

George Azevedo Lemos

**"INFLUÊNCIA DA TERAPIA COM LASER DE
BAIXA POTÊNCIA E HIALURONATO DE SÓDIO DE
ALTO PESO MOLECULAR NA ATM DE RATOS,
COM ARTRITE, APÓS INDUÇÃO POR CFA"**

Campinas, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

George Azevedo Lemos

**"INFLUÊNCIA DA TERAPIA COM LASER DE
BAIXA POTÊNCIA E HIALURONATO DE SÓDIO DE
ALTO PESO MOLECULAR NA ATM DE RATOS,
COM ARTRITE, APÓS INDUÇÃO POR CFA"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno *George Azevedo Lemos* e orientado pela Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari.

Assinatura da Orientadora



Campinas, 2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

- L544i Lemos, George Azevedo, 1988-
Influência da terapia com laser de baixa potência e hialuronato de sódio de alto peso molecular na ATM de ratos, com artrite, após indução por CFA / George Azevedo Lemos. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.
- Orientador: Evanisi Teresa Palomari.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Transtornos da articulação temporomandibular. 2. Artrite. 3. Lasers. 4. Viscosuplementação. I. Palomari, Evanisi Teresa, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of therapy with low-level laser and high molecular weight sodium hyaluronate in the TMJ of rats with induced arthritis by CFA

Palavras-chave em inglês:

Temporomandibular joint disorders

Arthritis

Lasers

Viscosupplementation

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Evanisi Teresa Palomari [Orientador]

Marcelo Rodrigues da Cunha

João Paulo Steffens

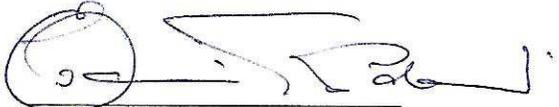
Data de defesa: 23-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 23 de fevereiro de 2015.

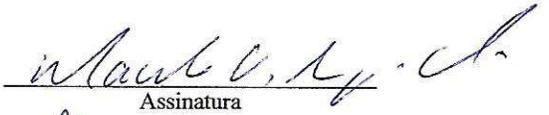
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha



Assinatura

Prof. Dr. João Paulo Steffens



Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Prof. Dr. Fabiano Politti

Assinatura

RESUMO

A Disfunção temporomandibular (DTM) é uma expressão coletiva que engloba vários sinais e sintomas clínicos relacionados aos músculos da mastigação, articulações temporomandibulares (ATMs) e estruturas associadas. As principais queixas relatadas são ruídos e dor na região da ATM, com maior prevalência em adultos jovens, especialmente mulheres. A inflamação intra-articular é considerada uma das mais importantes fontes de dor nesta disfunção. O processo inflamatório pode se localizar na membrana sinovial, cápsula articular ou tecidos retrodiscais, e na presença de alterações degenerativas articulares recebe o nome de artrite. Assim, o laser de baixa potência (LBP) e o hialuronato de sódio de alto peso molecular (HSAPM) tem sido utilizados para o tratamento de distúrbios inflamatórios da ATM e, resultados clínicos promissores têm sido descritos. Estudos experimentais, sob a óptica da biologia celular e molecular, fazem-se necessários para melhor compreensão de seus respectivos efeitos biológicos e elaboração de protocolos clínicos seguros. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a ação morfológica e bioquímica da terapia com LBP e HSAPM sobre a artrite induzida na ATM. Utilizou-se 48 ratos machos, *Wistar*, divididos nos grupos: GA, animais com artrite induzida por meio de injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund (CFA); GL, animais com artrite e tratados com LBP; GH, animais com artrite e tratados com HSAPM e; DHL, animais com artrite e tratados com LBP e HSAPM. Todos os experimentos ocorreram na ATM esquerda. As ATMs direitas no GA foram utilizadas como controle (GC). Foram realizadas análises morfológicas por meio de cortes corados em hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina e Picrosirius. Nos discos articulares, também foram realizadas análises histomorfométricas e birrefringência de fibras colágenas (microscopia de polarização). As análises bioquímicas dos tecidos da ATM foram realizadas por meio de dosagens de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) e zimografia para avaliação das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9. Os dados obtidos foram analisados por meio dos testes ANOVA one-way com pós-teste de Tukey e, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. O GA exibiu acentuadas alterações morfológicas nos componentes da ATM tais como: elevada espessura do disco articular; hiperplasia da membrana sinovial e formação de pannus; reabsorção óssea da fossa mandibular; aplainamento do côndilo mandibular e presença de intenso infiltrado de células inflamatórias mononucleares no tecido subsinovial. A microscopia de polarização mostrou menor birrefringência das fibras colágenas, indicando alto grau de desorganização das fibras colágenas. Os GL, GH e DHL apresentaram menor espessura do disco articular e maior birrefringência das fibras colágenas em comparação ao GA ($p < 0,05$). Na análise bioquímica, ficou demonstrado que a concentração de GAGs e atividades de MMP-2 e MMP-9 foram estatisticamente maiores no GA em comparação ao GC ($p < 0,05$). Os GL, GH e DHL exibiram menores atividades das isoformas ativas da MMP-2 e MMP-9 em comparação ao GA ($p < 0,05$). Com base nos resultados, concluiu-se que o LBP e HSAPM demonstraram efeitos anti-inflamatórios e protetores sobre as estruturas articulares. A terapia com uso simultâneo do LBP e HSAPM não foi superior aos respectivos tratamentos isolados.

Palavras-chaves: Transtornos da articulação temporomandibular. Artrite. Lasers. Viscosuplementação.

ABSTRACT

Temporomandibular disorder (TMD) is a collective term that encompasses several clinical signs and symptoms related to mastication muscles, temporomandibular joint (TMJ) and its associated structures. The main complaints reported are noise and pain at TMJ region showing higher prevalence in young adults, especially women. The intra-articular inflammation is considered one of the main sources of pain in the development of TMD. The inflammatory process may be located in the synovial membrane, articular capsule or retrodiskal tissues, and the presence of degenerative joint changes is called arthritis. Currently, Low-level laser (LLL) and high molecular weight sodium hyaluronate (HMWSH) have been used for treating TMJ disorders and promising clinical results have been reported. Experimental studies, from the perspective of cellular and molecular biology, are needed for better understanding of their respective biological effects allowing the development of secure clinical protocols. Thus, the aim of this study was to characterize the morphological and biochemical action of the therapy with LLL and HMWSH on a TMJ with induced arthritis. 48 male rats were divided into the following groups: GA, animals with arthritis induced by an intra-articular complete Freund's adjuvant (CFA) injection; GL, animals with arthritis treated with LLL; GH, animals with arthritis treated with HMWSH; and GHL, animals with arthritis treated with LLL and HMWSH. All experiments occurred in the left TMJ. The right TMJs in GA were used as controls (GC). Morphological analysis were performed using slices stained with hematoxylin-eosin (HE), toluidine blue and Picrosirius. Histomorphometric analysis and quantification of birefringence collagen fibers (polarization microscopy) were performed on the articular disc. The biochemical analysis of the TMJ tissues were performed by dosing sulfated glycosaminoglycans (GAGs) and zymography to assess the matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9. Data were statistically analyzed using the one-way ANOVA test with the Tukey's post hoc test and Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's post hoc test. GA exhibited marked morphological changes in the components of the TMJ such as thickness of the joint disk; hyperplasia of the synovial membrane and pannus formation; bone resorption of mandibular fossa; flattening of the mandibular condyle and the presence of intense inflammatory infiltrate of mononuclear cells in the subsynovial tissue. The polarization microscopy showed lower birefringence of collagen fibers, indicating a high degree of collagen fibers disorganization. The GL, GH and GHL showed narrower articular disc and higher birefringence of collagen fibers compared to GA ($p < 0,05$). In biochemical analysis, it was demonstrated that the concentration of GAGs and MMP-2 and MMP-9 activities were statistically higher in GA compared to GC ($p < 0,05$). The GL, GH and GHL showed lower activity of the active isoform of MMP-2 and MMP-9 in comparison to GA ($p < 0,05$). Based on the results, it is concluded that The LLL and HMWSH demonstrated anti-inflammatory and protective effects on joint structures. Therapy with concurrent use of LLL and HMWSH was not superior to the respective single treatments.

Keywords: Temporomandibular Joint Disorders. Arthritis. Lasers. Viscosupplementation

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
EPÍGRAFE.....	xiii
DEDICATÓRIA	xv
AGRADECIMENTOS	xvii
AGRADECIMENTO ESPECIAL.....	xix
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE ANEXOS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Disfunção temporomandibular (DTM)	3
2.2 Matriz de Metaloproteinases (MMPs)	8
2.3 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos sulfatados	9
2.4 Modelo animal de inflamação na ATM induzida por Adjuvante Completo de Freund	11
2.5 Laser de Baixa Potência	12
2.6 Hialuronato de Sódio (HS).....	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivos específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Planejamento Experimental	17
4.1.1 Animais da pesquisa	17
4.2 Grupos Experimentais.....	17
4.3 Indução de Artrite na ATM.....	18
4.4 Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP).....	19
4.5 Terapia com Hialuronato de Sódio de alto peso molecular (HSAPM).....	20
4.6 Terapia com LBP e HSAPM.....	22

4.7	Eutanásia dos animais	22
4.8	Análise Morfológica.....	22
4.8.1	Coloração em Hematoxilina-eosina (HE).....	23
4.8.2	Morfometria do Disco Articular	23
4.8.3	Coloração em Picrosirius	24
4.8.4	Análise da birrefringência de fibras colágenas	25
4.8.5	Coloração em Azul de Toluidina (AT)	26
4.9	Análise bioquímica e molecular.....	26
4.9.1	Extração de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) da Matriz Extracelular.....	26
4.9.2	Dosagem de GAGs sulfatados	27
4.9.3	Zimografia	27
4.10	Análise Estatística	28
5.	RESULTADOS	30
5.1	Análise Morfológica.....	30
5.1.1	Coloração em Hematoxilina-esosina (HE)	30
5.1.2	Morfometria do Disco Articular	33
5.1.3	Coloração em Picrosirius e Birrefringência das fibras colágenas.....	34
5.1.4	Coloração em Azul de Toluidina (AT)	36
5.2	Análise Bioquímica.....	40
5.2.1	Dosagem de GAGs Sulfatados	40
5.2.2	Zimografia	41
6.	DISCUSSÃO	43
6.1	Morfologia e morfometria da ATM	43
6.2	Organização e compactação da rede de fibras colágenas.....	47
6.3	Proteoglicanos e GAGs sulfatados.....	48
6.4	Atividade das Gelatinases (MMP-9 e MMP-2)	50
7.	CONCLUSÃO	53
8.	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO	69

**“Ambiciono que o idioma em que eu te falo
Possam todas as línguas decliná-lo
Possam todos os homens compreendê-lo”.**

(Augusto dos Anjos)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os animais de laboratório, especialmente àqueles que através de seu sacrifício permitiram o desenvolvimento deste estudo.

A eles todo o meu respeito, carinho e sincera gratidão...

“Aos estudar as características e a índole dos animais,
encontrei um resultado humilhante para mim”.

(Mark Twain)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e paciência ao longo de toda esta caminhada.

Aos meus pais, Jorge Lemos e Antônia Azevedo Lemos, pela força e dedicação. Sofremos juntos e juntos estamos vencendo todas as adversidades.

À minha noiva Pâmela Lopes Pedro da Silva, pelo companheirismo e apoio irrestrito durante todo esse tempo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realizar esta dissertação e concretizar um sonho.

À CAPES pela bolsa de mestrado

À Fapesp pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa (processo 2013/21984-9).

À empresa IBRAMED por ceder o equipamento de laser (laserpulse), permitindo a realização deste estudo.

Aos meus amigos do departamento, Renato Rissi, Lucas de Souza, Ana Cláudia de Souza e Catharina Nucci, pela amizade, ensinamentos e apoio em todos os momentos.

Ao professor Edson Rosa Pimentel, pelos valiosos ensinamentos, sugestões e auxílio durante a realização desta dissertação.

Aos alunos do laboratório de Análises Bioquímicas de Matriz Extracelular, Andrea Aro, Letícia Prado de Oliveira, Marcos dos Santos de Almeida e Cristiano Vieira pelos ensinamentos e ajuda na realização dos diferentes experimentos.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta, pela valiosa ajuda na realização dos experimentos realizados nesta dissertação.

Aos funcionários do Instituto de Biologia, Walter Ferreira, Paulo Francisco dos Santos, Marco Aurélio Ribeiro de Paula e Norivaldo Celestino, pela amizade, paciência e acolhimento.

Aos membros da banca pela disponibilidade e disposição em participar da avaliação desta dissertação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora profa Dra Evanisi Teresa Palomari, pela confiança depositada, amizade e valiosos ensinamentos que levarei por toda a vida.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	18
Figura 2: Injeção intra-articular de CFA na ATM esquerda.....	19
Figura 3: Aplicação do LBP	20
Figura 4: Cronograma de aplicação do LBP.....	20
Figura 5: Cronograma de tratamento com HSAPM	21
Figura 6: Injeção intra-articular de HSAPM.....	21
Figura 7: Fotomicrografia da ATM mostrando os locais de mensuração da espessura do disco articular nas regiões anterior (A), média (M) e posterior (P). Aumento de 4X.	24
Figura 8: Fotomicrografia da ATM mostrando as áreas analisadas nas regiões anterior (A), média (M) e posterior (P) do disco articular (retângulos vermelho). Aumento de 4X.....	25
Figura 9: Imagens histológicas da ATM. Coloração em HE.....	31
Figura 10: Imagens histológicas da ATM. Coloração em HE.....	32
Figura 11: Morfometria do disco articular (espessura em μm) nos diferentes grupos experimentais.....	33
Figura 12: Imagens histológicas da ATM. Coloração em Picrosirius (Microscopia de polarização).....	35
Figura 13: Valores de birrefringência das fibras colágenas (valores da média de cinza em pixels) nos diferentes grupos experimentais.....	36
Figura 14: Imagens histológicas do disco articular da ATM (Região Anterior). Coloração em Azul de Toluidina.. ..	37
Figura 15: Imagens histológicas do disco articular da ATM (Região Média). Coloração em Azul de Toluidina.. ..	38
Figura 16: Imagens histológicas do disco articular da ATM (Região Posterior). Coloração em Azul de Toluidina.. ..	39
Figura 17: Concentração de GAGs (mg/g de tecido seco) nos diferentes grupos experimentais.....	40
Figura 18: Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondentes às isoformas da MMP-9 (Ativa e Latente) nos diferentes grupos experimentais.....	41

Figura 19: Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondentes às isoformas da MMP-2 nos diferentes grupos experimentais..	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAOP – American Academy of Orofacial Pain

AT – Azul de Toluidina

ATM – Articulação Temporomandibular

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – Soro de Albumina Bovina

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Adjuvante Completo de Freund

COX-2 – ciclooxigenase-2

DMMB – Azul de Dimetilmetileno

DTM – Disfunção Temporomandibular

EDTA – Ácido Tetra-acético-etileno-diamino

GaAIs – Arseneto de Gálio e Alumínio

GAGs – Glicosaminoglicanos Sulfatados

GA– Grupo de animais com artrite induzida por meio de CFA

GC– Grupo controle

GL– Grupo de animais com artrite e tratados com laser de baixa potência

GH– Grupo de animais com artrite e tratados com hialuronato de sódio de alto peso molecular

GHL– Grupo de animais com artrite e tratados com hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência

HE – Hematoxilina-eosina

HS– Hialuronato de Sódio

HSAPM – Hialuronato de Sódio de Alto Peso Molecular

IFN- γ – Interferon-gama

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-12 – Interleucina 12

IL-17 – Interleucina 17

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Indutível

LBP – Laser de Baixa Potência

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metaloproteinase de matriz

MMP-1 – Metaloproteinase 1

MMP-2 – Metaloproteinase 2

MMP-3 – Metaloproteinase 3

MMP-9 – Metaloproteinase 9

MMP-13 – Metaloproteinase 13

NaCl – Cloreto de Sódio

NGF – Fator de Crescimento Nervoso

PGs – proteoglicanos

PGE2 – Prostaglandina E2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

Tris-HCl – (hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A articulação temporomandibular (ATM) é caracterizada por ser uma diartrose, bilateral, que une a mandíbula ao osso temporal e seus côndilos, localizados nos extremos mandibulares, trabalham simultaneamente (OLIVEIRA, 2008).

A ATM é constituída pela parte anterior da fossa mandibular do osso temporal, tubérculo articular e côndilo da mandíbula (GRAY; GOSS, 1988; OLIVEIRA, 2008). Um disco fibroso, intra-articular, divide essa importante articulação em dois compartimentos: superior (supradiscal ou suprameniscal) e inferior (infradiscal ou inframeniscal), caracterizando-a como uma junta complexa (GARDNER; GRAY; O'RAHILLY, 1975). Cada ATM possibilita movimentos de dobradiça (abertura e fechamento mandibular) em um plano e movimentos de deslizamento em outro plano (OKESON, 2008), caracterizando-se, portanto, como uma combinação de gínglimo e junta plana (GRAY; GOSS, 1988).

Assim como outras articulações de suporte de cargas articulares, a ATM está sujeita a uma variedade de processos moleculares potencialmente prejudiciais que podem ser precipitados pelo uso excessivo ou distúrbios sistêmicos (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995).

De acordo com a *American Academy of Orofacial Pain* (AAOP, 2010) cerca de 40 a 75% da população adulta apresenta ao menos um sinal clínico de disfunção temporomandibular (DTM), e a dor constitui a principal queixa relatada (DE LEEUW, 2010). A dor pode ser verificada nos músculos da mastigação, região da ATM e auricular, sendo agravada pela mastigação ou outros movimentos mandibulares (DE LEEUW, 2010; GONÇALVES et al., 2010; HILGENBERG et al., 2012).

A inflamação é considerada uma das principais fontes de dor na ATM (TAKEDA et al., 2005; YAMAZAKI et al., 2008) e seus principais fatores etiológicos são o trauma direto ou indireto, irritação, infecção ou associação com outros distúrbios da ATM, tais como os desarranjos do disco articular (DE LEEUW, 2010). O processo inflamatório pode localizar-se na membrana sinovial (sinovite), cápsula articular (capsulite) e tecidos retrodiscais (retrodiscite), ou ainda, associado a processo degenerativo (artrite) e poliartrite sistêmica (OLIVEIRA, 2008).

Atualmente diversos tratamentos são utilizados com o objetivo de controlar a dor, reduzir a sobrecarga adversa, restaurar a função e retomar as atividades diárias normais em indivíduos com DTM. Métodos conservadores de tratamento são comumente indicados na fase inicial dessa disfunção, em detrimento a terapias mais agressivas e irreversíveis, tais como a cirurgia e o ajuste oclusal (GUARDA-NARDINI et al., 2004; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; DE LEEUW, 2010; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010).

Nesse sentido, as terapias com o laser de baixa potência (LBP) e hialuronato de sódio de alto peso molecular (HSAPM) têm avançado no tratamento das DTMs (DE LEEUW, 2010). Sugere-se o LBP e o HSAPM tenham propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e regenerativas sobre os tecidos articulares (FIKÁCKOVÁ et al., 2007; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010; DUYGU et al., 2011). Além disso, outros trabalhos têm demonstrado significativo efeitos do HSAPM como barreira protetora das estruturas da ATM, bloqueando mediadores pro-inflamatórios e enzimas com atividade colagenolítica (WANG et al. 2006; SHIMIZU et al., 2010; CAMPO et al., 2011; DUYGU et al., 2011). A literatura têm demonstrado efeitos positivos tanto do LBP como do hialuronato de sódio (HS) em desordens articulares e alterações degenerativo-inflamatórias na ATM, tais como redução da inflamação e avanços no processo de reparo dos tecidos afetados (GUARDA-NARDINI et al., 2004; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; CARVALHO et al., 2011; DUYGU et al., 2011). No entanto, os mecanismos biológicos a eles relacionados, ainda não foram totalmente esclarecidos. Com isso, o presente trabalho abordou o assunto no intuito de evidenciar os efeitos que o LBP e o HSAPM podem mostrar na artrite da ATM, e, conseqüentemente, orientar seu uso na prática clínica de forma adequada e sem riscos aos pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Disfunção temporomandibular (DTM)

A AAOP define DTM como uma expressão coletiva que engloba vários sinais e sintomas clínicos relacionados aos músculos da mastigação, às ATMs e estruturas associadas (DE LEEUW, 2010).

Os principais sinais e sintomas relatados são dor na região da ATM e à palpação muscular, dor de ouvido e outros sinais otológicos, ruídos articulares, desvios mandibulares, limitação da abertura bucal, cansaço e fadiga muscular, cefaleia, além de desgastes dentários (GAVISH et al. 2000; SANTOS et al., 2006; WINOCUR et al., 2006; GONÇALVES et al., 2010; HILGENBERG et al., 2012).

Os sintomas podem ser espontâneos ou, geralmente, agravados pela função. São, na maioria das vezes, unilaterais e, tipicamente, localizados na região do ouvido, ângulo da mandíbula, face e região temporal (OLIVEIRA, 2008).

Apesar dos sinais e sintomas de DTM serem relatados em todas as faixas etárias, a maior prevalência, de fato, ocorre na população de adultos jovens (PEDRONI; DE OLIVEIRA; GUARATINI, 2003; BONJARDIM, et al. 2009; GONÇALVES et al., 2010). Cerca de 68% dos indivíduos na faixa etária de 19 a 25 anos apresentam algum grau de severidade de DTM, sendo as mulheres mais afetadas (PEDRONI; DE OLIVEIRA; GUARATINI, 2003; OLIVEIRA et al., 2006). As razões pelas quais a prevalência de DTM em mulheres é maior em comparação aos homens continuam ainda controversas e, alguns fatores têm sido sugeridos como uma maior percepção do gênero feminino ao estímulo doloroso, maior prevalência de distúrbios psicológicos, diferenças fisiológicas (por exemplo variações hormonais) ou elevada preocupação com a saúde, levando a uma maior procura por tratamento (PEDRONI; DE OLIVEIRA; GUARATINI, 2003; DE LEEUW, 2010; MONTEIRO et al., 2010).

Ruídos articulares são relatados por cerca de 23 a 47% da população de adultos jovens e são, aproximadamente, duas vezes mais comuns em mulheres comparadas aos homens. Por outro lado, a dor articular é relatada em 16 a 45% desta população (GAVISH et al., 2000; WINOCUR et al., 2006; GONÇALVES et al., 2010) e a sensibilidade a

palpação muscular, presente em cerca de 23 a 43% (GAVISH et al., 2000; WINOCUR et al., 2006).

Em prevalência menor do que quando comparado a adultos, os sinais e sintomas de DTM também podem ser observados em crianças e, frequentemente, tendem a ser suaves e flutuantes (THILANDER et al., 2002, MERIGHI et al., 2007; RANIERI et al., 2007). Em contrapartida, em idosos a prevalência de DTM é baixa e pode ser hipoteticamente explicada por autorresolução da disfunção, caracterizada pelo processo de adaptação da articulação e remissão dos sintomas; ou pelo aparecimento de sintomas de doenças mais graves que a DTM desestimulando, portanto, a procura pelo tratamento (OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008).

Apesar de uma grande porcentagem da população apresentar algum tipo de sinal ou sintoma de DTM, apenas pequena parcela apresenta necessidade ativa de tratamento (PEDRONI; DE OLIVEIRA; GUARATINI, 2003; OLIVEIRA et al., 2006; BONJARDIM et al., 2009). De acordo com Oliveira (2008), a necessidade ativa de tratamento é caracterizada pela presença de sinais e sintomas moderados ou graves que levam os indivíduos afetados a procurarem ajuda profissional. Ainda segundo este autor, a necessidade passiva de tratamento reúne os sinais e sintomas leves de DTM, que não necessitam ser tratados. Estudos epidemiológicos em populações de não pacientes tem demonstrado que 9 a 18% tem uma necessidade ativa de tratamento (OLIVEIRA et al., 2006; BONJARDIM et al., 2009), enquanto que 40 a 54% desses indivíduos apresentam sintomas de DTM que não necessitam de medidas terapêuticas (PEDRONI; DE OLIVEIRA; GUARATINI, 2003; OLIVEIRA et al., 2006; BONJARDIM et al., 2009; MEDEIROS; BATISTA; FORTE, 2011).

Em relação à etiologia das DTMs, esta se caracteriza por ser multifatorial e complexa, requisitando tratamento multiprofissional e interdisciplinar (THILANDER et al., 2002). De acordo com a AAOP, os agentes etiológicos podem ser divididos nos fatores: predisponentes, que aumentam os riscos de DTM; iniciadores, que causam o seu estabelecimento e; perpetuantes, que interferem na cura ou progressão da DTM (DE LEEUW, 2010).

Estudos revelaram importantes associações entre as DTMs e fatores variados, dentre eles, estão: má oclusão, hiperatividade muscular, trauma direto ou indireto, estresse

emocional, ansiedade, depressão e hábitos parafuncionais (GAVISH et al., 2000; THILANDER et al., 2002; GAMEIRO et al., 2006; MONTEIRO et al., 2010). No entanto, a influência desses agentes etiológicos é controversa e não totalmente compreendida, o que torna relevante o aprimoramento de pesquisa nessa área.

Em virtude do conhecimento limitado das causas e da variedade de sinais e sintomas, que não são exclusivos das DTMs, a sua classificação se torna complexa (DELBONI; ABRÃO, 2005). Nesse sentido, a AAOP divide as DTMs em duas categorias: desordens dos músculos da mastigação e da ATM (LEEuw, 2010).

No que diz respeito às desordens musculares essas podem ser subdivididas em cinco categorias: cocontração protetora, sensibilidade dolorosa local, dor miofascial, mioespaço e mialgia centralmente mediada, sendo as quatro primeiras consideradas desordens miálgicas agudas e, a última, desordem miálgica crônica (OKESON, 2008). A dor miofascial também pode se tornar crônica em alguns pacientes (RAMMELSBERG et al., 2003; OKESON, 2008).

A mialgia (dor muscular) é a principal queixa relatada por pacientes com desordens musculares e, geralmente, está associada a atividades funcionais, como mastigação, deglutição e fala. Esta pode ser agravada pela palpação manual ou manipulação funcional dos músculos mastigatórios (OKESON, 2008).

Entre os mecanismos associados à dor muscular encontram-se: macrotrauma direto, microtrauma e modificação brusca da propriocepção, hiperatividade muscular, isquemia decorrente de contração isométrica voluntária prolongada, parafunção, estresse emocional e distúrbios do sono, tais com o bruxismo e apneia (OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008; DE LEEuw, 2010).

No que concerne às desordens funcionais da ATM, Okeson (2008) as subdivide em três categorias de diagnóstico: 1. desarranjos do complexo côndilo-disco (mau posicionamento do disco articular, deslocamento do disco com redução e deslocamento do elemento discal sem redução); 2. incompatibilidade estrutural das superfícies articulares (desvios na forma, aderências/adesões, subluxação e deslocamento espontâneo) e; 3. desordens inflamatórias da ATM (sinovites, capsulites, retrodiscites e artrites).

A presença de ruídos e dor articular são os sintomas mais relatados em pacientes com desordens da ATM (GAVISH et al., 2000; PEDRONI; DE OLIVEIRA; GUARATINI,

2003; WINOCUR et al., 2006; GONÇALVES et al., 2010), e a inflamação intra-articular é considerada uma das mais importantes fontes de dor no desenvolvimento das DTMs (YAMAZAKI et al., 2008; KRAMER et al., 2010; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014).

As desordens inflamatórias são caracterizadas por dor profunda e contínua, acentuada pela função, podendo produzir efeitos excitatórios centrais secundários, tais como dor referida, hiperalgesia e cocontração protetora aumentada (TAKEDA et al., 2005; OKESON, 2008; YAMAZAKI et al., 2008).

Em ATMs dolorosas, são verificados diversos mediadores inflamatórios, tais como: fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento nervoso (NGF) e óxido nítrico sintase indutível (iNOS), o que pode significar que estes mediadores desempenham um papel significativo durante diferentes estágios da inflamação, e no aparecimento e agravamento do processo inflamatório (SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; WANG et al., 2012).

A inflamação dos tecidos sinoviais da ATM é caracterizada como sinovite; ao passo que quando verificada nos ligamentos capsulares, denomina-se capsulite (DE LEEUW, 2010). Clinicamente, sinovite e capsulite apresentam sinais e sintomas parecidos e, portanto, dificilmente podemos diferenciá-las (OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008; DE LEEUW, 2010). Ambas são caracterizadas pela presença de dor constante na ATM, exacerbada pela função ou palpação articular, e ausência de alterações osteoartísticas extensas (LEEUW, 2010). Também pode ocorrer edema flutuante que reduz a capacidade de oclusão nos dentes posteriores ipsilateralmente (OKESON, 2008; DE LEEUW, 2010).

Outra desordem inflamatória relativamente comum na ATM é a inflamação dos tecidos retrodiscais, referida como redrodiscite, causada por uma compressão da região retrodiscal pelo côndilo mandibular, seja por deslocamentos de disco com ou sem redução e/ou traumas externos que deslocam a mandíbula posteriormente (OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008). A inflamação articular pode provocar um afastamento do disco e fossa mandibular, resultando em má oclusão aguda, com desocclusão dos dentes posteriores, ipsilateralmente e forte contato na região de caninos contralateralmente (OLIVEIRA, 2008).

As artrites, por sua vez, representam um grupo de desordens inflamatórias variáveis, nas quais são observadas alterações degenerativas articulares (MERCURI, 2006; TANAKA et al., 2008). Neste sentido, Okeson (2008) classificou as doenças artríticas da ATM em: osteoartrite, osteoartrose e poliartrites.

A osteoartrite é de fato o tipo mais comum de artrite que acomete a ATM (OKESON, 2008). É uma condição degenerativa caracterizada pela deterioração e abrasão do tecido articular, bem como remodelamento do osso subcondral subjacente devido à sobrecarga do mecanismo de remodelamento. A perda progressiva de cartilagem articular nessa doença resulta de um desequilíbrio entre os processos predominantemente reparadores, controlados pelos condrócitos, e os de degradação (DE LEEUW, 2010). O estágio adaptativo, no qual se observa alterações na forma e estrutura articulares com ausência de inflamação, é conhecido como osteoartrose (DWORKIN; LERESCHE, 1992; OKESON, 2008).

De acordo com Conti, Valle e Scolaro (2001) a etiopatogenia da osteoartrite pode ser influenciada por três fatores:

- Sobrecargas articulares excedendo a capacidade adaptativa do tecido normal, ocasionando uma falha biomaterial na rede de colágeno da matriz extracelular;
- Falhas no sistema interno de remodelamento controlado pelos condrócitos, provocando o desequilíbrio entre síntese e degradação de matriz extracelular pelos condrócitos e;
- Fatores extracartilaginosos como redução na quantidade/qualidade do líquido sinovial, alterações na membrana sinovial, microfraturas do osso subcondral ou alterações vasculares.

Também tem sido descrita uma resposta inflamatória complexa, envolvendo a síntese de citocinas por diferentes células sinoviais e inflamatórias que infiltram a articulação e tecidos retrodiscais (MERURI, 2008; VERNAL, et al., 2008). Neste sentido, diferentes tipos de citocinas pró-inflamatórias têm sido implicados na iniciação da degradação da matriz da cartilagem, sendo associada a diversas alterações osteoartríticas da ATM, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α , TNF- β e Interferon-gama (IFN- γ) (KYRKANIDES et al., 2007; VERNAL et al., 2008; GHASSEMI-NEJAD et al., 2011).

Outros estudos têm destacado o papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) na destruição do tecido conjuntivo associado com a osteoartrite, especialmente a MMP-2 e MMP-9 (ISRAEL et al., 1998; SRINIVAS et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006). Neste sentido, foram demonstradas associações existentes entre MMP-2 e/ou MMP-9 e a presença de mudanças inflamatórias e/ou aumento da degradação dos componentes da Matriz extracelular (MEC) em pacientes com osteoartrite da ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006).

Por outro lado, os eventos que conduzem ao acúmulo de mediadores pró-inflamatórios no espaço articular são multifatoriais, destacando-se o trauma crônico ou de sobrecarga, trauma agudo, mudanças relacionadas à idade e às doenças autoimunes (CHANG; ISRAEL, 2005). Estes mediadores podem aumentar a degradação de fibrocartilagem, estimulando a síntese de enzimas de degradação da matriz de populações celulares locais. Adicionalmente também podem alterar a síntese MEC e as interações célula-MEC, importantes para a condrogênese (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995). No entanto, o valor clínico e diagnóstico destes marcadores ainda precisa ser avaliado, uma vez que marcadores semelhantes estão presentes em outras doenças articulares (DE LEEUW, 2010).

2.2 Matriz de Metaloproteinases (MMPs)

As MMPs constituem uma família de endopeptidases dependentes de zinco, que degradam a MEC, e incluem as collagenases intersticiais (deterioram colágenos fibrilares); gelatinases (deterioram colágeno amorfo e fibronectina) e; estromelisinases (degradam uma série de outros componentes da MEC) (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000).

As MMPs são secretadas como isoformas latentes ou inativas (pro-MMPs) e se tornam ativas quando o seu pro-domínio latente é clivado pela ação de outras proteases presentes apenas no local da lesão, como por exemplo a plasmina (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000; CHU et al., 2006, HSIEH et al., 2008; GUERRA et al., 2013).

As gelatinases são membros da família das MMPs que degradam ativamente colágeno desnaturado e outros componentes da MEC, como o colágeno do tipo IV, elastina

e agregam (CLARK; MURPHY, 1999; LU et al., 2011) e, podem ser divididas em gelatinase-A (MMP-2) e gelatinase-B - MMP-9 (CHU et al., 2006; HSIEH et al., 2008).

A MMP-2 é sintetizada por células do tecido conjuntivo, principalmente fibroblastos, condrócitos e células da membrana sinovial e, apresentam papel essencial no remodelamento da MEC (MIZUI et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006). Já a MMP-9 é sintetizada, principalmente por leucócitos polimorfonucleares e associada a presença de processo inflamatório (MIZUI et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2002).

As gelatinases têm sido, particularmente, associadas à degradação da cartilagem articular e à presença de alterações osteoartíticas, inclusive na ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006). Neste sentido, Loreto et al. (2010) demonstraram elevada concentração de MMP-9 em discos articulares removidos de pacientes com osteoartrite da ATM. Outros estudos também demonstraram elevadas concentrações tanto de MMP-9 como de MMP-2 no fluido sinovial de pacientes com osteoartrite da ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001) e desarranjo do complexo cômulo-disco (deslocamento de disco com ou sem redução) (YOSHIDA et al., 2006).

As MMPs também podem direta ou indiretamente afetar a atividade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α . Ao mesmo tempo, essas citocinas estimulam a síntese, liberação e ativação de MMPs, potencializando, assim, a resposta inflamatória (PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004) observada na osteoartrite e em outros distúrbios inflamatórios da ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006).

2.3 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos sulfatados

Os glicosaminoglicanos (GAG) são polímeros lineares formados por unidades dissacarídicas repetidas, composta de ácido urônico (ácido glicurônico ou ácido idurônico) e uma hexosamina (glicosamina ou galactosamina) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). São subdivididos em dois grupos principais: GAGs sulfatados, que incluem o dermatam sulfatado, condroitim sulfatado, queratam sulfato e heperam sulfatado; e os GAGs não-

sulfatados, que incluem o ácido hialurônico (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Já os proteoglicanos (PGs) são constituídos por um eixo proteico, associado a um ou mais dos quatro tipos de GAGs sulfatados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), desempenhando funções variadas na MEC; incluindo funções estruturais, resistência à compressão e sinalização celular (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUIERA; CARNEIRO, 2008).

Na cartilagem, os PGs interagem com as cadeias de ácido hialurônico formando agregados altamente hidratados (agrecano), responsáveis pelo estado de gel da MEC e resistência à compressão (HARDINGHAM, 1999; GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os grupos ácidos dos PGs também interagem com os resíduos de aminoácidos básicos presentes nas fibras colágenas e desempenham importante ação na compactação e organização da MEC (MIZOGUCHI et al. 1998).

Estudos realizados em ATMs de porcos, demonstraram que o conteúdo total de GAGs no disco articular é aproximadamente de 5,3% do seu peso seco, sendo o condroitim sulfatado e dermatam sulfatado os GAGs mais abundantes (DETAMORE; ATHANASIOU, 2003; DETAMORE et al., 2005). Já em disco articulares de humanos, Kalpakci et al. (2011) demonstraram conteúdo de GAGs semelhante ao observado em suínos e maior concentração na região média do disco articular, que é sujeita a maior carga compressiva durante a mastigação (DETAMORE et al., 2005; WILLARD et al., 2012).

Apesar da pequena concentração de GAGs nos tecidos da ATM, os mesmos desempenham importantes funções, tais como propriedades compressivas, compactação das fibras colágenas, remodelamento da ATM e regulação da condrogênese (EMBREE et al. 2010; KIGA et al., 2011; KIGA, 2012).

Neste sentido, Paegle, Holmlund e Hjerpe (2003) descreveram significativa redução do conteúdo total de condroitim sulfatado em pacientes com osteoartrite da ATM, sugerindo degradação do tecido articular. Por outro lado, outros trabalhos mostraram significativo aumento da expressão PGs no disco articular de pacientes com distúrbios da ATM (PAEGLE; HOLMLUND; HJERPE, 2005; KIGA et al., 2011).

Acredita-se que nos estágios iniciais da osteoartrite, ocorre um aumento da síntese dos componentes da MEC, incluindo PGs, o que demonstra tentativa de reparo, entretanto,

com a evolução da doença é observada uma perda lenta e progressiva de PGs (PAEGLE; HOLMLUND; HJERPE, 2005). Além disso, um aumento da síntese de PGs também é observado após indução de processo inflamatório na ATM indicando papel fundamental na regeneração dos tecidos articulares (KIGA et al., 2011; KIGA, 2012).

2.4 Modelo animal de inflamação na ATM induzida por Adjuvante Completo de Freund

Tendo em vista a dificuldade da realização de estudos em humanos, por razões éticas ou técnicas, o desenvolvimento de modelos animais com artrite na ATM é fundamental para melhor entendimento dessa doença e, conseqüentemente, a investigação de novas terapias.

Vários modelos são utilizados no estudo experimental dos distúrbios inflamatórios da ATM e, agentes como formalina, carragenina, ovalbumina, IL-1 β e adjuvante completo de Freund (CFA) são empregados para indução de inflamação intra-articular (KAPILA et al., 1995; SPEARS et al., 2005; LAI et al., 2006; KRISTENSEN et al., 2008; KUCUK et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014).

Entre esses agentes, o CFA tem mostrado resultados satisfatórios na indução de inflamação aguda ou crônica na ATM, permitindo o desenvolvimento de alterações morfológicas semelhantes aos distúrbios inflamatórios que afetam esta articulação (HARPER et al., 2001; SPEARS et al., 2005; KUROKI et al., 2011; WANG et al., 2012; GEORGE et al., 2013).

O CFA é um adjuvante com antígeno, *Mycobacterium tuberculosis*, suspenso em óleo mineral (HARPER et al., 2001; SPEARS et al., 2005; GEORGE et al., 2013), capaz de promover uma resposta inflamatória articular intensa dependente de antígeno, com aumento da produção local e sistêmica de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (HARPER et al., 2001; SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; WANG et al., 2012).

Entre as alterações morfológicas causadas pela injeção intra-articular de CFA na ATM, podem ser observadas: extravasamento de plasma, presença de intenso infiltrado de

células inflamatórias mononucleares, aumento da espessura do disco articular, aumento da espessura da camada fibrosa da cartilagem condilar e hiperplasia da membrana sinovial, semelhantes as alterações descritas na artrite (WANG et al., 2012; GEORGE et al., 2013; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014).

Além das alterações morfológicas descritas, o CFA também é capaz de induzir o desenvolvimento de diversas anormalidades ósseas no côndilo mandibular e osso temporal, tais como osteofitose, erosão óssea e destruição da cartilagem articular e osso subcondral por até 14 dias após sua administração (KAMEOKA et al., 2009; KUROKI et al., 2011).

Como tratamento das desordens inflamatórias intra-articulares na ATM, várias terapias alternativas tem sido utilizadas, destacando-se o LBP e o HSAPM.

2.5 Laser de Baixa Potência

Recentemente a terapia com o laser de baixa potência (LBP) tem avançado no tratamento das DTMs. Acredita-se que o laser tenha propriedades bioestimuladoras nos tecidos, causando aumento do metabolismo celular, síntese de adenosina trifosfato (ATP), produção de ácidos nucleicos, matriz colagenosa, quimiotaxia, microcirculação e efeitos analgésicos por meio de irradiação direta sem resposta térmica (BJORDAL et al., 2003; BJORDAL et al., 2006; DE LEUW, 2010; CARVALHO et al., 2011).

Os resultados de um ensaio clínico placebo-controlado em 39 pacientes com DTM demonstraram efeitos promissores do LBP e o seu uso foi considerado uma importante alternativa de tratamento frente a outros métodos, tais como drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, placas oclusais e fisioterapia, por ser uma técnica de fácil aplicação e não invasiva (ÇETINER; KAHRAMAN; YÜCETAS, 2006). Já Fikácková et al. (2007), submeteram pacientes portadores de dor miofascial e artralgia a 10 sessões de irradiação com LBP de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) com doses de 10 J/cm² ou 15 J/cm² e verificaram melhora significativa nos sintomas, independente da dose aplicada.

Mazzetto, Hotta e Pizzo (2010) demonstraram significativa redução da sintomatologia dolorosa e maior amplitude dos movimentos mandibulares em pacientes

com DTM tratados com o LBP de GaAIs, 830 nm de comprimento de onda e dose de 5 J/cm² em 4 pontos em torno da ATM. Salmos-Brito et al (2013) também observaram resultados semelhantes, entretanto, utilizando uma dose de 8 J/cm².

Bjordal et al. (2003) revisaram os efeitos do LBP na inflamação crônica e concluíram que a dose entre 0,4 e 19 J e densidade de potência de 5 a 21 mW/cm² seriam capazes de reduzir a inflamação articular, sem comprometer o metabolismo de fibroblastos. Esses autores admitiram ainda que os parâmetros ópticos para o tratamento de distúrbios na ATM, para GaAIs infravermelhos (λ 830 nm), foram uma dose de 0,5 a 15 J por sessão e 15 a 105 mW/cm² de potência de saída. Além disso, a profundidade da ATM é de cerca de 2 mm, sendo totalmente irradiada por um laser com comprimento de onda de 830 nm. No entanto, a mesma revisão evidenciou uma grande diversidade nos protocolos de tratamentos e sugeriu que muitos autores investigam a ação clínica do laser sem ter uma hipótese de sua ação biológica nos tecidos.

Outra revisão sobre a utilização do LBP no tratamento das DTMs também evidenciou elevada heterogeneidade em relação ao tipo, frequência e duração das radiações dificultando as comparações entre os estudos e os parâmetros de tratamento não puderam ser padronizados (MAIA et al., 2012).

Estudos realizados em animais têm demonstrado efeitos positivos na redução de processo inflamatório na ATM induzido por diferentes agentes irritantes (KUCUK et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). Trabalho realizado em nosso laboratório demonstrou que o tratamento com o LBP foi capaz de impedir a degeneração do colágeno presente no disco articular e estimular sua síntese em ratos com doença articular degenerativa na ATM (GUERRA, 2009).

Bjordal et al. (2006) ressaltaram que o LBP pode modular o processo inflamatório pela ação dose-dependente, através da redução dos níveis de diferentes mediadores inflamatórios, tais como a prostaglandina E2 (PGE2), o TNF- α , IL-1 β e o fator ativado de plasminogênio, além da redução na expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2).

O LBP tem sido utilizado na prática clínica para o tratamento da dor relacionada à DTM, entretanto, seu mecanismo de ação e efeito anti-inflamatório na ATM permanece ainda pouco conhecido e estudos experimentais realizados em modelos animais são

necessários para compreensão destes mecanismos, a fim de sustentar seu uso de forma segura no tratamento das DTMs.

2.6 Hialuronato de Sódio (HS)

O ácido hialurônico é um polissacarídeo natural pertencente à família dos glicosaminoglicanos, enquanto o HS é o sal do ácido hialurônico natural purificado. Nas articulações sinoviais normais, o ácido hialurônico mantém a viscosidade do fluído sinovial e sustenta as propriedades lubrificantes e amortecedoras de impacto das cartilagens articulares (DE LEEUW, 2010).

Injeções intra-articulares de HS têm sido utilizadas para tratamento de artrites e outras afecções articulares em animais, demonstrando significativa eficácia na redução destas alterações patológicas (TANG et al., 2008; HUANG et al., 2010).

A ação do ácido hialurônico pode ser mecânica, metabólica ou biológica. O conceito mecânico é que o ácido hialurônico mantém a lubrificação e, portanto, minimiza o desgaste das superfícies articulares, já metabolicamente, tem um papel importante na nutrição do disco e cartilagem articular (NEO et al., 1997). Em contrapartida, a ação biológica do ácido hialurônico, *in vitro* e *in vivo*, ao agir como barreira protetora para as superfícies articulares, bloqueia os mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-17, PGE2 e o indutor de óxido nítrico sintase (iNOs), além de inibir a expressão de enzimas que degradam a matriz extracelular tais como as metaloproteinases (MMP) 1, 3, 2, 9 e 13 (WANG et al. 2006; HSIEH et al., 2008; HASHIZUME et al., 2010; SHIMIZU et al., 2010; CAMPO et al., 2011).

No entanto, alguns estudos em pacientes e em modelos animais de osteoartrite no joelho não verificaram redução dos sinais e sintomas após tratamento com injeção intra-articular de HS (ALTMAN et al., 2004; JØRGENSEN et al., 2010; TEEPLE et al., 2011).

A injeção intra-articular de HS na ATM foi realizada pela primeira vez em 1985 e seus efeitos vem sendo estudados (SATO et al., 2001). Xinmin e Jian (2005) e El-Hakim e Elyamani (2011) verificaram que animais submetidos ao tratamento da osteoartrite da ATM com hialuronato apresentaram resultados satisfatórios. Já em seres humanos, Guarda-

Nardini et al. (2004) observaram que após o tratamento com injeções semanais de HS, os pacientes exibiram significativa redução dos sintomas relacionados à osteoartrite da ATM quando acompanhados por um período de até 6 meses.

O HS também parece ser eficaz na terapia de longa duração (seis meses a um ano) em pacientes com deslocamento de disco sem redução, exibindo melhora significativa na redução da intensidade da dor e crepitação (YEUNG et al., 2006). Entretanto, Shi, Guo e Awad (2003), em uma revisão sistemática da literatura sobre o uso do hialuronato no tratamento das DTMs, observaram resultados pouco esclarecedores, enfatizando a necessidade de mais estudos para fornecer maiores evidências sobre a eficácia do HS no tratamento das DTMs e sua ação nos tecidos da ATM.

A injeção intra-articular de HS de baixo peso molecular no tratamento da osteoartrite tem demonstrado um impacto positivo sobre a ATM e outras articulações sinoviais, sendo amplamente utilizado na prática clínica (GUARDA-NARDINI et al. 2004; YEUNG et al., 2006). Há numerosos estudos que avaliaram os efeitos dos diferentes pesos moleculares do HS na osteoartrite (TANG et al., 2008; HUANG et al., 2010; BOETTGER et al., 2011; DUYGU et al., 2011), mas não há consenso sobre o conceito de peso molecular.

Estudos em humanos ou em modelos animais que compararam a ação de hialuronatos de sódio de diferentes pesos moleculares demonstram uma maior eficácia do HSAPM, por apresentar maior meia-vida e aumentar a quantidade de ácido hialurônico endógeno (CAMPO et al. 2010; BOETTGER et al., 2011; DUYGU et al., 2011). Campo et al. (2010) afirmaram ainda que o HS de baixo peso molecular pode estar associado ao desenvolvimento de resposta pró-inflamatória, enquanto que o HSAPM apresenta atividade anti-inflamatória.

Descritos os aspectos relacionados aos estudos referentes ao HSAPM, verificamos que a ação da droga na artrite da ATM ainda não foi totalmente esclarecida e, portanto, estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos de ação e influência no reparo dos tecidos da ATM.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a ação morfológica e bioquímica do tratamento com o laser de baixa potência e hialuronato de sódio de alto peso molecular na ATM de ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA).

3.1 Objetivos específicos

- Verificar se o modelo de inflamação persistente induzida por injeção intra-articular de CFA é capaz de promover alterações degenerativas no disco e superfícies articulares da ATM no período avaliado;
- Verificar, nos diferentes grupos experimentais, a relação entre o grau de alterações morfológicas e bioquímicas no disco e superfícies articulares quanto à injeção de CFA e tratamento com HSAPM e LPB, analisando-se:
 - a) Os aspectos histomorfométricos do disco e superfícies articulares;
 - b) O grau de organização e empacotamento das fibras colágenas do disco articular;
 - c) A quantificação dos níveis de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) na membrana sinovial, disco articular e tecidos retrodiscais da ATM ;
 - d) A atividade enzimática das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 na membrana sinovial, disco articular e tecidos retrodiscais da ATM.
- Verificar se o tratamento simultâneo com LBP e HSAPM é superior aos efeitos isolados de cada um dos respectivos tratamentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento Experimental

4.1.1 Animais da pesquisa

A pesquisa é caracterizada como um estudo controlado do tipo analítico experimental no qual foram utilizados 48 ratos machos, *Wistar*, com idade média de 60 dias e peso entre 300 e 350 gramas. Os animais foram obtidos por meio de fornecedor cadastrado do biotério CEMIB, Universidade Estadual de Campinas e, mantidos em gaiolas plásticas padrão, em regime hídrico e alimentar *ad libitum*, sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 °C. Foram mantidos apenas dois animais por gaiola, afim de presar pela boa adaptação dos mesmos.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas sob protocolo de número 3020-1 (Anexo 1).

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos, contendo 12 animais cada, conforme descrição abaixo e na Figura 1:

- GA: animais com artrite na ATM induzida por CFA
- GL: animais com artrite na ATM induzida por CFA e tratados com LPB
- GH: animais com artrite na ATM induzida por CFA e tratados com HSAPM
- GHL: animais com artrite na ATM induzida por CFA e tratados com LPB e HSAPM.

Todos os experimentos foram realizados na ATM esquerda, para não comprometer a função mastigatória dos animais. No GA, as ATMs direitas foram utilizadas como CONTROLE (GC).

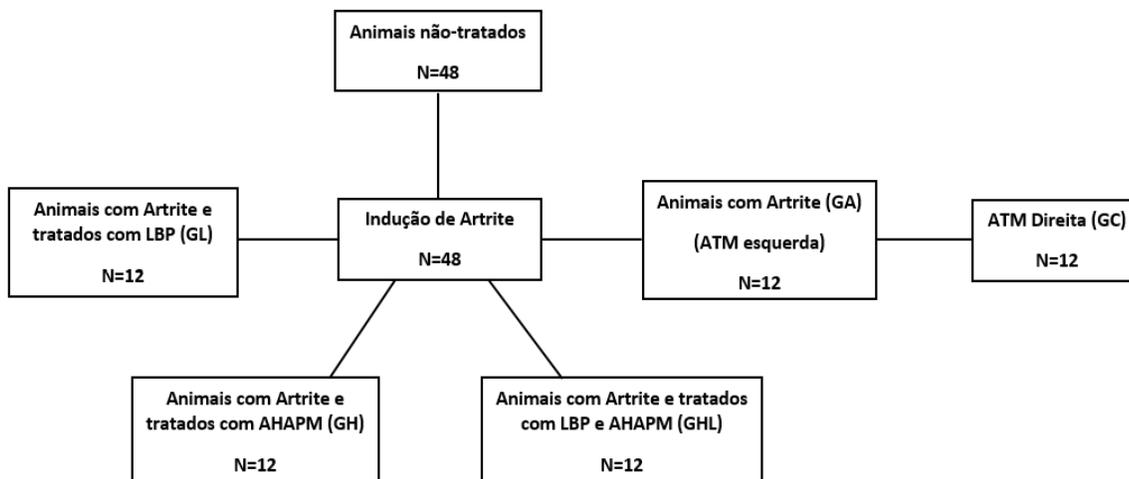


Figura 1: Esquema da distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais

Cabe ressaltar que os animais receberam dipirona sódica, 875 mg/kg, via oral, administrada na água de consumo por uma semana com o propósito de prevenir sintomas dolorosos decorrentes do processo inflamatório induzido (NAKAGAKI; CAMILLI, 2012).

Os animais foram tratados uma semana após injeção de CFA, pois neste período segundo Kuroki et al. (2011) já é possível a observação de alterações morfológicas na ATM como a presença de osteofitose e erosão da superfície condilar.

4.3 Indução de Artrite na ATM

Para indução de artrite na ATM, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de Ketamina (70mg/Kg) e Xylazina (10 mg/Kg), para permitir a administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) intra-articular na ATM esquerda. Antes da injeção do CFA, os pêlos presentes na região das ATMs foram removidos para melhor visualização das estruturas anatômicas.

A diluição foi de 1:1 (óleo/salina) no volume 50 µL de solução salina e 50 µL de CFA (5881; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) intra-articular na ATM esquerda (Dose única) e (SPEARS et al., 2005; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014). Para injeção foi utilizada uma agulha calibre 30 G1/2 acoplada a uma seringa plástica de 1 mL (KUROKI et al., 2011; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014).

Para localização das ATMs, realizou-se palpação do arco zigomático e do côndilo mandibular, indicando assim o local correto da injeção (Figura 2A). Para facilitar a localização das estruturas anatômicas descritas anteriormente, a boca do animal foi mantida aberta com o auxílio de um protetor de agulha (Figura 2B). A agulha foi inserida imediatamente inferior à borda pósterio-inferior do arco zigomático e avançada em direção anterior até entrar em contato com a borda pósterio-lateral do côndilo mandibular (ZHOU et al., 1999) (Figura 2B).

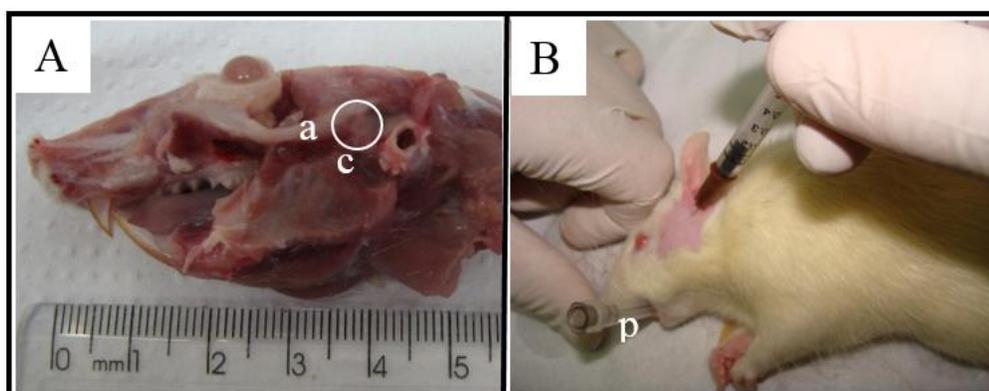


Figura 2: Injeção intra-articular de CFA na ATM esquerda. **A:** Pontos de reparos anatômicos para localização da ATM. Músculos masseter e temporal foram removidos para visualização do arco zigomático (a), processo condilar (c) e região da ATM (círculo). **B:** Injeção de CFA na ATM. A boca do animal foi mantida aberta com o auxílio de um protetor de agulha (p).

4.4 Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP)

O tratamento com o LBP foi iniciado uma semana após injeção intra-articular de CFA na ATM esquerda.

Foi utilizado o equipamento Laserpulse da IBRAMED (Amparo, SP, Brasil). O Laser de GaAlAs possui comprimento de onda de 830 nm e foi programado para atuar com uma potência de 30 mW. A potência de saída do aparelho de laser foi aferida ao longo do período experimental no Centro de Engenharia Biomédica da Unicamp.

Os animais foram imobilizados manualmente e receberam na ATM esquerda uma aplicação de 10 J/cm^2 (FIKÁCKOVÁ et al., 2007) com duração de 10 segundos (Figura 3), em sete sessões e intervalos de 48 horas, durante 13 dias (Guerra, 2009), conforme Figura 4, respeitando-se sempre o mesmo horário, aparelho e acessórios. Ao final do tratamento, obteve-se uma dosagem total de 70 J/cm^2 .



Figura 3: Aplicação do LBP



Figura 4: Cronograma de aplicação do LBP

4.5 Terapia com Hialuronato de Sódio de alto peso molecular (HSAPM)

O tratamento com o HSAPM foi iniciado uma semana após injeção intra-articular de CFA na ATM esquerda.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de Ketamina (70mg/Kg) e Xylazina (10 mg/Kg), e em seguida, submetidos à injeção intra-

articular de 50 μ L de HSAPM (hilano G-F 20; Genzyme, Cambridge, EUA), na ATM esquerda, uma vez por semana, totalizando três injeções, durante 15 dias, conforme Figura 5, respeitando-se sempre o mesmo horário (DUYGU et al., 2011).

Foi utilizada uma agulha 30 G1/2 acoplada em uma seringa plástica de 1 mL para injeção intra-articular de hialuronato, conforme técnica descrita por Zhou et al. (1999) (Figura 6).

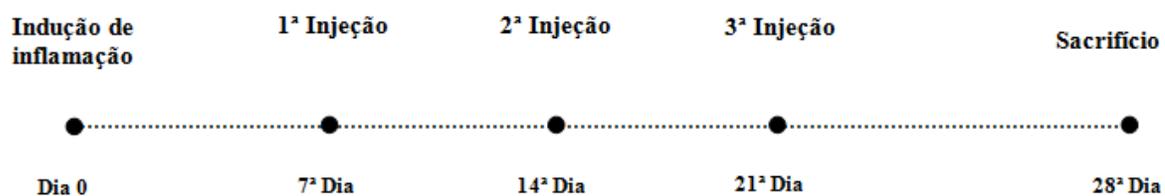


Figura 5: Cronograma de tratamento com HSAPM



Figura 6: Injeção intra-articular de HSAPM

4.6 Terapia com LBP e HSAPM

O tratamento com o LBP e HSAPM foi iniciado uma semana após injeção intra-articular de CFA na ATM esquerda, seguindo os mesmos protocolos descritos anteriormente.

4.7 Eutanásia dos animais

Os animais tratados com o LBP e HSAPM sofreram eutanásia, com aprofundamento da anestesia, uma semana após o final de cada tratamento, 28 dias após a indução de artrite (NEO et al, 1997; EL-HAKIM; ELYAMANI, 2011). O grupo de animais tratados apenas com CFA sofreu eutanásia 28 dias após a indução de artrite, tendo em vista os protocolos de tratamentos propostos e com finalidade de padronização para as análises morfológicas e bioquímicas subsequentes. Os tecidos subcutâneos foram cuidadosamente afastados para exposição e dissecação da ATM, que foi removida em bloco para análises morfológicas, bioquímicas e moleculares.

4.8 Análise Morfológica

Após a dissecação, as estruturas da ATM (n=5) foram transferidas para um recipiente e fixadas em solução de formol 4% em tampão Millonig (0.13 M sodium phosphate, 0.1 M NaOH - pH 7.4) durante 24 horas a 22°C. Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente por 12 horas, seguindo para a descalcificação em solução de EDTA 5% (ácido tetra-acético-etileno-diamino) em tampão fosfato de sódio 0,1M. A solução descalcificadora foi trocada diariamente até promover a descalcificação adequada das amostras, a qual foi verificada atravessando-se uma agulha no tecido sem resistência (cerca de 2 meses).

Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente por 12 horas, seguindo para desidratação em banhos de álcool, posterior diafanização com banhos de xilol e um

processo de inclusão em parafina rotineiro. Após estas etapas, foram realizados cortes sagitais da ATM, incluindo o côndilo, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular, em secções de 7 μm de espessura, com um micrótomo Leica RM2125RT (Leica Microsystems, Nussloch, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.8.1 Coloração em Hematoxilina-eosina (HE)

As lâminas contendo os cortes histológicos foram mergulhadas em solução de Hematoxilina por 40 segundos, lavadas em água corrente, e posteriormente mergulhadas em Eosina por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em uma sequência alcoólica (70, 80, 95, 100%), mergulhadas em xilol e montadas com lamínulas em Bálsamo do Canadá. Esta coloração nos permite uma visualização geral de todo o tecido (KIERNAN, 1981). Foi realizada uma análise descritiva quanto a presença de alterações no côndilo mandibular, disco articular, tecido retrodiscal e osso temporal. As análises foram realizadas por um único examinador treinado e, três cortes por articulação foram avaliados.

4.8.2 Morfometria do Disco Articular

Foram capturadas imagens da ATM de lâminas coradas em HE por meio de um microscópio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japão) e de uma câmera acoplada a este (Nikon DS-Ri1, Nikon, Japão). Todas as imagens foram capturadas na objetiva de 4X.

O estudo histomorfométrico da ATM quantificou a espessura do disco articular por meio do Software Image_J (Sun Microsystems, EUA). Foram realizados três cortes com 7 μm de espessura de cada amostra. Em cada corte foram mensurados três pontos diferentes para a espessura nas regiões anterior (A), média (M) e posterior (P) do disco articular (Figura 7). A média da espessura em cada uma das três regiões foi calculada utilizando o

software de estatística GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA). As análises foram realizadas por um único examinador treinado.

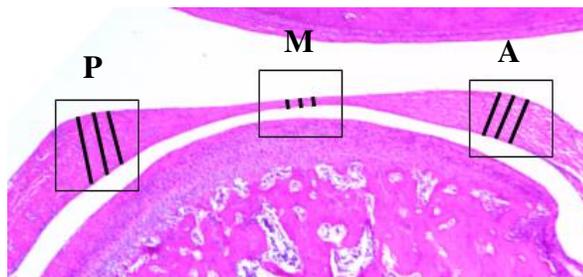


Figura 7: Fotomicrografia da ATM mostrando os locais de mensuração da espessura do disco articular nas regiões anterior (A), média (M) e posterior (P). Aumento de 4X.

4.8.3 Coloração em Picrosirius

O método baseia-se na utilização do Sirius Red em associação com o ácido pícrico. O Sirius Red é um corante fortemente ácido que se liga aos aminoácidos básicos presentes na molécula de colágeno. A molécula longa do Sirius Red exibe uma orientação paralela ao longo eixo da molécula de colágeno, aumentando sua birrefringência natural, quando observada sob luz polarizada (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Os componentes fibrilares, contendo moléculas orientadas de colágeno, aparecem como estruturas brilhantes e com cores de interferência, que variam do verde ao vermelho, contra um fundo escuro, quando analisadas em microscópio de luz polarizada. As regiões contendo feixes de fibras colágenas espessas (compactadas) e organizadas exibem coloração predominantemente avermelhadas e maiores absorbâncias, ao passo que, as regiões que possuem colágeno menos compactado e organizado, apresentam coloração verde e menores absorbâncias (VIDAL; MELLO; PIMENTEL, 1982).

Neste método, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, desidratadas em uma bateria de alcoóis, coradas por aproximadamente 15 minutos em Picrosirius e lavadas em água corrente. Em seguida, receberam coloração de fundo em Hematoxilina de Harris por 5

minutos. Foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

4.8.4 Análise da birrefringência de fibras colágenas

A birrefringência foi analisada por meio de um microscópio de luz polarizada Olympus BX51-P BX2 (Olympus Corporation, Japão) e as imagens capturadas e analisadas utilizando-se o analisador de imagens cellSens Dimension 1.6 (Olympus Corporation, Japan) na objetiva de 10X. Para a aquisição das imagens os cortes corados em Picrosirius foram posicionados a 45° em relação ao polarizador e ao analisador. A birrefringência foi avaliada por meio da frequência do valor da média de cinza em pixels (VIDAL, 2010), em três áreas aleatórias em cada uma das regiões anterior, média e posterior do disco articular (Figura 8), sendo três cortes por animal, nos diferentes grupos. Toas as análises foram realizadas por um único avaliador treinado. Quanto maior o valor em pixels, maior a intensidade da birrefringência e, conseqüentemente, maior a organização e compactação das fibras colágenas (VIDAL, 2010).

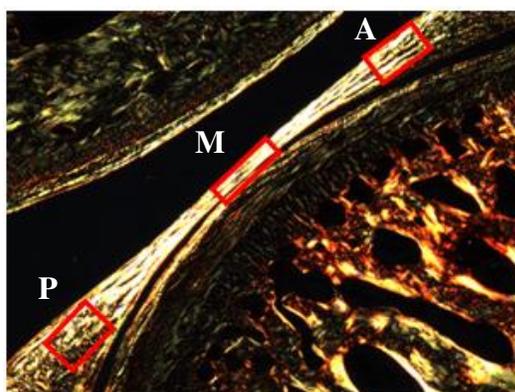


Figura 8: Fotomicrografia da ATM mostrando as áreas analisadas nas regiões anterior (A), média (M) e posterior (P) do disco articular (retângulos vermelho). Aumento de 10X.

4.8.5 Coloração em Azul de Toluidina (AT)

O azul de toluidina (AT) é um corante básico que tem forte afinidade pelo grupamento sulfato dos Glicosaminoglicanos sulfatados presentes nos proteoglicanos (PGs). As regiões com elevadas concentrações de PGs exibem intensa metacromasia, ou seja, são coradas em violeta, diferentemente da cor normal do corante. A coloração foi realizada com AT 0,5% em 5% de Borax (0,125 g/25 mL de água deionizada). As lâminas foram deixadas na solução corante por 10 minutos, em seguida, desidratadas em sequência alcoólica (70, 80, 95, 100%), mergulhadas em xilol e montadas com lamínulas em Bálsamo do Canadá. Foi realizada uma análise descritiva quanto a presença de metacromasia nas três regiões anatômicas do disco articular. As análises foram realizadas por um único examinador treinado e, três cortes por articulação foram avaliados.

4.9 Análise bioquímica e molecular

Para realização das técnicas bioquímicas e moleculares, a ATM foi cuidadosamente dissecada e a cápsula articular, disco articular e tecido retrodiscal removidos ($n \leq 4$ por grupo para cada técnica). Os tecidos foram colocados em eppendorf e armazenados em biofreezer a -80° .

4.9.1 Extração de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) da Matriz Extracelular

Os fragmentos do disco articular, cápsula e tecidos retrodiscais da ATM foram desidratados com acetona (5 mL/g de tecido) por 24h e secos em estufa a 37°C por 24h. Em seguida foi realizada extração dos GAGs sulfatados por digestão com solução de papaína (Merck) (40 mg/g de tecido seco), contendo 100 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 6,5, EDTA 40 mM, e 80 mM β -mercaptoetanol (Sigma). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 24h. Após incubação, os GAGs, RNA e DNA foram precipitados por

meio de adição de TPA 90% (10% do volume). Em seguida, o material foi centrifugado (6000 rpm em 15 min) e o sobrenadante coletado. Este foi precipitado em 2 volumes de metanol e armazenado em geladeira a 4°C por 24h. Em seguida, foi realizada nova centrifugação e o precipitado novamente coletado. Após essa coleta, o precipitado foi seco em estufa a 37°C por 1h e ressuscitado em água (volume suficiente para cobrir o precipitado). Em seguida, foi adicionado tampão contendo DNase (10% do volume) e colocado em estufa a 37°C por 30 min para ativação da DNase. Posteriormente, o material foi colocado em estufa a 60°C por 2h para secar e inativar a DNase, e, finalmente, ressuscitado em água (volume para cobrir o precipitado).

4.9.2 Dosagem de GAGs sulfatados

Após extração, o conteúdo total de GAGs sulfatados foi determinado pelo método de azul de dimetilmtilenol - DMMB (FARNDALÉ; BUTTLE; BARRET, 1986). Para a curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de condroitim sulfato (1 mg/mL) e a leitura foi realizada em 540 nm em espectrofotômetro (Modelo 8452 A Diode Array da HP, EUA).

4.9.3 Zimografia

A zimografia é uma técnica que permite visualizar diferentes isoformas de uma enzima ou das formas pró-enzima e enzima ativa, muito frequente em enzimas proteolíticas extracelulares como as Gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9) (NASCIMENTO et al., 2013) e foi realizada por meio dos seguintes procedimentos:

1- Extração: Os tecidos congelados foram triturados em pulverizador e em seguida, homogeneizados com tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 0,2 M, Triton X-100 0,1%, CaCl₂ 10 mM e inibidor de protease 100 µl /10mL), na proporção de 30 mg de tecido/100µl de tampão de extração. A extração foi realizada por aproximadamente 2 horas

na geladeira. Após a extração, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm (4°C) por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado. O precipitado foi ressuspenso com 1/3 do volume do tampão utilizado na primeira extração, e aquecido por 5 minutos a 60°C. Foi realizada novamente uma centrifugação a 4000 rpm (4°C) por 20 minutos e o sobrenadante coletado. Os dois produtos das duas extrações foram então misturados. Uma parte do extrato final foi separada para posterior dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Para realização do método de Bradford (1976) foram realizadas alíquotas dos extratos obtidos anteriormente e como padrão foi empregado albumina bovina sérica (BSA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo 8452 A Diode Array da HP, EUA) no comprimento de onda de 595 nm.

2- Aplicação das amostras: As amostras contendo 30 µg de proteína por amostras tiveram seu volume completado para 15 µL com H₂O e acrescentado 10 µL de tampão de amostra (5,5 mL água destilada, 1,25 mL Tris-HCL 0,5M pH 6.8, 0,3 mL glicerol, 0,2 mL azul de bromofenol - 0,5% e 0,1 g SDS-10%). A aplicação foi em gel de Poliacrilamida 10% e 0,1% de gelatina.

3-Eletroforese (100 V aproximadamente 1h30min): Foi realizada em condições não redutoras a 4°C. Após a corrida, o gel foi lavado por duas vezes de 15 min em Triton X-100 para retirar o SDS. Após incubação overnight a 37°C com tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM pH 8.4, 5 mM de CaCl₂ e 1 µM de ZnCl₂), o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue por 2h, e descorado (solução metanol 30% e ácido acético 10% em água). Em seguida colocado em solução encolhedora (metanol 30% e glicerol 3%).

Após eletroforese o gel foi fotografado e verificado em transluminador GBOX Chemi HR (Syngene, EUA). A quantificação das bandas foi feita através de densitometria utilizando o programa Scion Image Software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, EUA).

4.10 Análise Estatística

Para análise estatística das variáveis quantitativas realizou-se, inicialmente, o teste de normalidade Shapiro-Wilk. No caso das variáveis contemplaram a metodologia paramétrica, aplicou-se o teste ANOVA one-way com o teste de Tukey para comparações

múltiplas. Quando as amostras não contemplaram a metodologia destacada, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Em ambos os testes estatísticos adotou-se o $p < 0,05$ como indicativo de diferença estatisticamente significativa. Os dados foram tabulados e analisados por meio do software GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Análise Morfológica

5.1.1 Coloração em Hematoxilina-esosina (HE)

O GC apresentou morfologia normal do côndilo mandibular, disco articular e fossa mandibular do osso temporal. Não foram identificadas áreas de inflamação sinovial neste grupo (Figura 9 A1-3).

Os animais do GA exibiram acentuadas alterações morfológicas nos componentes da ATM tais como: aumento de espessura do disco articular; hiperplasia da membrana sinovial, com invasão do espaço articular e formação de pannus (proliferação da membrana sinovial recobrando a cartilagem articular); destruição da cartilagem articular e reabsorção óssea da fossa mandibular (osso temporal); e aplainamento do côndilo mandibular (Figura 9 B1-2). No tecido subsinovial foi verificada a presença de intenso infiltrado inflamatório crônico, constituído por leucócitos mononucleares, principalmente linfócitos e plasmócitos; proliferação de fibroblastos; proliferação vascular e acúmulo de fibras colágenas, indicativos da fase proliferativa-reparativa da inflamação (Figura 9 B3).

Os animais do GL, GH e GHL apresentaram alterações morfológicas de menores proporções do que as observadas no GA.

No GL, foram identificadas áreas de reabsorção óssea na fossa mandibular e, hiperplasia da membrana sinovial, com invasão do espaço articular e formação de vilos, sem, no entanto, a formação de pannus. O tecido subsinovial exibiu a presença de infiltrado inflamatório crônico constituído por leucócitos mononucleares. Já o côndilo mandibular e o disco articular exibiram morfologia normal (Figura 10 C1-3).

O GH exibiu espessura acentuada no disco articular em relação a GC; hiperplasia da membrana sinovial e invasão do espaço articular, sem formação de pannus; reabsorção óssea da fossa mandibular e intenso infiltrado inflamatório crônico no tecido subsinovial. O côndilo mandibular apresentou morfologia normal (Figura 10 D1-3).

No GHL foram observadas alterações como: aumento na espessura do disco articular em relação a GC, reabsorção da fossa mandibular, hiperplasia da membrana sinovial e infiltrado inflamatório crônico no tecido subsinovial com proliferação de vasos sanguíneos (Figura 10 E1-3).

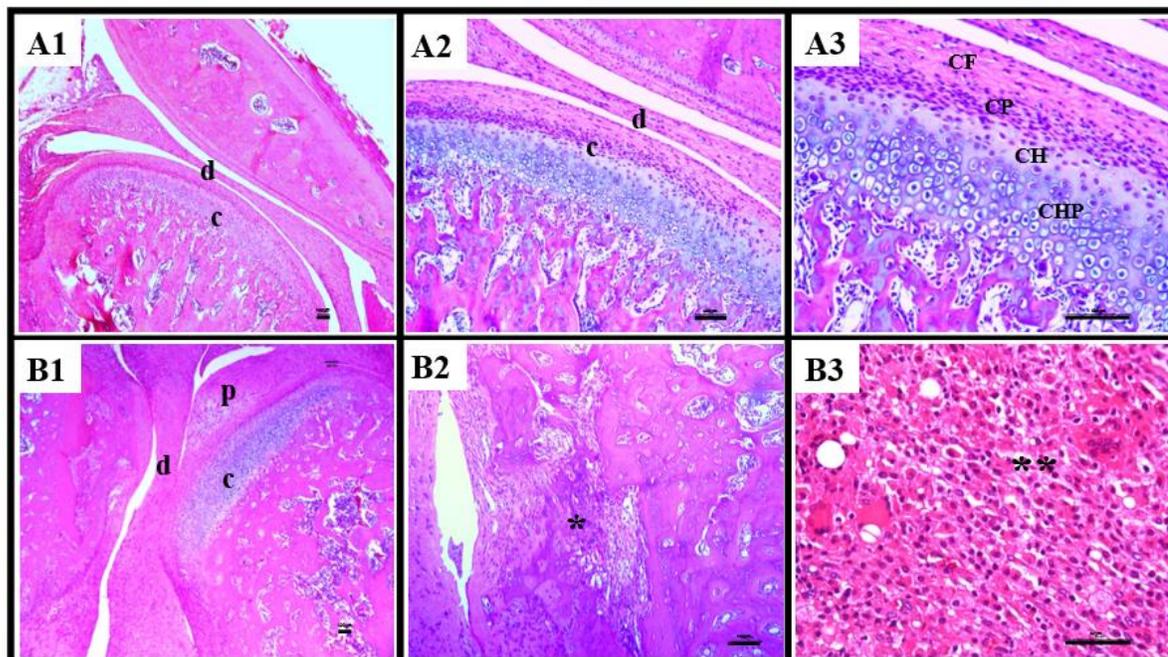


Figura 9: Imagens histológicas da ATM. Coloração em HE. A1-3: grupo controle (GC). Aumento de 4X, 10X e 20X, respectivamente. **B1-3:** grupo artrite (GA). Aumento de 4X, 10X e 40X, respectivamente. d: disco articular. c: côndilo mandibular. CF: camada fibrosa da cartilagem articular. CP: camada proliferativa da cartilagem articular. CH: camada de cartilagem hialina. CHP: camada hipertrófica da cartilagem articular. p: área de pannus. *: área de reabsorção óssea. **: infiltrado inflamatório crônico. (Barra de Escala = 100 μ m em A1, A2, A3, B1 e B2; Barra de escala = 50 μ m em B3).

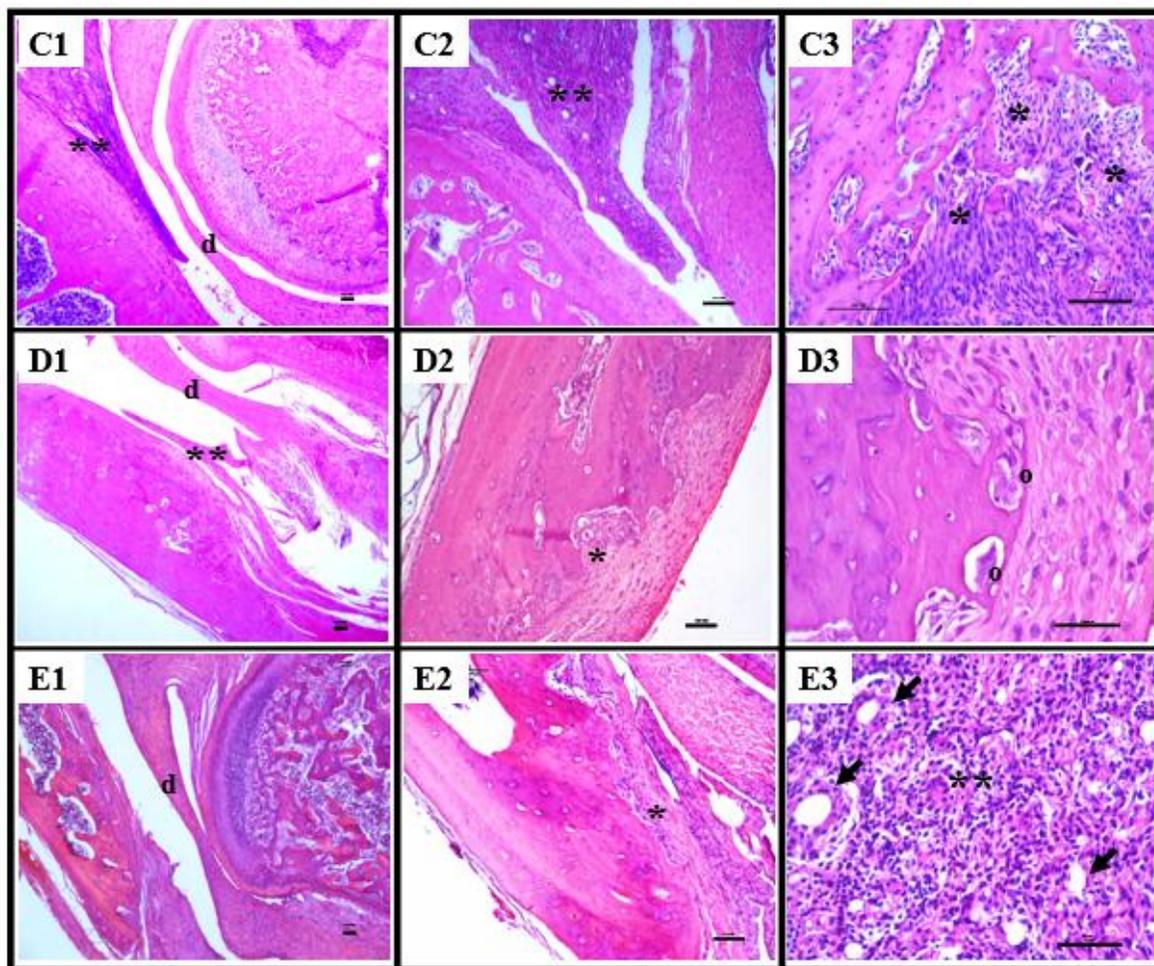


Figura 10: Imagens histológicas da ATM. Coloração em HE. C1-3: grupo laser de baixa potência (GL). Aumento de 4X, 10X e 20X, respectivamente. **D1-3:** grupo hialuronato de sódio e alto peso molecular (GH). Aumento de 4X, 10X e 40X, respectivamente. **E1-3:** grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). Aumento de 4X, 10X e 40X, respectivamente. **d:** disco articular. *****: área de reabsorção óssea. ****:** infiltrado inflamatório crônico. **o:** osteoclastos. **Seta:** vasos sanguíneos. (Barra de Escala = 100 μ m em C1, C2, C3, D1, D2, E1 e E2; Barra de escala = 50 μ m em D3 e E3).

5.1.2 Morfometria do Disco Articular

Conforme se observa na Figura 11, a espessura do disco articular no GA foi estatisticamente elevada nas três regiões anatômicas (anterior, média e posterior) em comparação ao grupo controle (GC). O GL exibiu significativa redução da espessura nas três regiões do disco articular em comparação ao GA. O GH demonstrou menor espessura no disco articular em comparação ao GA nas zonas anterior e posterior. Porém, apenas a última foi estatisticamente significativa. A região média permaneceu com espessura elevada. O GHL mostrou menor espessura nas três regiões do disco articular quando comparado ao GA. No entanto, apenas para a região anterior esta diferença foi estatisticamente significativa.

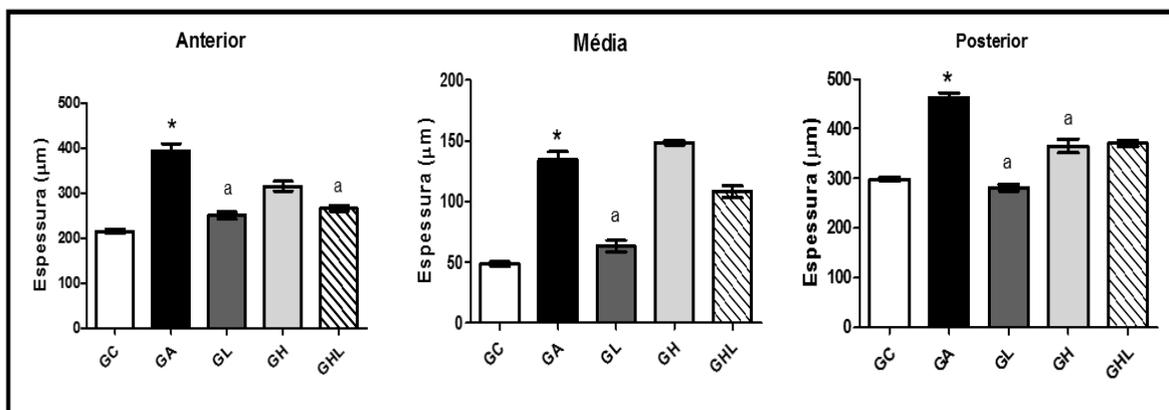


Figura 11: Morfometria do disco articular (espessura em μm) nos diferentes grupos experimentais. Grupo controle (GC), grupo artrite (GA), grupo laser de baixa potência (GL), grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular (GH) e grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). (*) Diferença significativa entre os grupos GC e GA ($P < 0,05$). (a) Diferença significativa entre GA e os grupos assinalados ($P < 0,05$). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Média e EP (erro padrão).

5.1.3 Coloração em Picrosirius e Birrefringência das fibras colágenas

Cortes sagitais da ATM com 7 μm de espessura foram corados em picrosirius e examinados em microscópio de luz polarizada. Os animais do GC exibiram intensa coloração vermelho-alaranjada no disco articular, indicando um alto grau de compactação e organização das fibras colágenas. Já o GA mostrou uma coloração esverdeada, sugerindo desorganização da rede de fibras colágenas e remodelamento do disco articular (Figura 12).

Os GL, GH e GHL exibiram coloração do disco articular semelhante à observada no GC, o que sugere efeito positivo dos respectivos tratamentos na organização e compactação da rede de fibras colágenas (Figura 12).

A média dos valores de cinza (microscopia de polarização) revelou que a birrefringência das fibras colágenas no GA foi estatisticamente menor em comparação ao GC nas três regiões do disco articular. Já os GL, GH e GHL exibiram birrefringência estatisticamente superior em comparação ao GA nas três regiões do disco (Figura 13). Quanto maior a intensidade da birrefringência, maior a organização e empacotamento das fibras colágenas, confirmando, portanto, os efeitos positivos dos respectivos tratamentos.

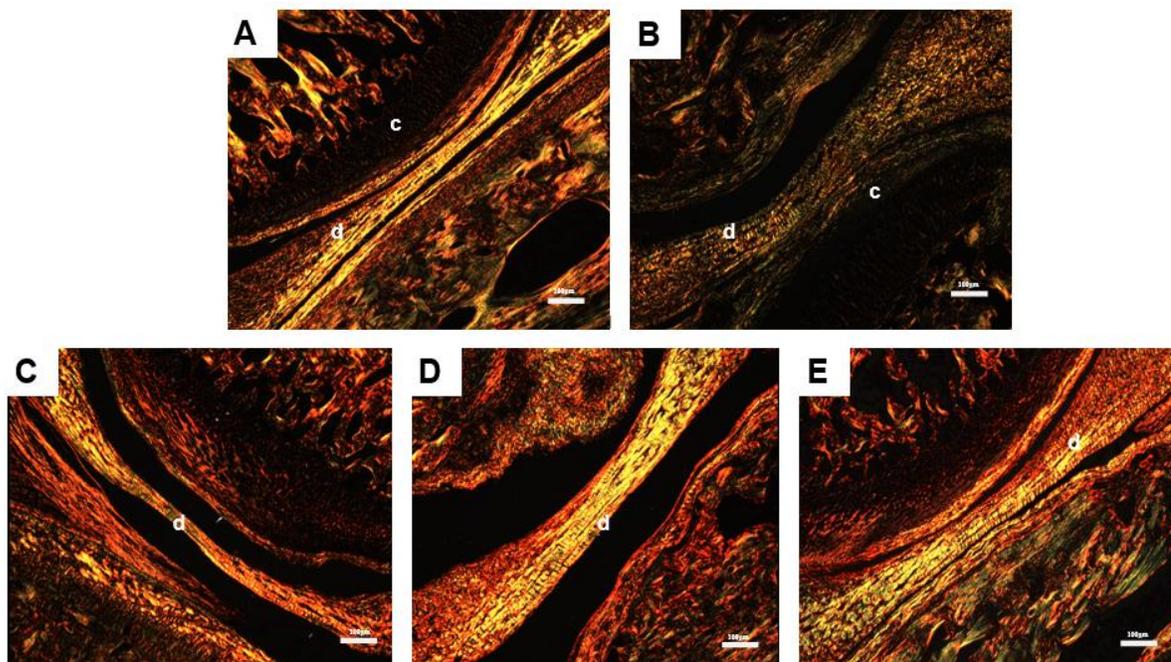


Figura 12: Imagens histológicas da ATM. Coloração em Picrosirius (Microscopia de polarização). A: grupo controle (GC). B: grupo artrite (GA). C: grupo laser de baixa potência (GL). D: grupo hialuronato de sódio e alto peso molecular (GH). E: grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). **c:** côndilo mandibular. **d:** disco articular. Coloração vermelho-alaranjada, indica maior grau de organização e empacotamento da rede de fibras colágenas. Coloração esverdeada indica desorganização das fibras colágenas. GA apresentou coloração esverdeada e maior desorganização das fibras colágenas em relação ao GC. GL, GH e GHL apresentaram colorações semelhantes ao GC. Aumento de 10X. (Barra de Escala = 100 µm).

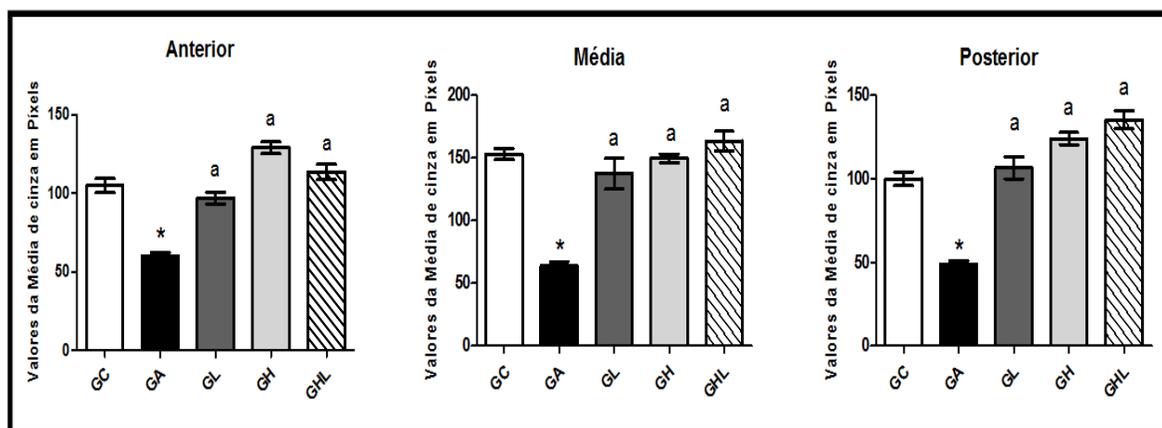


Figura 13: Valores de birrefringência das fibras colágenas (valores da média de cinza em pixels) nos diferentes grupos experimentais. Grupo controle (GC), grupo artrite (GA), grupo laser de baixa potência (GL), grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular (GH) e grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). (*) Diferença significativa entre os grupos GC e GA ($P < 0,05$) (One-way ANOVA e pós-teste de Tukey). (a) Diferença significativa entre GA e os grupos assinalados ($P < 0,05$) (Teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Média e EP (erro padrão).

5.1.4 Coloração em Azul de Toluidina (AT)

Nos cortes corados em AT observou-se que o GA exibiu maior metacromasia (*) nas três regiões do disco articular (anterior, média e posterior) em comparação ao grupo controle (GC), sugerindo elevada concentração de PGs na matriz extracelular (Figuras 14, 15 e 16).

Os GL, GH e GHL apresentaram leve redução da metacromasia (*) nas regiões anterior e posterior do disco articular em comparação ao GA, porém permaneceram maiores em relação ao GC. Na região média não foi observada diferença aparente entre os GA, GL, GH e GHL (Figuras 14, 15 e 16).

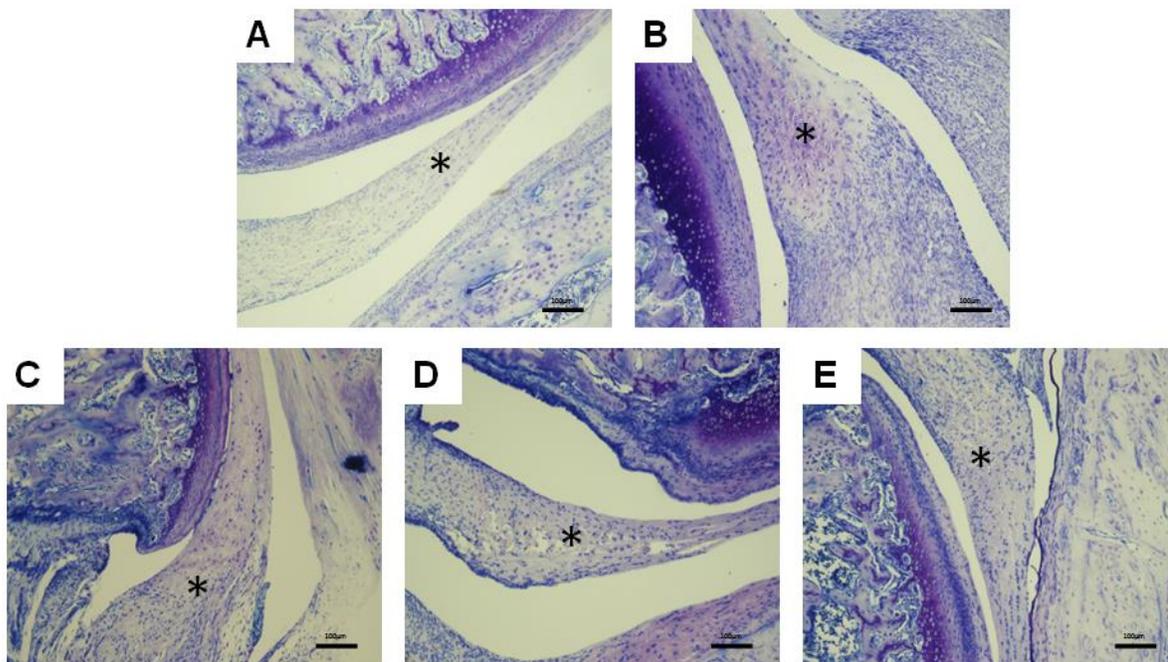


Figura 14: Imagens histológicas do disco articular da ATM (Região Anterior). Coloração em Azul de Toluidina. A: grupo controle (GC). B: grupo artrite (GA). C: grupo laser de baixa potência (GL). D: grupo hialuronato de sódio e alto peso molecular (GH). E: grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). *: Área de metacromasia (AT cora o tecido em violeta, diferentemente da cor normal do corante. Indica elevada concentração de proteoglicanos). Grupo GA apresentou maior metacromasia em relação ao GC. GL, GH e GHL apresentaram menor metacromasia em relação ao GA. Aumento de 10X. (Barra de Escala = 100 µm).

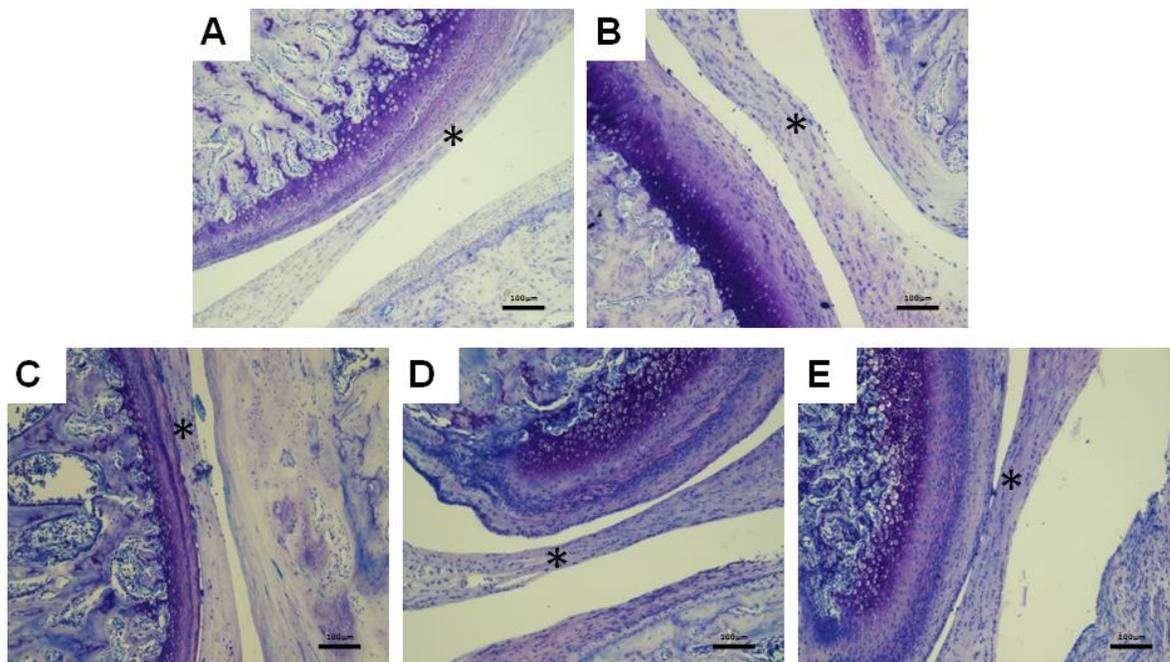


Figura 15: Imagens histológicas do disco articular da ATM (Região Média). Coloração em Azul de Toluidina. A: grupo controle (GC). **B:** grupo artrite (GA). **C:** grupo laser de baixa potência (GL). **D:** grupo hialuronato de sódio e alto peso molecular (GH). **E:** grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). *: Área de metacromasia (AT cora o tecido em violeta, diferentemente da cor normal do corante. Indica elevada concentração de proteoglicanos). Grupos GA, GL, GH e GHL apresentaram maior metacromasia em relação ao GC, sem diferença aparente entre ambos. Aumento de 10X. (Barra de Escala = 100 µm).

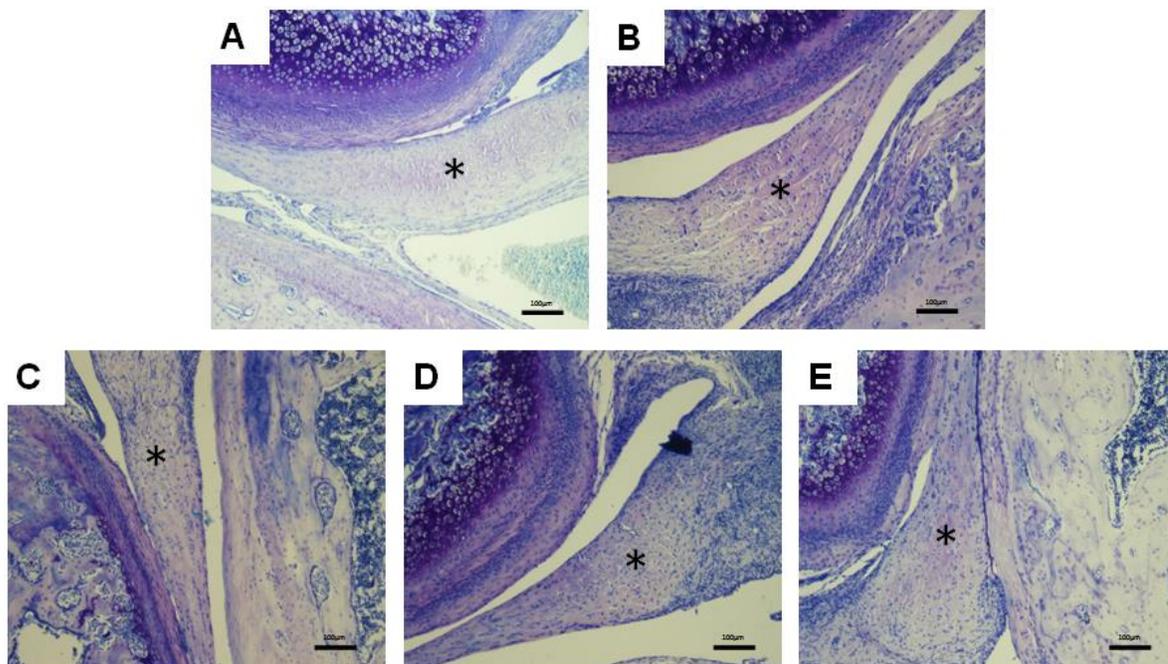


Figura 16: Imagens histológicas do disco articular da ATM (Região Posterior). Coloração em Azul de Toluidina. A: grupo controle (GC). **B:** grupo artrite (GA). **C:** grupo laser de baixa potência (GL). **D:** grupo hialuronato de sódio e alto peso molecular (GH). **E:** grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). *: Área de metacromasia (AT cora o tecido em violeta, diferentemente da cor normal do corante). Indica elevada concentração de proteoglicanos). Grupo GA apresentou maior metacromasia em relação ao GC. GL, GH e GHL apresentaram menor metacromasia em relação ao GA. Aumento de 10X. (Barra de Escala = 100 µm).

5.2 Análise Bioquímica

5.2.1 Dosagem de GAGs Sulfatados

Conforme se observa na Figura 17, a concentração de GAGs sulfatados nos tecidos da ATM (disco articular, cápsula e tecido retrodiscal) foi estatisticamente mais elevada no GA quando comparado ao GC.

Os GL, GH e GHL exibiram tendência de redução do conteúdo de GAGs sulfatados em comparação ao GA, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. A maior tendência de redução do conteúdo de GAGs foi encontrada no GH (Figura 17).

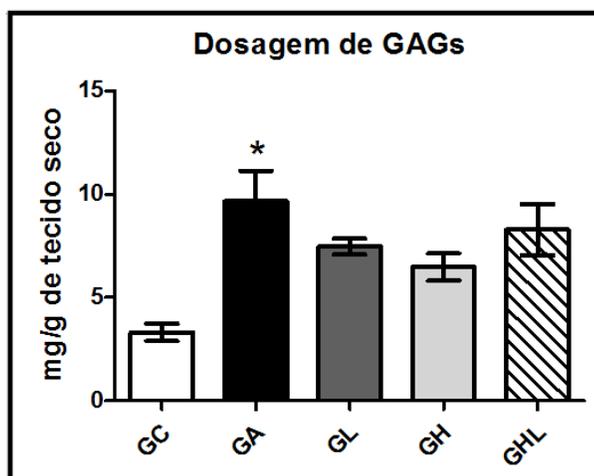


Figura 17: Concentração de GAGs (mg/g de tecido seco) nos diferentes grupos experimentais. Grupo controle (GC), grupo artrite (GA), grupo laser de baixa potência (GL), grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular (GH) e grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). (*) Diferença significativa entre os grupos GC e GA ($P < 0,05$) (One-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Média e EP (erro padrão).

5.2.2 Zimografia

A presença de MMP-9 latente foi detectada em todos os grupos exceto no GC (Figura 17). A MMP-9 ativa foi detectada apenas nos GA, GL e GH (Figura 18). A análise densitométrica das bandas revelou que os GH e GHL tinham significativamente quantidades diminutas de isoformas ativa e latente da MMP-9, quando comparadas ao GA. No GL, apenas a isoforma ativa foi estatisticamente menor em comparação a GA (Figura 18).

Em relação à MMP-2, as isoformas latente, intermediária e ativa estavam presentes em todos os grupos analisados (Figura 19). A densitometria das bandas demonstrou que os GH e GHL exibiram atividades significativamente menores nas três isoformas da MMP-2 em comparação ao GA (Figura 19). O GL exibiu uma redução estatisticamente significativa apenas para a isoforma ativa em comparação a GA (Figura 19).

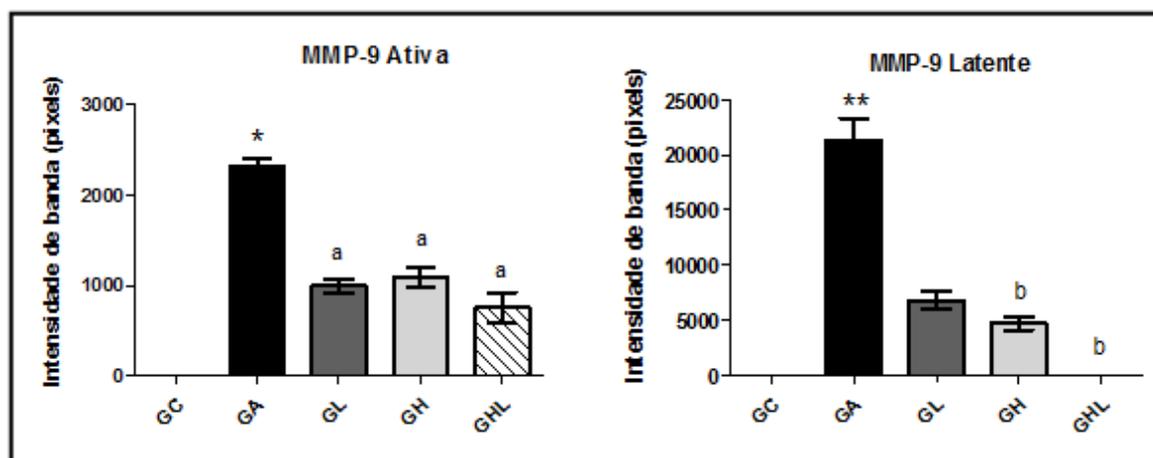


Figura 18: Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondentes às isoformas da MMP-9 (Ativa e Latente) nos diferentes grupos experimentais. Grupo controle (GC), grupo artrite (GA), grupo laser de baixa potência (GL), grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular (GH) e grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). (*) Diferença significativa entre os grupos GC e GA ($P < 0,05$) (One-way ANOVA e pós-teste de Tukey). (**) Diferença significativa entre os GC e GA ($P < 0,05$) (Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn). (a) Diferença significativa entre GA e os grupos assinalados ($P < 0,05$) (Teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). (b) Diferença significativa entre GA e os grupos assinalados ($P < 0,05$) (Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn). Média e EP (erro padrão).

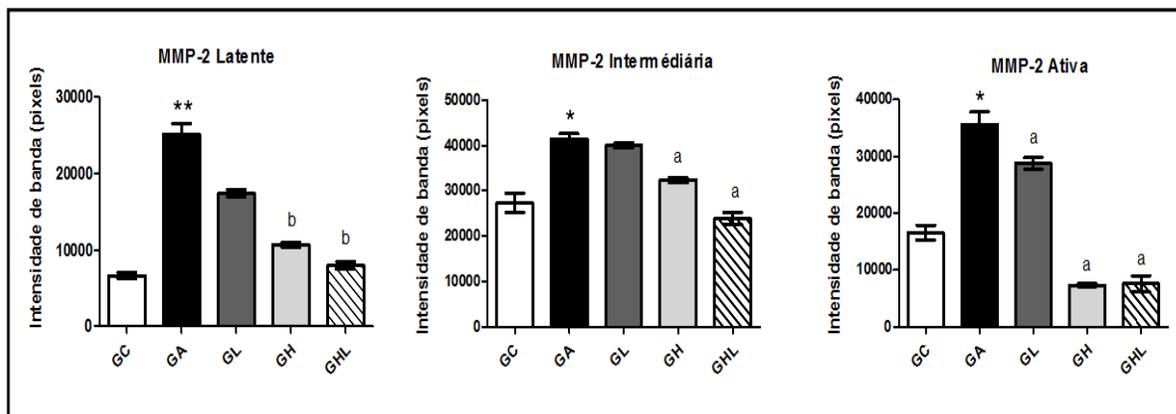


Figura 19: Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondentes às isoformas da MMP-2 nos diferentes grupos experimentais. Grupo controle (GC), grupo artrite (GA), grupo laser de baixa potência (GL), grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular (GH) e grupo hialuronato de sódio de alto peso molecular e laser de baixa potência (GHL). (*) Diferença significativa entre os grupos GC e GA ($P < 0,05$) (One-way ANOVA e pós-teste de Tukey). (**) Diferença significativa entre os grupos GC e GA ($P < 0,05$) (Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn). (a) Diferença significativa entre GA e os grupos assinalados ($P < 0,05$) (Teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). (b) Diferença significativa entre GA e os grupos assinalados ($P < 0,05$) (Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn). Média e EP (erro padrão).

6. DISCUSSÃO

6.1 Morfologia e morfometria da ATM

Estudos prévios demonstraram que a injeção intra-articular de CFA na ATM de roedores resultou em resposta inflamatória prolongada, persistindo por até 6 semanas, isso contribuiu para que estudos dos mecanismos envolvidos nas desordens inflamatórias desta articulação fossem desenvolvidos com objetivo de uma eficaz abordagem clínico-terapêutica (SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; WANG et al., 2012; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014). Em nosso estudo, os animais receberam uma única injeção intra-articular de CFA na ATM, conforme previamente descrito (SPEARS et al., 2005; KUROKI et al., 2011, NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014), e as articulações foram analisadas 28 dias após indução de inflamação. Ou seja, em uma condição inflamatória crônica, mais próxima da realidade clínica.

A injeção intra-articular de CFA (GA) promoveu importantes alterações morfológicas na ATM, incluindo hiperplasia da membrana sinovial, formação pannus, infiltração de células inflamatórias mononucleares, destruição da cartilagem articular e reabsorção óssea da fossa mandibular. A morfometria do disco articular mostrou deformação e aumento da espessura em suas três regiões anatômicas em comparação ao GC. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores, nos quais descreveram diversas alterações morfológicas e marcadas infiltrações de células inflamatórias na cápsula e tecido retrodiscal, causadas pela injeção de CFA (KAMEOKA et al., 2009; KUROKI et al., 2011; WANG et al., 2012; GEORGE et al., 2013). Também em concordância com nossos resultados, Wang et al. (2012) demonstraram significativa deformação do disco articular e aumento de sua espessura, principalmente nas regiões anterior e média, que estão sujeitas a maior carga compressiva durante a mastigação.

Além disso, o GA mostrou a presença de alterações na morfologia do côndilo mandibular, tais como aplainamento e erosão óssea. Nossos resultados concordam com os dados encontrados por Kameoka et al. (2009) e Kuroki et al. (2011) que descreveram a formação de osteofitose e erosão condilar, observada por meio de microtomografia.

Em contraste, Wang et al. (2012) e George et al. (2013) observaram poucas alterações na cartilagem articular e osso subcondral do côndilo da mandíbula. Acreditamos que nestes trabalhos o CFA foi injetado apenas no compartimento superior e/ou tecido retrodiscal, não tendo, portanto, ação no côndilo mandibular.

No GC, foi observada ausência de alterações morfológicas no côndilo mandibular, disco articular e osso temporal. Este resultado sugere que a indução de inflamação na ATM esquerda não comprometeu a ATM contralateral, que foi utilizada no presente estudo como controle não-injetado. Neste sentido, diversos trabalhos tem demonstrado que a mastigação unilateral e outros fatores oclusais não são fatores etiológicos primários na DTM (GESCH et al., 2005; LUTHER, 2007; MOHLIN et al., 2007; BADEL et al., 2008). Além disso, a ATM é a única articulação sinovial cujas superfícies articulares são revestidas por fibrocartilagem, o que implica em maior capacidade adaptativa e de reparo (DE LEEUW, 2010). Estes resultados suportam a eficácia do nosso modelo de artrite e o uso da ATM contralateral como controle saudável, reduzindo assim a necessidade de mais um grupo experimental e o sacrifício de animais em demasia.

No GL foi observada a presença de áreas de reabsorção óssea na fossa mandibular, hiperplasia da membrana sinovial e infiltrado inflamatório crônico, porém em menores proporções se comparado ao GA. Já a morfometria da ATM mostrou espessura do disco articular nas três regiões anatômicas, semelhantes ao GC.

Em nosso estudo, foi utilizado um laser de GaAlAs, com comprimento de onda (λ) de 830 nm, programado para operar numa potência de saída de 30 mw e dose de 10 J, de acordo com os parâmetros adotados por Bjordal et al. (2003), que define λ 830 nm (laser infravermelho), potência de saída entre 15 – 105 mw/cm² e dose de 0.5 – 15 J, para distúrbios inflamatórios crônicos da ATM. Corroborando com nossos resultados, Carvalho et al. (2011) observaram que o LBP foi eficiente na redução das alterações morfológicas da artrite, experimentalmente induzida na ATM, controlando a hiperplasia da membrana sinovial e formação de vilos. Os autores utilizaram dose de 9 J com λ 780 nm, ou uma combinação (λ 780 e 660 nm), sendo verificada maior eficácia da terapia isolada. Para estes autores, o laser infravermelho (λ 780-820 nm) é mais eficaz para distúrbios da ATM em comparação o laser vermelho (λ 660 nm).

Ainda dando suporte aos nossos resultados, outros trabalhos têm demonstrado significativa redução no número de células inflamatórias e na gravidade do processo inflamatório induzido em outras articulações, após tratamento com o LBP (PALLOTTA et al., 2012; ALVES et al., 2014; CARLOS et al., 2014). Pallotta et al. (2012), utilizando um laser com λ 810 nm, verificaram que a dose de 10 J foi mais eficiente em comparação as doses de 1, 3 e 6 J, embora ambas as doses tenham demonstrado efeitos anti-inflamatórios na artrite induzida no joelho de ratos. Já Alves et al. (2012) e Carlos et al. (2012) obtiveram resultados positivos na artrite do joelho utilizando doses menores e diferentes comprimento de onda, respectivamente, 4 J com λ 808 nm, e 3 J com λ 660 nm.

Duas revisões sistemáticas também revelaram fortes evidências de que o LBP modulou a resposta inflamatória aguda e crônica, reduzindo os níveis de marcadores bioquímicos (PGE2, Cox 2, IL-1 β , TNF- α), infiltração de neutrófilos, estresse oxidativo e formação de edema (BJORDAL et al., 2003; BJORDAL et al., 2006).

Neste sentido, o LBP pode acelerar o processo de reparo do tecido e reduzir a presença de alterações morfológicas na articulação (ALVES et al., 2014), o que foi claramente demonstrado no presente estudo.

Outro estudo, no entanto, não observou redução significativa da inflamação induzida no tecido retrodiscal (retrodiscite) da ATM de coelhos (KUCUK et al., 2010). Estes autores utilizaram um laser com λ 815 nm e dose de 12 J, e apenas análises por meio de cintilografia foram realizadas, dificultando comparações com os dados obtidos pelo presente estudo e os demais citados anteriormente.

O GH exibiu menores alterações morfológicas em comparação ao GA. A morfometria do disco articular mostrou redução estatisticamente significativa na espessura do disco apenas na região posterior em comparação a GA. À região média, no entanto, permaneceu com espessura elevada.

À semelhança de nossos resultados, outros trabalhos demonstraram significativo efeito de diferentes pesos moleculares do HS na redução de células inflamatórias, hiperplasia da membrana sinovial, formação de pannus, destruição da cartilagem articular e anormalidades ósseas na ATM ou em outras articulações (XINMIN; JIAN, 2005; LO et al., 2007; CHOU et al., 2011; EL-HAKIM; ELYAMANI, 2011).

Sustentando nossos resultados, Duygu et al. (2011) e Li et al. (2012) demonstraram que o HSAPM foi eficaz, na fase inicial da osteoartrite, na proteção da cartilagem articular e retardo na progressão de alterações degenerativas.

O possível efeito protetor do HSAPM pode ser explicado pela capacidade de regular a viscosidade e propriedades lubrificantes do fluido sinovial, funcionando como barreira protetora na membrana sinovial e superfícies articulares (DUYGU et al., 2011), além de bloquear a atividade de várias MMPs e citocinas pró-inflamatórias (WANG et al., 2006; HASHIZUME et al., 2010; SHIMIZU et al., 2010; CAMPO et al., 2011).

O HSAPM também é capaz de induzir a formação de ácido hialurônico endógeno por sinoviócitos em articulações com osteoartrite (SMITH; GHOSH, 1987; BAGGA et al., 2006). O ácido hialurônico interage através de uma proteína de ligação com proteoglicanos, formando complexos macromoleculares altamente hidratados responsáveis pela resistência à compressão na cartilagem (HARDINGHAM, 1999). Neste sentido, a região média do disco articular, por apresentar maior conteúdo de GAGs, (DETAMORE et al., 2005; WILLARD et al., 2012), pode exibir maior interação com o hialuronato endógeno e/ou exógeno, justificando a maior espessura desta região observado no presente estudo.

O GHL também exibiu menores alterações morfológicas e espessura do disco articular em comparação ao GA, sendo que a região anterior do disco apresentou maior redução da espessura.

Nossos resultados sugeriram efeito positivo do tratamento, uma vez que exibem propriedades anti-inflamatórias e protetoras dos componentes da ATM. Entretanto, a literatura ainda nos é ineficiente para discussão do tratamento em questão (LBP/HSAPM).

A redução da espessura do disco articular foi significativa apenas na região anterior, possivelmente devido à interação do hialuronato com os proteoglicanos, especialmente na região média do disco articular (HARDINGHAM, 1999).

6.2 Organização e compactação da rede de fibras colágenas

O principal componente estrutural do disco articular da ATM é o colágeno, cujo conteúdo total varia entre 16,5% e 30,1% do peso úmido (DETAMORE et al., 2005; ALMARZA et al., 2006; KALPAKCI et al., 2011).

O colágeno do disco articular é quase exclusivamente do tipo I, organizando-se na forma de feixes de fibras, orientados, principalmente, em direção anteroposterior na região média e, mediolateral nas regiões anterior e posterior do disco articular (DETAMORE et al., 2005), sendo associado às propriedades mecânicas do disco, tais como resistência a tensão e a tenacidade (DETAMORE; ATHANASIOU, 2003; DETAMORE et al., 2005; ALMARZA et al., 2006).

Nesse estudo, a organização e compactação das fibras colágenas no disco articular foram avaliadas por meio de cortes sagitais da ATM, corados em picrossírius e examinados em microscópio de luz polarizada. Utilizando-se o mesmo tipo de microscopia, também, foi realizado o cálculo do valor médio de cinza em pixel no disco articular, para determinação da birrefringência das fibras colágenas (VIDAL, 2010).

No disco articular, o GC exibiu coloração avermelhada e elevada birrefringência, o que sugeriu alto grau de organização e compactação das fibras colágenas (VIDAL, 2010). Contrariamente, o GA apresentou coloração esverdeada e birrefringência estatisticamente menor em comparação ao GC nas três regiões anatômicas do disco articular, o que indicou elevada desorganização da rede de fibras colágenas e intensa degradação da MEC (VIDAL, MELLO, PIMENTEL, 1982; VIDAL, 2010).

Consistente com os nossos resultados, Guerra et al. (2010) demonstraram que distúrbios na ATM podem promover degradação da rede de fibras colágenas do disco articular, fazendo com que o mesmo apresente coloração esverdeada quando corados em picrossírius e avaliados em microscópio de luz polarizada.

Concordando com Wang et al. (2012) e George et al. (2013), acreditamos que a desorganização das fibras colágenas seja resultante de uma inflamação persistente induzida pela injeção de CFA, com marcada infiltração de células inflamatórias mononucleares. Concordes, também com Spears et al. (2005) e Kramer et al. (2010) que, destacaram o aumento da síntese ou ativação de citocinas pró-inflamatórias e de enzimas com atividades

colagenolíticas, tais como as metaloproteinases (MMPs), que degradam todos os componentes da MEC, inclusive o colágeno tipo I (YOSHIDA et al., 2006; LORETO, et al., 2013).

Nos GL, GH e GHL foram observadas coloração avermelhada e birrefringência estatisticamente maior em todas as três regiões do disco articular quando comparados ao GA, indicando maior organização e compactação das fibras colágenas (VIDAL, MELLO, PIMENTEL, 1982; VIDAL, 2010).

Corroborando com nossos resultados, Alves et al. (2014) verificaram que o LBP foi eficaz na reparação de tecidos e aumento da organização da rede de fibras colágenas. Por outro lado, Carlos et al. (2014), demonstraram significativo aumento da organização das fibras colágenas na membrana sinovial em ratos com artrite da articulação do joelho após tratamento com LBP.

No que concerne aos efeitos do HSAPM, trabalhos têm mostrado resultados significativos na redução de alterações morfológicas e degenerativas na ATM e em outras articulações (XINMIN; JIAN, 2005; DUYGU et al., 2011; LI et al., 2012).

O aumento ocorrido na organização das fibras de colágeno nos grupos, GL, GH ou GHL, sugerem-nos uma eficiência do LBP, HSAPM e da combinação dos dois na inibição das alterações degenerativas no disco articular.

Portanto, acreditamos que os resultados obtidos se devam aos efeitos anti-inflamatórios do LBP e HSAPM conforme relatado na literatura por Bjordal et al. (2003); Bjordal et al. (2006); Wang et al. (2006); Hashizume et al. (2010); Kucuk et al. (2010); Carvalho et al. (2011) e Alves et al. (2014); bem como a redução da síntese ou atividade de enzimas que degradam fibras colágenas, tais como as MMPs (WANG et al., 2006; HSIEH et al., 2008; KAROUSOU et al., 2008; SHIMIZU et al., 2010; ALVES et al., 2014; MARCOS et al., 2014).

6.3 Proteoglicanos e GAGs sulfatados

No presente estudo, a avaliação dos proteoglicanos (PGs) no disco articular foi realizada por meio de cortes sagitais da ATM, corados em Azul de Toluidina (AT) e, a

quantificação de GAGs determinada por meio do método de azul de dimetilmetilenol – DMMB (FARNDALE; BUTTLE; BARRET, 1986).

No GA, observou-se maior metacromasia nas três regiões anatômicas do disco articular em comparação ao grupo controle (GC), sugerindo-se maior concentração de PGs. Em contrapartida, a dosagem de GAGs dos tecidos da ATM (cápsula, disco e tecido retrodiscal) mostrou valores estatisticamente superiores em comparação ao GC.

Consistente com os nossos resultados, Guerra et al. (2010) também descreveram maior metacromasia no disco articular após indução de processo degenerativo da ATM.

Outros trabalhos tem demonstrado significativo aumento da expressão de RNAm de PGs, tais como agregam e lumicam no disco articular de pacientes com osteoartrite ou artralgia da ATM. Com isso, sugerem que, danos causados ao disco articular podem promover alterações bioquímicas na MEC, originando uma elevada síntese de PGs (PAEGLE; HOLMLUND; HJERPE, 2005; KIGA et al., 2011).

De acordo com Paegle, Holmlund, Hjerpe (2005) a fase inicial da osteoartrite é marcada por um aumento na síntese dos componentes da MEC, inclusive de PGs e GAGs. No entanto, em estágios mais avançados da doença a degradação de PGs e sua liberação no fluido sinovial prevalecem, como resultado de um desequilíbrio entre os processos degenerativos e de reparo (ISHIMARU et al., 2001; PAEGLE; HOLMLUND; HJERPE, 2005).

Os PGs desenvolvem importante papel na compactação e organização das fibras colágenas (KIGA et al., 2010) e, exercem ação fundamental na regeneração da ATM (KIGA et al., 2010; KIGA et al., 2011; KIGA, 2012). Além disso, também tem sido descrito uma ação sobre a regulação da condrogênese e remodelamento da MEC na cartilagem articular de ATMs com osteoartrite (EMBREE et al. 2010).

Portanto, o aumento da concentração de PGs e GAGs, observado no presente estudo, sugere-nos, uma clara tentativa de reparo do disco articular após indução de atrite por meio de injeção de CFA.

Nos GL, GH e GHL foi observada menor metacromasia nas regiões anterior e posterior do disco articular e, menores concentrações de GAGs nos tecidos da ATM em comparação ao GA, porém, sem diferenças estatísticas.

A literatura demonstrou que o LBP exibe uma ação anti-inflamatória e moduladora de várias citocinas pró-inflamatórias e enzimas que degradam a matriz, acelerando os processos de reparo (KAROUSOU et al., 2008; GUERRA et al., 2013; ALVES et al., 2014, MARCOS et al., 2014), enquanto o HSAPM apresenta ação significativa na proteção das superfícies articulares, e prevenção da degradação de GAGs na cartilagem articular (LI et al., 2012).

Nossos resultados demonstraram um maior grau de remodelamento da MEC, nos grupos GL, GH e GHL em comparação ao GA, o que nos sugere, uma potencialização dos processos de reparo através da aplicação de ambas as terapias propostas. Novos estudos, com marcações específicas de PGs, tais como o biglicam, decorim, versicam, agrecam e lumicam são necessários para confirmação de tal ação e melhor entendimento das funções específicas destes PGs em processos patológicos da ATM.

6.4 Atividade das Gelatinases (MMP-9 e MMP-2)

No presente estudo, as atividades de todas as isoformas da MMP-9 (latente e ativa) e MMP-2 (intermediária, latente e ativa) foram estatisticamente mais elevadas no grupo de ratos com artrite (GA) em comparação ao grupo controle (GC).

Corroborando com nossos resultados, diversos trabalhos têm demonstrado a presença de MMP-2 e MMP-9 no fluido sinovial ou disco articular de pacientes com osteoartrite e desarranjo interno, indicando um papel essencial destas MMPs nas disfunções da ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS, et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006; LORETO, et al., 2013).

Estudos prévios têm demonstrado que injeções intra-articulares de CFA na ATM induziram o surgimento de alterações artríticas, tais como degeneração das estruturas articulares e intensa resposta inflamatória com liberação de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo de TNF- α e IL-1 β (SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; WANG et al., 2012).

Essas citocinas modulam a expressão de metaloproteinases, principalmente as MMPs 1, 3, 9 e 13, ao estimular sua síntese e liberação no meio extracelular (IJIMA;

KOBAYASHI; KUBOTA, 2001; GE et al., 2009). Já a MMP-2 pode ser ativada por ação das MMPs 1 e 13 (CLARK; MURPHY, 1999; LU et al., 2011).

Acredita-se que a MMP-2 tenha um papel essencial no remodelamento e manutenção da integridade da MEC, sendo sintetizada por células da membrana sinovial, fibroblastos e condrócitos (MIZUI et al., 2001; GILLARD et al., 2004; YOSHIDA et al., 2006), no entanto, em níveis elevados sugere condições patológicas da articulação (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2002).

Por outro lado, a MMP-9 pode ser sintetizada em grande quantidade por células inflamatórias, e, portanto, proeminente em condições inflamatórias articulares, tais como a osteoartrite da ATM (MIZUI et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006).

No presente estudo, justifica-se, portanto, ambas as MMPs apresentarem índices elevados no GA, o que indicou a presença de inflamação ativa com degradação dos componentes da MEC, especialmente colágeno, o que foi refletido nos valores de birrefringência das fibras colágenas, conforme descrito anteriormente nesta discussão.

No GL foi observada atividade estatisticamente menor das isoformas ativas tanto da MMP-9 como da MMP-2 em comparação ao GA. Até o momento, não foram verificados trabalhos que avaliaram a ação do LBP sobre a MMP-2 e MMP-9, em distúrbios da ATM. No entanto, a existência de estudos em outras articulações, tais como a do joelho, demonstraram efeitos significativos do laser na redução das MMPs, em artrite experimentalmente induzida (ALVES et al., 2014; CARLOS et al., 2014).

Alguns estudos que investigaram os efeitos do LBP sobre a atividade de MMPs em outros tecidos, tais como o tendão de Aquiles e músculos, também mostraram que o LBP é capaz de modular a atividade da MMP-2 e MMP-9 (KAROUSOU et al., 2008; GUERRA et al., 2013; IYOMASA et al., 2013; MARCOS et al., 2014).

Foi demonstrado, também, que o LBP regula o processo inflamatório, melhora a cicatrização, estimula a síntese de colágeno e, modula o equilíbrio entre enzimas que agem no remodelamento da matriz, tais como as MMPs (ALVES et al., 2014). Portanto, nosso estudo concorda com o autor, pois verificamos que a redução de MMP-2 e MMP-9, sugere que o LBP é capaz de acelerar o processo de reparo na artrite induzida por CFA, reduzindo o desenvolvimento de alterações morfológicas e degradação da MEC, já mencionadas anteriormente.

No GH a quantidade de todas as isoformas da MMP-2 e MMP-9 foram estatisticamente menores em comparação ao GA. Corroborando com nossos resultados, vários trabalhos demonstraram que o HS pode desempenhar um efeito protetor nas estruturas articulares, agindo na supressão da atividade ou síntese de várias MMPs e citocinas pró-inflamatórias (WANG et al., 2006; HSIEH et al., 2008; HASHIZUME et al., 2010; SHIMIZU et al., 2010; CAMPO et al., 2011; LI et al., 2012).

Embora diferentes pesos moleculares do HS sejam eficazes na redução de MMP-2 e MMP-9, o HSAPM mostrou-se mais eficiente (HSIEH et al., 2008).

Consistente com nossos resultados, um estudo *in vitro* destacou o potencial significativo do HSAPM na redução da expressão dos genes de 16 citocinas ou enzimas associadas à osteoartrite, incluindo a MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 (WANG et al., 2006). Em contrapartida, Hashizume et al. (2010), demonstraram um significativo efeito na redução de MMP-9, no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite do joelho. Neste sentido, Xinmin e Jian (2005) compararam os efeitos da artrocentese, HSAPM e terapia combinada sobre a osteoartrite induzida na ATM de coelhos e verificaram que a artrocentese não foi eficaz na redução das alterações morfológicas. No entanto, o tratamento com HSAPM ou terapia combinada demonstraram efeitos significativos, descartando assim, o efeito de lavagem do HS.

A literatura é ainda ineficiente com relação à influência do HSAPM sobre as MMPs em distúrbios da ATM. O presente estudo destaca-se por ser o pioneiro a demonstrar o papel do HSAPM na redução da MMP-2 e MMP-9 em ATMs com artrite induzida. A redução verificada comprova a ação droga na proteção dos componentes desta articulação.

Já o GHL exibiu as maiores reduções em ambas as isoformas da MMP-2 e MMP-9 em comparação ao grupo controle. Tais resultados sugerem que a associação das duas terapias representou a potencialização dos seus efeitos sobre a atividade das MMPs. Não há dados na literatura de utilização das duas terapias em conjunto.

7. CONCLUSÃO

Com base nas condições experimentais e nos achados histológicos e bioquímicos obtidos, podemos concluir que:

- O modelo proposto de inflamação da ATM foi satisfatório e mostrou-se eficiente para desenvolver, em até 28 dias, importantes mudanças morfológicas e estruturais compatíveis com as alterações artríticas da ATM, tais como aumento da espessura do disco articular, proliferação da membrana sinovial com formação de vilos e pannus, infiltração de células inflamatórias mononucleares no tecido subsinovial, desorganização da rede de fibras colágenas, aumento da concentração de GAGs e aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9.
- Os tratamentos com LBP, HSAPM e com os dois tratamentos, simultaneamente, foram eficientes na proteção das estruturas articulares e na rapidez nos processos de reparo, após indução de artrite na ATM com CFA, promovendo:
 - a) Redução das alterações morfológicas e menor espessura do disco articular;
 - b) Melhor organização e compactação das fibras colágenas;
 - c) Tendência de redução na concentração de GAGs e;
 - d) Menor atividade de MMP-2 e MMP-9.
- O tratamento simultâneo com LBP e HSAPM, à exceção da atividade das MMPs, não superou os efeitos isolados de cada um dos respectivos tratamentos.

8. REFERÊNCIAS

1. ALMARZA, A. J.; BEAN, A. C.; BAGGETT, L. S.; ATHANASIOU, K. A. Biochemical analysis of the porcine temporomandibular joint disc. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, p. 124–8, 2006.
2. ALTMAN, R. D.; AKERMARK, C.; BEAULIEU, A. D.; SCHNITZER, T. Efficacy and safety of a single intra-articular injection of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA) in patients with osteoarthritis of the knee. **Osteoarthr cartil**, v. 12, n. 8, p. 642-9, 2004.
3. ALVES, A. C. A.; ALBERTINI, R. SANTOS, S. A.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; SANTANA, E.; JORGE SERRA, A. J. et al. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. **Lasers Med Sci**, v. 29, n.3, p. 911–9, 2014.
4. BADEL, T.; MAROTTI, M.; KROLO, I.; KERN, J.; KEROS, J. Occlusion in Patients with Temporomandibular Joint Anterior Disk Displacement. **Acta Clín Croat**, v. 47, n. 3, p. 129-136, 2008.
5. BAGGA, H.; BURKHARDT, D.; SAMBROOK, P.; MARCH, L. Longterm effects of intraarticular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee. **J Rheumatol**, v. 33, n. 5, p. 946-50, 2006.
6. BOETTGER, M. K.; KÜMMEL, D.; HARRISON, A.; SCHAIBLE, H. Evaluation of long-term antinociceptive properties of stabilized hyaluronic acid preparation (NASHA) in an animal model of repetitive joint pain. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 4, p. 110-21, 2011.
7. BONJARDIM, L. R.; LOPES-FILHO, R. J.; AMADO, G.; ALBUQUERQUE - JÚNIOR, A. L. C.; GONÇALVES, S. R. J. Association between symptoms of temporomandibular disorders and gender, morphological occlusion, and psychological factors in a group of university students. **Indian J Dent Res**, v. 20, n.2, p.190-4, 2009.

8. BJORDAL, J. M.; COUPPÉ, C.; CHOW, R. T.; TUNÉR, J.; LJUNGGREN, E. A. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Aust J Physiother**, v. 49, n. 2, p. 107-16, 2003.
9. BJORDAL, J. M.; JOHNSON, M. I.; IVERSEN, V.; AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Low-Level Laser Therapy in Acute Pain: A Systematic Review of Possible Mechanisms of Action and Clinical Effects in Randomized Placebo-Controlled Trials. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 2, p. 158-68, 2006.
10. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.
11. CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ASCOLA, A.; NASTASI, G.; CALATRONI, A. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes. **Biochimie**, v. 92, n. 2, p. 204-15, 2010.
12. CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; NASTASI, G.; MICALI, A.; PRESTIPINO, V.; VACCARO, M. et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 9, p. 1170–81, 2011.
13. CARLOS, F. P.; SILVA, M. P. A.; MELO, E. L. V. S.; COSTA, M. S.; ZAMUNER, S. R. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 2, p. 757–63, 2014.
14. CARVALHO, C. M.; LACERDA, J. A.; NETO, F. P. S.; CASTRO, I. C. V.; RAMOS, T. A.; LIMA, F. O. et al. Evaluation of Laser Phototherapy in the Inflammatory Process of the Rat's TMJ Induced by Carrageenan. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 4, p. 245-54, 2011.
15. ÇETINER, S.; KAHRAMAN, S. A.; YÜCETAS, S. Evaluation of Low-Level Laser Therapy in the Treatment of Temporomandibular Disorders. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 5, p. 637-41, 2006.
16. CHANG, H.; ISRAEL, H. Analysis of inflammatory mediators in temporomandibular joint synovial fluid lavage samples of symptomatic patients and asymptomatic controls. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, n. 6, p.761-5, 2005.

17. CHOU, L. W.; WANG, J.; CHANG, P. L.; HSIEH, Y. L. Hyaluronan modulates accumulation of hypoxiainducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 3, p. 1-13, 2011.
18. CHU, S. C.; YANG, S. F.; LUE, K. H.; HSIEH, Y. S.; LEE, C. Y.; CHOU, M. C. et al. Glucosamine sulfate suppresses the expressions of urokinase plasminogen activator and inhibitor and gelatinases during the early stage of osteoarthritis. **Clinica Chimica Acta**, v. 372, n. 1-2, p. 167-72, 2006.
19. CLARK, I. M.; MURPHY, G. Matrix Proteinases, in SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism**. San Diego: Academic press, cap. 10, p. 137-150, 1999.
20. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1268p.
21. CONTI, P. C.; VALLE, A. L.; SCOLARO, J. M. Alterações Degenerativas da Articulação Temporomandibular. Conceitos Relacionados à Etiologia e Controle. **JBA**, v.1, n.4, p.308-33, 2001.
22. DE LEEUW, R. **Dor orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento**. 4ª ed. São Paulo: Quintessence, 2010. 315 p.
23. DELBONI, M. E.; ABRÃO, J. Estudo dos sinais de DTM em pacientes ortodônticos assintomáticos. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 10, n. 4, p. 88-96, 2005.
24. DETAMORE, M. S.; ATHANASIOU, K. A. Motivation, Characterization, and Strategy for Tissue Engineering the Temporomandibular Joint Disc. **Tissue Eng**, v. 9, n. 6, p. 1065-87, 2003.
25. DETAMORE, M. S.; ORFANOS, J. G.; ALMARZA, A. J.; FRENCH, M. M.; WONG, M. E.; ATHANASIOU, K. A. Quantitative analysis and comparative regional investigation of the extracellular matrix of the porcine temporomandibular joint disc. **Matrix Biol**, v. 24, n. 1, p. 45-57, 2005.
26. DUYGU, G.; GÜLER, G.; ÇAM, B.; KÜRKCÜ, M. The effects of high molecular weight hyaluronic acid (Hylan G-F 20) on experimentally induced temporomandibular joint osteoarthritis: part II. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, n. 12, p. 1406-13, 2011.

27. DWORKIN S, LERESCHE L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. **J Craniomandib Disord**, v. 6, n. 4, p. 301-55, 1992.
28. EL-HAKIM, I. E.; ELYAMANI, A. O. Preliminary evaluation of histological changes found in a mechanical arthropatic temporomandibular joint (TMJ) exposed to an intra-articular Hyaluronic acid (HA) injection, in a rat model. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 39, n. 8, p. 610-4, 2011.
29. EMBREE, M. C.; KILTS, T. M.; ONO, M.; INKSON, C. A.; SYED-PICARD, F.; KARSDAL, M. A. et al. Biglycan and Fibromodulin Have Essential Roles in Regulating Chondrogenesis and Extracellular Matrix Turnover in Temporomandibular Joint Osteoarthritis. **Am J Pathol**, v. 176, n. 2, p. 812–26, 2010.
30. FARNDAL, R.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochim Biophys Acta**, v. 883, n. 2, p. 173-7, 1986.
31. FIKÁCKOVÁ, H., DOSTÁLOVÁ, T., NAVRÁTIL, L., KLASCHKA, J. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular joint disorders: a placebo-controlled study. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n.4, p.297-303, 2007.
32. GAMEIRO, G. H.; ANDRADE, A. S.; NOUER, D. F.; VEIGA, M. C. F. A. How may stressful experiences contribute to the development of temporomandibular disorders? **Clin Oral Invest**, v. 10, n. 4, p. 261-8, 2006.
33. GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1975.
34. Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
35. GAVISH, A.; HALACHMI, M.; WINOCUR, E.; GAZIT, E. Oral habits and their association with signs and symptoms of temporomandibular disorders in adolescent girls. **J Oral Rehabil**, v. 27, n. 1, p. 22–32, 2000.
36. GE, X.; MA, X.; MENG, J.; ZHANG, C.; MA, K.; ZHOU, C. Role of Wnt-5A in Interleukin-1_β-Induced Matrix Metalloproteinase Expression in Rabbit

- Temporomandibular Joint Condylar Chondrocytes. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 9, p. 2714–22, 2009.
37. GEORGE, M. D.; OWEN, C. M.; REINHARDT, A. L.; GIANNINI, P. J.; MARX, D. B.; REINHARDT, R. A. Effect of Simvastatin Injections on Temporomandibular Joint Inflammation in Growing Rats. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 5, p.846-53, 2013.
38. GESCH, D.; BERNHARDT, O.; MACK, F.; JOHN, U.; KOCHER, T.; ALTE, D. Association of Malocclusion and Functional Occlusion with Subjective Symptoms of TMD in Adults: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). **Angle Orthod**, v. 75, n. 2, p. 183-190, 2005
39. GHASSEMI-NEJAD, S.; KOBEZDA, T.; RAUCH, T. A.; MATESZ, C.; GLANT, T. T.; MIKECZ, K. Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular joints in mice with autoimmune inflammatory arthritis. **Osteoarthr Cartil**, v. 19, n. 4, p. 458–65, 2011.
40. GILLARD, J. A.; REED, M. W. R.; BUTTLE, D.; CROSS, S. S., BROWN, N. J. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. **Wound Rep Reg**. v. 12, n. 13, p. 295–304, 2004.
41. GONÇALVES, D., A., G.; FABBRO, A., L., D.; CAMPOS, J., A., D., B.;BIGAL, M., E.; SPECIALI, J. G. Symptoms of Temporomandibular Disorders in the Population: An Epidemiological Study. **J Orofac Pain**, v. 24, n. 3, p. 270-8, 2010.
42. GRAY, H.; GOSS, C. M. **Gray Anatomia**. 29^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
43. GUARDA-NARDINI, L.; OLIVIERO, F.; RAMONDA, R.; FERRONATO, G. Influenza delle infiltrazioni intra-articolari con acido ialuronico sugli indici clinici e sui livelli di ossido nitrico nell'artrosi temporomandibolare. **Reumatismo**, v. 56, n. 4, p. 272-7, 2004.
44. GUERRA, F. R. **Avaliação morfológica e bioquímica do disco articular da ATM de ratos submetidos à terapia com o laser de baixa potência: estudo experimental em animais portadores de disfunção temporomandibular.**

- Campinas: Unicamp, 2009. 92 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2009.
45. GUERRA, F. R.; SOUZA PIRES I. L. S.; ARO A. A.; CAMARGO, L. C.; PIMENTEL, E. R.; PALOMARI, E. T. Protocol on induction of TMJ articular disc degeneration in rats by utilization of botulinum toxin. **Arch Oral Biol**, 2010 v. 55, n. 7, p. 530-4, 2010
 46. GUERRA, F. D. R.; VIEIRA, C. P.; ALMEIDA, M. S.; OLIVEIRA, L. P.; ARO, A. A.; PIMENTEL, E. R. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 5, p. 1281–8, 2013.
 47. HARDINGHAM, T. Proteoglycans and Glycosaminoglycans, in SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism**. San Diego: Academic press, cap. 5, p. 71-81, 1999.
 48. HARPER, R. P.; KERINS, C. A.; MCINTOSH, J. E.; SPEARS, R.; BELLINGER, L. L. Modulation of the inflammatory response in the rat TMJ with increasing doses of complete Freund's adjuvant. **Osteoarthr Cartil**, v. 9, n. 7, p. 619–24, 2001.
 49. HASHIZUME, M.; KOIKE, N.; YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; MIHARA, M. High molecular weight hyaluronic acid relieved joint pain and prevented the progression of cartilage degeneration in a rabbit osteoarthritis model after onset of arthritis. **Mod Rheumatol**, v. 20, n. 5, p. 432–8, 2010.
 50. HASKIN, C. L.; MILAM, S. B.; CAMERON, I. L. Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 6, n.3, p. 248-77, 1995.
 51. HILGENBERG, P. B.; SALDANHA, A. D. D.; CUNHA, C. O.; RUBO, J. H.; CONTI, P. C. R. Temporomandibular disorders, otologic symptoms and depression levels in tinnitus patients. **J Oral Rehabil**, v. 39, n. 4, p. 239-44, 2012.
 52. HSIEH, Y. S.; YANG, S. F.; LUE, K. H.; CHU, S. C.; LU, K. H. Effects of Different Molecular Weight Hyaluronan Products on the Expression of Urokinase Plasminogen Activator and Inhibitor and Gelatinases during the Early Stage of Osteoarthritis. **J Orthop Res**, v. 26, n. 4, p. 475–84, 2008.
 53. HUANG, G. S.; LEE, H. S.; CHOU, M. C.; SHIH, Y. Y. I., TSAI, P. H.; LIN, M. H. et al. Quantitative MR T2 measurement of articular cartilage to assess the

- treatment effect of intra-articular hyaluronic acid injection on experimental osteoarthritis induced by ACLX. **Osteoarthr Cartil**, v. 18, n. 1, p. 54-60, 2010.
54. IJIMA, Y.; KOBAYASHI, M.; KUBOTA, E. Role of interleukin-1 in induction of matrix metalloproteinases synthesized by rat temporomandibular joint chondrocytes and disc cells. **Eur J Oral Sci**, v. 109, n. 1, p. 50-9, 2001.
55. ISRAEL, H. A.; RAMAMURTHY, N. S.; GREENWALD, R.; GOLUB, L. The potential role of Doxycycline in the treatment of osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Adv Dent Res**, v. 12, n. 2, p. 51-5, 1998.
56. ISHIMARU, J. I.; OGI, N.; MIZUNO, S.; GOSS, A. N. Quantitation of chondroitin-sulfates, disaccharides and hyaluronan in normal, early and advanced osteoarthritic sheep temporomandibular joints. **Osteoarthr Cartil**, v. 9, n. 4, p. 365-70, 2001.
57. IYOMASA, M. M.; RIZZI, E. C.; LEÃO, J. C.; ISSA, J. P. M.; DIAS, F. J.; PEREIRA, Y. C. L. et al. Zymographic and ultrastructural evaluations after low-level laser irradiation on masseter muscle of HRS/J strain mice. **Lasers Med Sci**, v. 28, n.3, p. 777-83, 2013.
58. JØRGENSEN, A.; STENGAARD-PEDERSEN, K.; SIMONSEN, O.; PFEIFFER-JENSEN, M.; ERIKSEN, C.; BLIDDAL, H. et al. Intra-articular hyaluronan is without clinical effect in knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind study of 337 patients followed for 1 year. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 6, p.1097-102, 2010.
59. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
60. JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v.11,n. 4, p. 447-55, 1979.
61. KALPAKCI, K. N.; WILLARD, V. P.; WONG, M. E.; ATHANASIOU, K. A. An Interspecies Comparison of the Temporomandibular Joint Disc. **J Dent Res.**, v. 90, n. 2, p.193-8, 2011.
62. KAMEOKA, S.; KUROKI, Y.; HONDA, K.; KIJIMA, N.; MATSUMOTO, K.; ASANO, M. et al. Diagnostic accuracy of microcomputed tomography for osseous

- abnormalities in the rat temporomandibular joint condyle. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 38, n. 7, p. 465-9, 2009.
63. KAPILA, S.; LEE, C.; TAVAKKOLI JOU, M. R.; MILLE, A. J.; RICHARDS, D. W. Development and Histologic Characterization of an Animal Model of Antigen-induced Arthritis of the Juvenile Rabbit Temporomandibular Joint. **J Dent Res**, v. 74, n.12, p.1870-9, 1995.
 64. KAROUSOU, E.; RONGA, M.; VIGETTI, D.; PASSI, A.; MAFFULLI, N. Collagens, Proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. **Clin Orthop Relat Res**, v. 466, n. 7, p. 1577–82, 2008.
 65. KIERNAN, J.A. **Histological and histochemical methods**. Theory and practice. 3 ed. Oxford: Pergamo Press, p.81-2, 1981.
 66. KIGA, N.; TOJYO, I.; MATSUMOTO, T.; HIRAISHI, Y.; SHINOHARA, Y.; FUJITA, S. Expression of lumican related to CD34 and VEGF in the articular disc of the human temporomandibular joint. **Eur J Histochem**, v. 54, n. 34, p. 148-53, 2010.
 67. KIGA, N.; TOJYO, I.; MATSUMOTO, T.; HIRAISHI, Y.; SHINOHARA, Y.; MAKINO, S. et al. Expression of lumican and fibromodulin following interleukin-1 beta stimulation of disc cells of the human temporomandibular joint. **Eur J Histochem**, v. 55, n. 11, p. 63-7, 2011.
 68. KIGA, N. Histochemistry for studying structure and function of the articular disc of the human temporomandibular joint. **Eur J Histochem**, v. 56, n. 11, p. 56-7, 2012.
 69. KRAMER, P. R.; KERINS, C. A.; SCHNEIDERMAN, E.; BELLINGER, L. L. Measuring persistent temporomandibular joint nociception in rats and two mice strains. **Physiol Behav**, v. 99, n. 5, p. 669–78, 2010.
 70. KRISTENSEN, K. D.; STOUSTRUP, P.; SELER, A. K.; PEDERSEN, T. K. NYENGAARD, J. R.; HAUGE, E. M. et al. Quantitative histological changes of repeated antigeninduced arthritis in the temporomandibular joints of rabbits treated with intra-articular corticosteroid. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 7, p. 437–44, 2008.
 71. KUCUK, B. B.; ORAL, K.; SELCUK, N. A.; TOKLU, T. The Anti-inflammatory Effect of Low-Level Laser Therapy on Experimentally Induced Inflammation of

- Rabbit Temporomandibular Joint Retrodiscal Tissues. **J Orofac Pain**, v. 24, n. 3, p. 293-7, 2010.
72. KUROKI, Y.; HONDA, K.; KIJIMA, N.; WADA, T.; ARAI, Y.; MATSUMOTO, N et al. In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint. **Oral Dis**, v. 17, n. 5, p. 499–507, 2011.
73. KYRKANIDES, S.; FIORENTINO, P.M.; MILLER, J. H.; GAN. Y. LAI, Y. C.; SHAFTEL, S. S. et al. Amelioration of Pain and Histopathologic Joint Abnormalities in the Col1-IL-1_XAT Mouse Model of Arthritis by Intraarticular Induction of Opioid Receptor Into the Temporomandibular Joint. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 6, p.2038-48, 2007.
74. LAI, Y. C.; SHAFTEL, S. S.; MILLER, J. N.; TALLENTS, R. H.; CHANG, Y.; PINKERT, C. A. et al. Intraarticular induction of interleukin-1beta expression in the adult mouse, with resultant temporomandibular joint pathologic changes, dysfunction, and pain. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 4, p. 1184-97, 2006.
75. LI, P.; RAITCHEVA, D.; HAWES, M.; MORAN, N.; YU, X.; WANG, F. et al. Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms. **Osteoarthr Cartil**, v. 20, n. 11, p. 1336-46, 2012.
76. LO, Y. J.; SHEU, M. T.; TSAI, W. C.; LIN, Y. H.; LI, J. L.; LIANG, Y. C. et al. Intra-articular injection of hyaluronate and indomethacin in rabbits with antigen-induced arthritis. **Rheumatol Int**, v. 27, n. 12, p. 1099–111, 2007.
77. LORETO, C.; LEONARDI, R.; MUSUMECI, G.; PANNONE, G.; CASTORINA, S. An ex vivo study on immunohistochemical localization of MMP-7 and MMP-9 in temporomandibular joint discs with internal derangement. **Eur J Histochem**, v. 57, n.12, 75-9, 2013.
78. LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.3, n. 12, p. 1-24, 2011.
79. LUTHER, F. TMD and occlusion part II. Damned if we don't? Functional occlusal problems: TMD epidemiology in a wider context. **Br Dent J**, v. 202, n.3, p. 1-6, 2007

80. MAIA, M. L. M.; BONJARDIM, L. R.; QUINTANS, J. S. S.; RIBEIRO, M. A. G. MAIA, L. G.; CONTI, P. C. Effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 6, p. 594-602, 2012.
81. MARCOS, R. L.; ARNOLD, G.; MAGNET, V.; RAHOUD, R.; MAGDALOU, J.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 29, p. 272 – 85, 2014.
82. MAZZETTO, M. O.; HOTTA, T. H.; PIZZO, R. C. A. Measurements of Jaw Movements and TMJ Pain Intensity in Patients Treated with GaAlAs Laser. **Braz Dent J**, v. 21, n.4, p. 356-60, 2010.
83. MEDEIROS, S. P.; BATISTA, A. U. D.; Soares FORTE, F. D. S. Prevalência de sintomas de disfunção temporomandibular e hábitos parafuncionais em estudantes universitários. **RGO**, v. 59, n. 2, p. 201-8, 2011
84. MERCURI, L. G. Osteoarthritis, Osteoarthrosis, and Idiopathic Condylar Resorption. **Oral Maxillofacial Surg Clin. N. Am**, v. 20, n. 2, p.169–83, 2008.
85. MERIGHI, L. B. M.; SILVA, M. M. A.; FERREIRA, A. T.; GENARO, K. F.; FELIX, G. B. Ocorrência de disfunção temporomandibular (dtm) e sua relação com hábitos orais deletérios em crianças do município de monte negro – RO. **Rev CEFAC**, v.9, n.4, p. 497-503, 2007.
86. MIZOGUCHI, I.; SCOTT, P. G.; DODD, C. M.; RAHEMTULLA, F.; SASANO, Y.; KUWABARA, M. et al. An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc. **Arch Oral Biol**, v. 43, n. 11, p. 889-98, 1998.
87. MIYAMOTO, K.; ISHIMARU, J. I.; KURITA, K.; GOSS, A. N. Synovial Matrix Metalloproteinase-2 in Different Stages of Sheep Temporomandibular Joint Osteoarthrosis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 60, n. 1, p. 66-72, 2002.
88. MIZUI, T.; ISHIMARU, J.; MIYAMOTO, K.; KURITA, K. Matrix metalloproteinase-2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint. **Br j Oral Maxillofac Surg**, v. 39, n. 4, p. 310–4, 2001.

89. MOHLIN, B.; AXELSSON, S.; PAULIN, G.; PIETILA, T.; BONDEMARK, L.; BRATTSTROM, V.; HANSEN, K.; HOLM, A. TMD in Relation to Malocclusion and Orthodontic Treatment: A Systematic Review. **Angle Orthod**, v. 77, n. 3, p. 542-548, 2007
90. MONTEIRO, D. R.; ZUIM, P. R. J.; PESQUEIRA, A. A.; RIBEIRO, P. P.; GARCIA, A. R. Relationship between anxiety and chronic orofacial pain of temporomandibular disorder in a group of university students. **J Prosthodont Res**, v. 55, n. 3, p. 154-8, 2010.
91. NAKAGAKI, W. R.; CAMILLI, J. A. Spontaneous healing capacity of calvarial bone defects in mdx mice. **Anat Rec**, v. 295, n. 4, p. 590-6, 2012.
92. .NASCIMENTO, G. C.; RIZZI, E.; GERLACH, R. F.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Expression of MMP-2 and MMP-9 in the rat trigeminal ganglion during the development of temporomandibular joint inflammation. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 11, p. 956-67, 2013.
93. NASCIMENTO, G. C.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. **Physiol Behav**, v. 125, p. 1-7, 2014.
94. NEO, H.; ISHIMARU, J.; KURITA, K.; GOSS, A. N. The Effect of Hyaluronic Acid on Experimental Temporomandibular Joint Osteoarthritis in the Sheep. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 55, n. 10, p. 1114-9, 1997.
95. OLIVEIRA, A. S.; DIAS, E. M.; CONTATO, R.G.; BERZIN F. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorder in Brazilian college students. **Braz Oral Res**, v.20, n.1, p.3-7, 2006
96. OLIVEIRA, W. Disfunção Temporomandibular, in PAIVA, H. J. (org) **Noções e Conceitos Básicos em Oclusão, Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial**. 1ª ed. São Paulo: Editora Santos, cap. 15, p.215-32, 2008.
97. OKESON, J. P. **Tratamento das Desordens Temporomandibulares e Oclusão**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
98. PALLOTTA, R. C.; BJORDAL, J. M.; FRIGO, L.; JUNIOR, E. C. P. J.; TEIXEIRA, S.; LABAT MARCOS, R. L. et al. Infrared (810-nm) low-level laser

- therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 71–8, 2012.
99. PAEGLE, D.I.; HOLMLUND, A.B.; HJERPE, A. Matrix glycosaminoglycans in the temporomandibular joint in patients with painful clicking and chronic closed lock. **Int. J. Oral Maxillofac Surg**, v. 32, n. 4, p. 397-400, 2003.
100. PAEGLE, D. I.; HOLMLUND, A.; HJERPE, A. Expression of proteoglycan mRNA in patients with painful clicking and chronic closed lock of the temporomandibular joint. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 34, n. 6, p. 656–8, 2005.
101. PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 8, p. 617-29, 2004.
102. PEDRONI, C. R.; DE OLIVEIRA, A. S.; GUARATINI, M. I. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in university students. **J Oral Rehabil**, v. 30, n. 3, p. 283–9, 2003.
103. RAMMELSBERG, P.; LERESCHE, L.; DWORKIN, S.; MANCL, L. Longitudinal outcome of temporomandibular disorders: a 5-year epidemiological study of muscle disorders defined by research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. **J Orofac Pain**, v. 17, n. 1, p. 9-20, 2003;
104. RANIERI, R. F. P.; GARCIA, A. R.; JUNQUEIRA, J. M. P. C.; VEDOVELLO FILHO, M. Avaliação da presença de disfunção temporomandibular em crianças. **RGO**, v. 55, n.3, p. 229-37, 2007.
105. SALMOS-BRITO, J. A. L.; MENEZES, R. F.; TEIXEIRA, C. E. C.; GONZAGA, R. K. M.; RODRIGUES, B. H. M.; BRAZ, R. et al. Evaluation of low-level laser therapy in patients with acute and chronic temporomandibular disorders. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 57–64, 2013.
106. SANTOS, E. C. A.; BERTOZ, F. A.; PIGNATTA, L. M. B.; ARANTES, F. M. Avaliação clínica de sinais e sintomas da disfunção temporomandibular em crianças. **R Dental Press Ortodon Ortop**, v. 11, n. 2, p. 29-34, 2006.
107. SATO, S.; OGURI, S.; YAMAGUCHI, K.; KAWAMURA, H. et al. Pumping injection of sodium hyaluronate for patients with non-reducing disc displacement of

- the temporomandibular joint: two year follow-up. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 29, n. 2, p. 89-93, 2001.
108. SHI, Z.; GUO, C.; AWAD, M. Hyaluronate for temporomandibular joint disorders. **Cochrane Database Syst. Rev.** v.1, CD002970, 2003.
109. SHIMIZU, M.; HIGUCHI, H.; TAKAGISHI, K.; SHINOZAKI, T.; KOBAYASHI, T. Clinical and biochemical characteristics after intra-articular injection for the treatment of osteoarthritis of the knee: prospective randomized study of sodium hyaluronate and corticosteroid. **J Orthop Sci**, v. 15, n. 1, p. 51–6, 2010.
110. SMITH, M. M.; GHOSH, P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. **Rheumatol Int**, v. 7, n. 3, p. 113-22, 1987
111. SPEARS, R.; DEES, L. A.; SAPOZHNIKOV, M.; BELLINGER, L. L.; HUTCHINS, B. Temporal Changes in Inflammatory Mediator Concentrations in an Adjuvant Model of Temporomandibular Joint Inflammation. **J Orofac Pain**, v. 19, n. 1, p.34-40, 2005.
112. SRINIVAS, R.; SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; NIEMI, E.; RAUSTIA, A.; PERNU, H. et al. Matrix metalloproteinases in mild and severe temporomandibular joint internal derangement synovial fluid. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n. 5, p. 517-25, 2001.
113. TANAKA, E.; DETAMORE, M.S.; MERCURI, L. G. Degenerative Disorders of the Temporomandibular Joint: Etiology, Diagnosis, and Treatment. **J Dent Res**, v. 87, n. 4, p. 296-307, 2008.
114. TANG, T.; MUNETA, T.; JU, Y.; NIMURA, A. et al. Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 13-21, 2008.
115. TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; IKEDA, M.; NASU, M.; KADOI, J.; SHIMA, Y. et al. Temporomandibular Joint Inflammation Potentiates the Excitability of Trigeminal Root Ganglion Neurons Innervating the Facial Skin in Rats. **J Neurophysiol**, v. 93, n. 5, p.:2723-38, 2005.

116. TEEPLE, E.; ELSAID, K. A.; JAY, G. D. ZHANG, L.; BADGER, G. J.; AKELMAN, M. et al. The Effects of Supplemental Intra-Articular Lubricin and Hyaluronic Acid on the Progression of Post-Traumatic Arthritis in the Anterior Cruciate Ligament Deficient Rat Knee. **Am J Sports Med**, v. 39, n.1, p. 164–72, 2011.
117. THILANDER, B.; RUBIO, G.; PENA, L.; MAYORGA, C. Prevalence of Temporomandibular Dysfunction and Its Association With Malocclusion in Children and Adolescents: An Epidemiologic Study Related to Specified Stages of Dental Development. **Angle Orthod**, v.72, n. 2, p. 146–54, 2002.
118. VERNAL, R.; VELÁSQUEZ, E.; GAMONAL, J.; GARCIA-SANZ, J. A. et al. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 10, p. 910-5, 2008.
119. VIDAL, B. C. Form birefringence as applied to biopolymer and inorganic material supraorganization. **Biotech & histochem**, v. 85, n. 6, p. 365–78, 2010.
120. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.; PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. **Histochem j**, v.14, n. 6, p.857-78, 1982.
121. WINOCUR, E.; LITTNERUSB, D.; ADAMSUSB, I.; GAVISH, A. Oral habits and their association with signs and symptoms of temporomandibular disorders in adolescents: a gender comparison. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.102, n. 4, p. 482-7, 2006.
122. WANG, C. T.; LIN, Y. T.; CHIANG, B. L.; LIN, Y. H.; HOU, S. M. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. **Osteoarthr Cartil**, v. 14, n. 12, p. 1237-47, 2006.
123. WANG, X. D.; KOU, X. X.; MAO, J. J.; GAN, Y. H.; ZHOU, Y. H. Sustained Inflammation Induces Degeneration of the Temporomandibular Joint. **J Dent Res**, v. 91, n. 5, p. 499-505, 2012.

124. WILLARD, V. P.; KALPAKCI, K. N.; REIMER, A. J.; ATHANASIOU, K. A. The Regional Contribution of Glycosaminoglycans to Temporomandibular Joint Disc Compressive Propertiesa. **Biomech Eng**, v. 134, n. 1, p. 1-17, 2012.
125. YAMAZAKI, Y.; REN, K.; SHIMADA, M.; IWATA, K. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats. **Exp Neurol**. v. 214, n. 2, p. 209-18, 2008.
126. YEUNG, R. W. K.; CHOW, R. L. K.; SAMMAN, N.; CHIU, K. Short-term therapeutic outcome of intra-articular high molecular weight hyaluronic acid injection for nonreducing disc displacement of the temporomandibular joint. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 4, p. 453-61, 2006.
127. YOSHIDA, K.; TAKATSUKA, S.; HATADA, E.; NAKAMURA, H.; TANAKA, A.; UEKI, K. et al. Expression of matrix metalloproteinases and aggrecanase in the synovial fluids of patients with symptomatic temporomandibular disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 1, p. 22-7, 2006.
128. 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.35-8, 2005.
129. ZHOU, Q. Q.; IMBE, H.; DUBNER, R.; REN, K. Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. **J Comp Neurol**, v. 412, n. 2, p. 276–91, 1999.

ANEXO

Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "**Influência da terapia com laser de baixa potência e hialuronato de sódio de alto peso molecular na ATM de ratos, com artrite, após indução por CFA**":

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

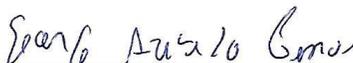
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 3020-1, Instituição:
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno:


Orientadora:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais/CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura