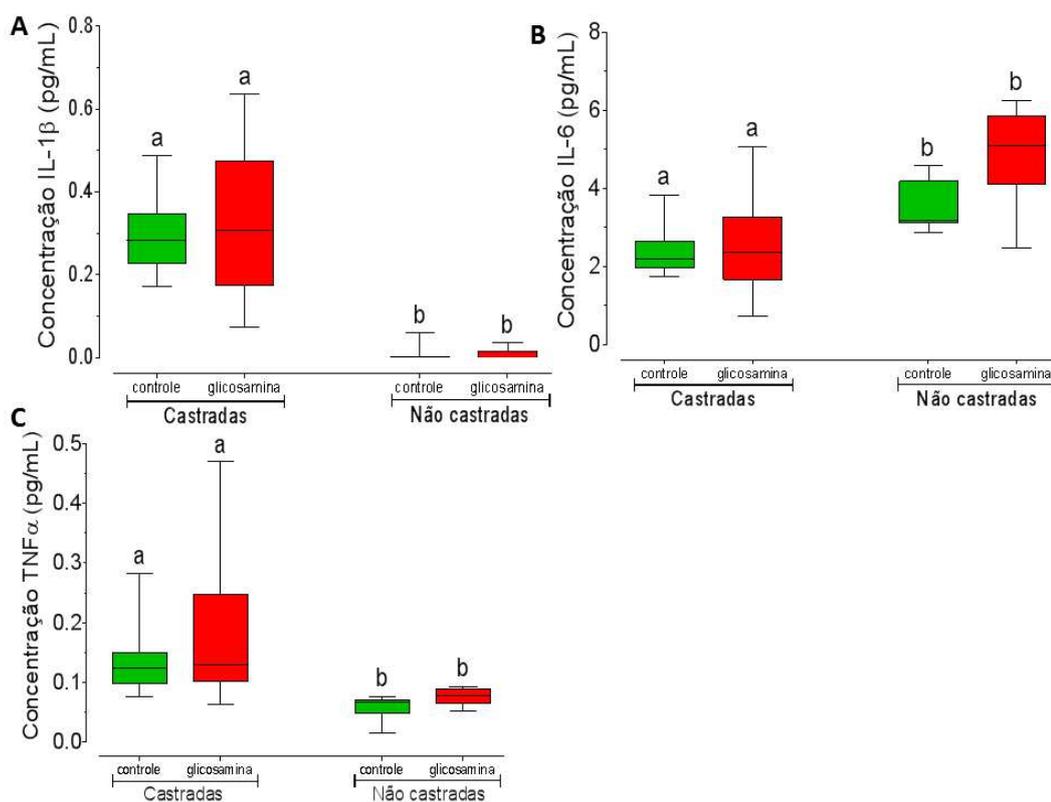


## 5.2 Níveis de citocinas

Para testar o nível de inflamação na ATM de ratos tratados, concentrações de citocinas foram determinados por ELISA. As Figuras 5 A, B e C mostram o efeito da glicosamina sobre a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ .

A concentração da citocina IL-1 $\beta$  foi baixa nas fêmeas não castradas, e significativamente menor do que a concentração verificada nas fêmeas castradas, indicando que a castração por si só já foi potente indutor dessa citocina. Não houve diferenças estatisticamente significantes ( $p>0.05$ ) na citocina entre as fêmeas castradas que receberam ou não sulfato de glicosamina (Figura 5 - A).

**Figura 5. A - Concentração da citocina IL-1 $\beta$ . B - Concentração da citocina IL-6. C - Concentração da citocina TNF- $\alpha$ . Linha central=mediana; caixa= 1° e 3° quartis; suíças=valores máximo e mínimo.**



*Letras distintas significam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ ).*

A citocina IL-6 mostrou maiores concentrações nas fêmeas não castradas do que nas castradas, independentemente de receberem ou não sulfato de

glicosamina. Também não houve efeito da glicosamina sobre a concentração da IL-6, tanto nas fêmeas castradas quanto nas não castradas (Figura 5 - B).

Já a citocina TNF $\alpha$  estava aumentada nas fêmeas castradas, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações daquelas que receberam ou não sulfato de glicosamina. Entretanto, nas fêmeas castradas e não castradas, a glicosamina não alterou a concentração de TNF- $\alpha$  quando comparada com o grupo controle. De qualquer forma, as concentrações dessa citocina foi significativamente maior nas fêmeas castradas do que naquelas não castrada (Figura 5 - C).

## 6 DISCUSSÃO

Diferentes protocolos usando estradiol em modelos de ratos, para lesões da articulação temporomandibular (ATM) foram encontrados na literatura, especialmente em relação à dor e inflamação. Alguns estudos mostram a influência de estrogênio ou sua deficiência em disfunção temporomandibular (DTM). (Yasuoka *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2014; Kou *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2018). No entanto, não há consenso na literatura sobre esta questão.

Os efeitos anti-inflamatórios dos hormônios esteroides gonadal têm sido demonstrados. Níveis fisiológicos de testosterona e estrogênio foram relatados para reduzir danos na organização reticular, diminuir a perda de colágeno e glicosaminoglicanos em matriz extracelular devido à sua atividade anti-inflamatória e antioxidante (Ganesan *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2007).

A concentração de 17beta-estradiol em ratas ovariectomizadas (OVX) é geralmente três a quatro vezes menores do que em ratas controle (estro), (Al-Rahbi *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2013). Outros estudos mostram que os hormônios esteroidais inibem a secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ou células estromais (Ganesan *et al.*, 2008; Kramer *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2005). No presente estudo, os níveis de citocinas pró-inflamatórias mostraram um aumento devido à castração, provavelmente devido a uma diminuição extrema nos hormônios gonodal.

Em nosso estudo, os níveis de TNF-alfa estão aumentados nas ratas ovariectomizadas, este resultado mostra que a ausência de estradiol aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Além do aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, deficiência de estrogênio tem sido associada à perda óssea, e tratamento com estrogênio bloqueia esses efeitos (Mundy 2007).

A IL-6 é produzida pela ação da TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , as quais são secretadas pelos sinoviócitos (Kacena *et al.*, 2001). É uma citocina com atuação tanto na resposta imune-inata como na resposta adaptativa, sendo sintetizada por monócitos, células estromais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos (Souza *et al.*, 2008). A IL-6 é expressa em baixos níveis na homeostase e aumenta durante a infecção, trauma e outros estímulos estressantes (Ershler *et al.*, 2000). Em nosso estudo, a IL-6 mostrou aumentada nas ratas controle (sham), e diminuiu nos grupos OVX quando comparado com o grupo controle.

Ao contrário da IL-6, os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  aumentaram nos grupos OVX, indicando que outros fatores podem ter influenciado os níveis de IL-6. O nível de IL-6 tem um acentuado aumento na presença de 17 $\beta$ -estradiol. Estudos consistentes mostram que os hormônios gonadais são essenciais para aumentar a liberação da IL-6 em ratas (Figueroba *et al.*, 2015). Outros estudos mostraram a influência de estrogênio ou sua deficiência em DTM (Yasuoka *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2014; Kou *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2018). No entanto, não há consenso na literatura sobre esta questão.

O estrogênio em concentrações fisiológicas desempenha um papel importante na remodelação da ATM, especialmente na cartilagem articular. O aumento da expressão de estrogênio induz o desenvolvimento de DTM, e deficiência de estrogênio provoca aumento na remodelação óssea com aumento de osso aposição / reabsorção (Abubaker *et al.*, 1996).

No presente estudo, a espessura da camada fibrosa mostrou-se diminuída e a morfologia apareceu irregular com zonas de remodelação e em zonas aparentes nas ratas OVX. Além disso, um aumento na espessura da camada hipertrófica foi observado nesses animais, esse aumento pode estar associado a um aumento na diferenciação e maturação do número de condrócitos da cartilagem condilar. Achados similares de aumento da espessura da cartilagem condilar nas camadas proliferativa, madura e hipertróficas em ratas OVX foram relatados em estudos anteriores (Chen *et al.*, 2014). Esse aumento no grupo OVX da espessura da cartilagem condilar e no número de células da cartilagem (condrócitos) é devido à ausência de estradiol.

Em animais em crescimento, as camadas e células da cartilagem condilar são revertidos pelo estradiol. Estudos relatam que o estradiol acelera o processo de diferenciação celular e de calcificação da cartilagem condilar sendo estes efeitos mais proeminentes no sexo feminino (Chen *et al.*, 2014a; Kamiya *et al.*, 2013).

## Tratamento Glicosamina

O tratamento com sulfato de glicosamina não influenciou no tamanho da espessura total da cartilagem articular nos animais dos grupos controle e OVX. A ação anti-inflamatória do sulfato de glicosamina é conhecida por inibir a atividade de metaloproteinase, liberação de PGE2, produção óxido nítrico, e degradação de glicosaminoglicanos. O sulfato de glicosamina estimula a síntese de ácido hialurônico, colágeno na cartilagem articular e inibi a liberação de prostaglandina (du Souich, 2014; Henrotin & Lambert, 2013).

Em nosso estudo, a ação anti-inflamatória do sulfato de glicosamina, determinado pelo nível de citocinas não mostrou diferenças dentro dos grupos.

Nossos resultados concebivelmente sugerem que a cartilagem articular e a matriz óssea do côndilo da mandíbula podem ser um alvo dos efeitos do sulfato de glicosamina, apesar de não encontrarmos diferença entre os ratos tratados e não tratados com glicosamina 21 dias após a ovariectomia. No entanto, este efeito pode ocorrer após um período mais prolongado da castração com maior diminuição no nível de estrogênio (Maganhin *et al.*, 2007). Esse tipo de fármaco tem uma ação tardia na cartilagem articular e precisa ser aplicado por pelo menos 30 dias (Morelli *et al*, 2003), apesar desse relato em nosso estudo optamos por sete dias por causa das diferenças morfológicas da ATM.

Podemos observar mudanças em algumas camadas da cartilagem articular da ATM, aumento na camada hipertrófica e uma tendência de aumento nas camadas fibrosa e proliferativa. Ensaios clínicos mostram que a administração de sulfato de glicosamina produz uma mudança benéfica na osteoartrite sugerindo ter um efeito condroprotetor, o que pode resultar em um significativo atraso na progressão da doença (Bruyere *et al.*, 2004). Podemos observar pelo aumento da densidade de cor na análise histológica da cartilagem articular da ATM concentrações aumentadas de proteoglicanos nos animais OVX tratados com glicosamina, e também um aumento no número de condrócitos proliferativos e hipertróficos. Nilsson & Baron (2005), mostraram que a localização histoquímica de ácido hialurônico está diretamente correlacionado com a área total de condrócitos, e que o sulfato de glicosamina pode estimular condrócitos hipertróficos a aumentar a síntese de proteoglicanos e ácido hialurônico adicional. Esse aumento nas

concentrações de proteoglicanos em animais tratados com sulfato de glicosamina foi observado em outro estudo (Figueroba *et al.*, 2018).

A destruição do tecido articular induz a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, no espaço articular (Damlar *et al.*, 2015). Estas citocinas, produzidas por macrófagos e monócitos, induzem a liberação de protease e aumenta a degradação da cartilagem articular por depleção de proteoglicano (Kardel *et al.*, 2003). Ambas as isoformas de IL-1 estão presentes no processo inflamatório, a IL-1 $\alpha$  sendo mais ativa na fase inicial e IL-1 $\beta$  mais na fase tardia (Figueroba *et al.*, 2014b). No presente estudo, IL 1 $\beta$  não foi detectado nos animais controle não castrado e que receberam tratamento com glicosamina. Obviamente, a principal razão para a ausência de IL-1 $\beta$  foi a condição saudável das ATM, uma vez que o estresse mecânico não foi usado. Este resultado foi observado anteriormente em outros estudos semelhantes (Figueroba *et al.*, 2015; 2018). O nível de citocina TNF-alfa foi detectado anteriormente no líquido sinovial da ATM de indivíduos saudáveis, enquanto as citocinas IL-10, IL-1 $\beta$ , e a IL-6 pouco detectáveis (Kristensen *et al.*, 2014).

No presente estudo, o nível de IL-1 $\beta$  não mostrou diferenças entre os animais castrados tratados com/sem sulfato de glicosamina, em doses normais atua mais estimulando a produção de componentes da matriz da cartilagem articular do que inibindo os níveis e efeitos da interleucina-1 $\beta$  (Nakamura *et al.*, 2004).

No presente estudo, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  não tiveram seus níveis alterados pelo sulfato de glicosamina, podendo isso ser possível devido ao tempo de duração do estudo ou provavelmente a dose utilizada no estudo compatível com humano (normais), os níveis dessas citocinas foram inibidos de forma significativa pela glicosamina por dose dependente (Li *et al.*, 2018).

Estudos em ratas ovariectomizadas relatam o efeito benéfico da glicosamina, melhora da perda óssea, na prevenção de osteoartrite e no controle do aumento de peso corporal após castração (Asai *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

Não encontramos na literatura estudos envolvendo a articulação temporomandibular e sulfato de glicosamina em ratas castradas. Acreditamos que o nosso trabalho vem trazer algo novo sobre o efeito do sulfato de glicosamina nas articulações em especial ATM em mulheres na menopausa, pode ser uma terapia de

aumento de proteoglicanos e na longevidade da cartilagem articular, novos estudos são necessários quem sabe com aumento da dose e tempo de tratamento.

## **7 CONCLUSÃO**

Nas condições testadas o sulfato de glicosamina não interfere no nível das citocinas avaliadas nos animais castrados e não castrados, porém promove um aumento na espessura da cartilagem condilar da ATM.

## REFERÊNCIAS

1. Abubaker AO, Hebda PC, Gunsolley JN. Effects of sex hormones on protein and collagen content of the temporomandibular joint disc of the rat. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996;54:721–7.
2. Al-Rahbi B, Zakaria R, Othman Z, Hassan A, Muthuraju S, Wan Mohammad WM. Mood and memory function in ovariectomized rats exposed to social instability stress. *Biomed Res Int.* 2013;2013:493643.
3. Alstergren P, Kopp S. Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58:180–6.
4. Asai H, Nakatani S, Kato T, Shimizu T, Mano H, Kobata K, Wada M. Glucosamines Attenuate Bone Loss Due to Menopause by Regulating Osteoclast Function in Ovariectomized Mice. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(6):1035-41.
5. Bag AK, Gaddikeri S, Singhal A, Hardin S, Tran BD, Medina JA, Curé JK. Imaging of the temporomandibular joint: An update. *World J Radiol.* 2014; 28;6(8):567-82.
6. Boling EP. Gender and osteoporosis: similarities and sex-specific differences. *J Gend Specif Med.* 2001;4:36-43.
7. Bruyere O, Pavelka K, Rovati LC, Deroisy R, Olejarova M, Gatterovva J, et al. Glucosamine sulfate reduces osteoarthritis progression in postmenopausal women with knee osteoarthritis: evidence from two 3- year studies. *Menopause.* 2004;11:138-43.
8. Chen J, Kamiya Y, Polur I, Xu M, Choi T, Kalajzic Z, et al. Estrogen via estrogen receptor beta partially inhibits mandibular condylar cartilage growth. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014a;22:1861–8.
9. Chen K, Zhang N, Ding L, Zhang W, Hu J, Zhu S. Early intra-articular injection of alendronate reduces cartilage changes and sub-chondral bone loss in rat temporomandibular joints after ovariectomy. *Int J Oral Maxillo-fac Surg.* 2014;43:996–1004.
10. Christgau S, Tanko LB, Cloos PA, Mouritzen U, Christiansen C, Delaisse JM, et al. Suppression of elevated cartilage turnover in postmenopausal women and in

- ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen receptor modulator (SERM). *Menopause*. 2004;11:508-18.
11. Conner P. Breast response to menopausal hormone therapy-aspects on proliferation, apoptosis and mammographic density. *Ann Med*. 2007;39:28-41.
  12. Damlar I, Esen E, Tatli U. Effects of glucosamine–chondroitin combination on synovial fluid IL-1b, IL-6, TNF-a and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:278–83
  13. Delaney MF. Strategies for the prevention and treatment of osteoporosis during early postmenopause. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:S12-23.9.
  14. du Souich P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAs. *Pharmacol Ther*. 2014;142:362–74.
  15. Ershler WB, Keller ET. Age-associated in-creased interleukin-6 gene expression, late life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 2000;51:245–70.
  16. Figueroba SR, Desjardins MP, Nani BD, Ferreira LE, Rossi AC, Santos FA, Venâncio PC, Aguiar FH, Groppo FC, Effect of diazepam on temporomandibular joints in rats with increased occlusal vertical dimension. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014a;52(5):438-44.
  17. Figueroba SR, Desjardins MP, Ferreira LE, Berto LA, Valdrighi HC, Groppo FC. The influence of altered occlusion on pro-inflammatory cytokine levels in the TMJ synovial tissues of rats. *Arch Oral Biol*. 2014b;59:1164-1171.
  18. Figueroba SR, Franco GC, Omar NF, Groppo MF, Groppo FC. Figueroba SR, Franco GC, Omar NF, Groppo MF, Groppo FC. Dependence of cytokine levels on the sex of experimental animals: a pilot study on the effect of oestrogen in the temporomandibular joint synovial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(11):1368-75.
  19. Figueroba SR, Groppo MF, Faibish D, Groppo FC The action of anti-inflammatory agents in healthy temporomandibular joint synovial tissues is sex-dependent. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018;47(2):205-213.
  20. Fischer L, Clemente JT, Tambeli CH. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. *J Pain*. 2007;8:437–42.
  21. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, et al. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346:904-910.
  22. Galal N, El Beialy W, Deyama Y, Yoshimura Y, Yoshikawa T, Suzuki K, et al.

- Effect of estrogen on bone resorption and inflammation in the temporomandibular joint cellular elements. *Int J Mol Med*. 2008;21:785–90.
23. Ganesan K, Tiwari M, Balachandran C, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Estrogen and testosterone attenuate extracellular matrix loss in collagen-induced arthritis in rats. *Calcif Tissue Int*. 2008;83:354–64.
  24. Ghurye S, McMillan R. Pain-related temporomandibular disorder - current perspectives and evidence-based management. *Dent Update*. 2015;Jul-Aug;42(6):533-6, 539-42, 545-6.
  25. Haghghat A, Behnia A, Kaviani N, Khorami B. Evaluation of Glucosamine sulfate and Ibuprofen effects in patients with temporomandibular joint osteoarthritis symptom. *J Res Pharm Pract*. 2013;Jan2(1):34-9.
  26. Henrotin Y, Lambert C. Chondroitin and glucosamine in the management of osteoarthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15:361.
  27. Hukkanen M, Platts LA, Lawes T, Girgis SI, Konttinen YT, Goodship AE, et al. Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency induced osteopenia. *Bone*. 2003;32:142-9.
  28. Jiang Z, Li Z, Zhang W, Yang Y, Han B, Liu W, Peng Y. Dietary Natural N-Acetyl-d-Glucosamine Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *Molecules*. 2018;Sep 9;23(9). pii: E2302.
  29. Kacena MA, Merrel GA, Konda SR, Wilson KM, Xi Y, Horowitz MC. Inflammation and bony changes at the temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs*. 2001;169:257-64.
  30. Kamiya Y, Chen J, Xu M, Utreja A, Choi T, Drissi H, et al. Increased mandibular condylar growth in mice with estrogen receptor beta deficiency. *J Bone Miner Res*. 2013;28:1127–34.
  31. Kaneyama K, Segami N, Sato J, Nishimura M, Yoshimura H. Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004;42: 246–50.
  32. Kaneyama K, Segami N, Sun W, Sato J, Fujimura K. Analysis of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99:276-84..

33. Kardel R, Ulfgren AK, Reinholt FP, Holm-lund A. Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with painful clicking and osteoarthritis in the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32:390–6.
34. Kawasaki T, Ushiyama T, Inoue K, Hukuda S. Effects of estrogen on interleukin-6 production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18:743–5.
35. Kenny AM and Raisz LG. Mechanisms of bone remodeling: implications for clinical practice. *J Reprod Med.* 2002;47:63-70.
36. Kostrzewa-Janicka J, Mierzwinska-Nastalska E, Jurkowski P, Okonski P, Nedzi-Gora M. Assessment of temporomandibular joint disease. *Adv Exp Med Biol.* 2013;788:207-11.
37. Kou XX, Wu YW, Ding Y, Hao T, Bi RY, Gan YH, et al. 17 $\beta$ -Estradiol aggravates temporomandibular joint inflammation through the NF- $\kappa$ B pathway in ovariectomized rats. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1888–97.
38. Kramer PR, Kramer SF, Guan G. 17 Beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1967–75.
39. Kristensen KD, Alstergren P, Stoustrup P, Kušseler A, Herlin T, Pedersen TK. Cytokines in healthy temporomandibular joint synovial fluid. *J Oral Rehabil.* 2014;41:250–6.
40. Latt RH. Drug dosages for laboratory animals. In: Melby Jr EC, Altman NH Eds. *Cleveland: Handbook of laboratory animal science.* CRC Press. 1976; 561-68.
41. Maganhin CC, Correa O, Regina Ct G, Simões R, Baracat EC, Soares JM Jr. Effects of glucosamine on the tibial epiphyseal disk of ovariectomized rats: morphologic and morphometric analysis. *Clinics (Sao Paulo).* 2007;Oct62(5):607-12.
42. Li Y, Chen L, Liu Y, Zhang Y, Liang Y, Mei Y. Anti-inflammatory effects in a mouse osteoarthritis model of a mixture of glucosamine and chitooligosaccharides produced by bi-enzyme single-step hydrolysis. *Sci Rep.* 2018;Apr4;8(1):5624.
43. Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat.* 1988;133:192-99.
44. Morelli V, Naquin C, Weaver V. Alternative therapies for traditional disease states: osteoarthritis. *Ame Fam Phys.* 2003;67(2):339-44.
45. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev.* 2007;65:S147–51.

46. Nakamura H, Shibakawa A, Tanaka M, Kato T, Nishioka K. Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E2, nitric oxide and metalloproteases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22:293-9.
47. Naito K, Watari T, Furuhashi A, Yomogida S, Sakamoto K, Kurosawa H, Kaneko K, Nagaoka I. Evaluation of the effect of glucosamine on an experimental rat osteoarthritis model. *Life Sci*. 2010;86:538–43.
48. Nilsson O, Baron J. Impact of growth plate senescence on catchup growth and epiphyseal fusion Review. *Pediatr Nephrol*. 2005;20(3):319–22.
49. Puri J, Hutchins B, Bellinger LL, et al. Estrogen and inflammation modulate estrogen receptor alpha expression in specific tissues of the temporomandibular joint. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:155.
50. Qu N, Wang L, Liu ZC, Tian Q, Zhang Q. Oestrogen receptor a agonist improved long-term ovariectomy induced spatial cognition deficit in young rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16:1071–82.
51. Robinson JL, Soria P, Xu M, Vrana M, Luchetti J, Lu HH, Chen J, Wadhwa S. Estrogen Promotes Mandibular Condylar Fibrocartilage Chondrogenesis and Inhibits Degeneration via Estrogen Receptor Alpha in Female Mice. *Sci Rep*. 2018;Jun4;8(1):8527.
52. Russo IH and Russo J. Primary prevention of breast cancer by hormone induced differentiation. *Recent Results Cancer Res*. 2007;174:111-30.
53. Shorr E. A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science*. 1941;94:94.
54. Souza JR, Oliveira RT, Blotta MH, Coelho OR. Serum levels of IL-6, IL-18 and C-reactive protein in acute coronarian syndrome without ST supradepression in type II diabetes patients. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90:94–9.
55. Subramanian S, Tovey M, Afentoulis M, Krogstad A, Vandembark AA, Offner H. Ethinyl estradiol treats collagen induced arthritis in DBA/1LacJ mice by inhibiting the production of TNF- $\alpha$  and IL-1. *Clin Immunol*. 2005;115:162–72.
56. Sykes DB and Kamps MP. Estrogen-regulated conditional oncoproteins: tools to address open questions in normal myeloid cell function, normal myeloid differentiation, and the genetic basis of differentiation arrest in myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:1131-9.
57. Xu YS, Wang YM. "Preparation of D (+) glucosamine hydrochloride from crab

- shell". *Chemistry Adhesion*. 2004 pp: 4.
58. Yasuoka T, Nakashima M, Okuda T, Tatematsu N. Effect of estrogen replacement on temporomandibular joint remodeling in ovariectomized rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:189–96.
59. Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, et al. Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclasto genesis. *Endocrinology*. 2004;145:2384–91.
60. Yun KI, Chae CH, Lee CW. Effect of estrogen on the expression of cytokines of the temporomandibular joint cartilage cells of the mouse. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66:882–7.
61. Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells Tissues Organs*. 2001;169:187–92.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – Certificado do CEUA-UNICAMP



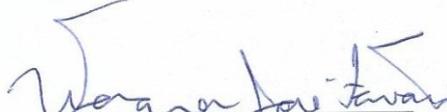
## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITO DO SULFATO DE GLICOSAMINA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATAS OVARIETOMIZADAS**, registrada com o nº **5016-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Jean Carlos Moreira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **09 de novembro de 2018**.

<b>Finalidade:</b>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência do projeto:</b>	04/02/2019-02/12/2019
<b>Vigência da autorização para manipulação animal:</b>	04/02/2019-02/12/2019
<b>Espécie / linhagem/ raça:</b>	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
<b>No. de animais:</b>	32
<b>Idade/Peso:</b>	03 meses / 300g
<b>Sexo:</b>	fêmeas
<b>Origem:</b>	CEMIB/UNICAMP
<b>Biotério onde serão mantidos os animais:</b>	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 09 de novembro de 2018.

  
 Prof. Dr. Wagner José Fávares  
 Presidente

  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

## ANEXO 2 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

### <EFEITO DO SULFATO DE GLICOSAMINA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS>

ORIGINALITY REPORT			
<b>30%</b>	<b>28%</b>	<b>24%</b>	<b>15%</b>
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
<b>1</b>	<a href="http://repositorio.unifesp.br">repositorio.unifesp.br</a> Internet Source		<b>4%</b>
<b>2</b>	<a href="http://www.termedia.pl">www.termedia.pl</a> Internet Source		<b>1%</b>
<b>3</b>	S.R. Figueroba, G.C.N. Franco, N.F. Omar, M.F. Groppo, F.C. Groppo. "Dependence of cytokine levels on the sex of experimental animals: a pilot study on the effect of oestrogen in the temporomandibular joint synovial tissues", International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2015 Publication		<b>1%</b>
<b>4</b>	<a href="http://docplayer.com.br">docplayer.com.br</a> Internet Source		<b>1%</b>
<b>5</b>	Sergio Varela Kellesarian, Abdulaziz A. Al-Kheraif, Fahim Vohra, Alexis Ghanem et al. "Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review", Cytokine, 2016 Publication		<b>1%</b>