



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GEORGE AZEVÊDO LEMOS

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER  
DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR E MÚSCULOS DA MASTIGAÇÃO  
EM RATOS COM ARTRITE INDUZIDA

CAMPINAS

(2018)

**GEORGE AZEVÊDO LEMOS**

**"INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR E MÚSCULOS DA MASTIGAÇÃO EM RATOS COM ARTRITE INDUZIDA**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO GEORGE AZEVÊDO LEMOS E ORIENTADA PELA PROFA DRA EVANISI TERESA PALOMARI.

*Orientador: EVANISI TERESA PALOMARI*

*Co-Orientador: ANDRÉ ULISSES DANTAS BATISTA*

**CAMPINAS**

**(2018)**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

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

L544i Lemos, George Azevêdo, 1988-  
Influência de diferentes protocolos de laser de baixa potência sobre a articulação temporomandibular e músculos da mastigação em ratos com artrite induzida / George Azevêdo Lemos. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Evanisi Teresa Palomari.  
Coorientador: André Ulisses Dantas Batista.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Transtornos da articulação temporomandibular. 2. Lasers. 3. Músculos mastigatórios. I. Palomari, Evanisi Teresa, 1960-. II. Batista, André Ulisses Dantas. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Influence of different low-level laser protocols on temporomandibular joint and masticatory muscles in rat with induced arthritis

**Palavras-chave em inglês:**

Temporomandibular joint disorders

Lasers

Masticatory muscles

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Evanisi Teresa Palomari [Orientador]

Horacio Faig Leite

Estrela Maria Correia Sant Ana

André Luís Bombeiro

Sarah Arana

**Data de defesa:** 28-02-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 28/02/2018

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Prof. Dr. Horácio Faig Leite

Profa. Dra. Estela Maria Correia Sant'Ana

Prof. Dr. André Luis Bombeiro

Profa. Dra. Sarah Arana

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## DEDICATÓRIA

A todos os animais de laboratório que, através do seu sacrifício, contribuem imensamente para o desenvolvimento da ciência...

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

(Mark Twain)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meu caminho nesta jornada e me conceder paciência e força para alcançar este sonho.

Aos meus pais, Jorge Lemos e Antônia Azevedo Lemos, pelo apoio e dedicação. Mesmo em sua simplicidade de agricultores nordestinos aposentados, souberam me proporcionar sabedoria e coragem para enfrentar todas as adversidades.

À minha esposa, Pâmela Lopes, pela confiança, amor e companheirismo, e por participar diretamente em todas as etapas desse trabalho. Obrigado pelas palavras de conforto e racionalidade. Sigamos lutando sempre unidos na realização de nossos sonhos.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Renato Rissi, Lucas de Souza e Catharina Nucci, pelos ensinamentos e apoio nesta jornada.

Ao professor Edson Rosa Pimentel pelos valiosos ensinamentos e confiança depositada, ao abrir o seu laboratório e permitir a realização de muitas técnicas apresentadas nesta tese.

Aos professores Edson Rosa Pimentel, Eneida de Paula e Flávia Da Ré Guerra, pelas relevantes contribuições no exame de qualificação

Ao funcionário Francisco Ângelo Mallatesta pelos grandes ensinamentos e importante ajuda nas técnicas moleculares.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, especialmente Walter Ferreira, Paulo Francisco dos Santos, Marco Aurélio Ribeiro de Paula e Norivaldo Celestino, pela amizade e acolhimento.

Ao Centro de Biotecnologia (Cbiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pelo fornecimento dos animais de laboratório e estrutura para realização da parte de experimentação animal.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela formação, logística a apoio na realização deste sonho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

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

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha Orientadora Professora Evanisi Teresa Palomari pela confiança depositada, amizade e competência para solucionar minhas dúvidas e inquietações. Muito obrigado por compartilhar sua experiência e conhecimento, permitindo meu crescimento profissional e humano...

Ao meu Co-orientador professor André Ulisses Dantas Batista, pela amizade, paciência e conhecimento compartilhado. Obrigado pela confiança depositada e pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

(Cora Coralina)



## RESUMO

Objetivou-se investigar as mudanças morfológicas, bioquímicas e funcionais, em modelo experimental de artrite na articulação temporomandibular (ATM), bem como os efeitos anti-inflamatórios do laser de baixa potência (LBP), em diferentes dosagens. Utilizou-se 100 ratos, *Wistar*, machos, divididos nos grupos: GS - controle saudável (n=20); GA - animais com artrite na ATM esquerda induzida por injeção intra-articular de Adjuvante Completo de Freund - CFA (n=20); GL5 - animais com artrite e tratados com LBP na dose de 5 J/cm<sup>2</sup> (n=20); GL10 - animais com artrite e tratados com LBP na dose de 10 J/cm<sup>2</sup> (n=20) e GL20 - animais com artrite e tratados com LBP na dose de 20 J/cm<sup>2</sup> (n=20). As ATMs direitas, no GA, foram utilizadas como grupo contralateral não-inflamado (GD). No disco articular foram realizadas análises morfológicas e histomorfométricas em cortes corados com HE, AT e Picrosirius. Nos músculos da mastigação, foram feitas análises histomorfométricas em cortes corados com HE. Para análises bioquímicas do disco articular foram realizadas dosagem de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), zimografia das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, e concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Foram observadas no GA, comparativamente ao GS, alterações, tais como: hiperplasia da membrana sinovial; infiltrado inflamatório crônico; desorganização das fibras colágenas no disco; redução de proteoglicanos na cartilagem; maior espessura do disco e menor espessura da cartilagem; menor consumo de ração; maior atividade das isoformas da MMP-9 e 2 e maior concentração de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Enquanto o GC, também comparativamente ao GS, apresentou: espessamento do disco (região posterior); redução de proteoglicanos na cartilagem articular; menor organização das fibras colágenas do disco; MMP-9 ativa e maior concentração de IL-6 e TNF- $\alpha$ . O músculo masseter esquerdo, nos animais com artrite, exibiu maior área e diâmetro das fibras comparado ao músculo contralateral e aos músculos de animais saudáveis. A inflamação articular reduziu área e diâmetro das fibras dos músculos temporal (direito), pterigóideo medial (esquerdo) e lateral (direito e esquerdo), comparados ao GC. Todas as doses de LBP promoveram melhor organização das fibras colágenas no disco articular, maior quantidade de proteoglicanos na cartilagem articular, redução da atividade das isoformas latente e ativa das MMPs 9 e 2 e menor concentração de IL-1 $\beta$  comparado ao GA. A dose de 20 J/cm<sup>2</sup> promoveu redução da espessura do disco na região média e maior consumo de ração, comparativamente ao GA. A dose de 5 J/cm<sup>2</sup> reduziu a atividade da MMP-2 intermediária e a concentração de TNF- $\alpha$ , comparado ao GA. Todas as doses de LBP promoveram aumento da área e diâmetro das fibras do pterigóideo lateral esquerdo em comparação ao mesmo músculo de animais com artrite. Concluiu-se que a ATM contralateral à articulação com artrite induzida exibiu alterações morfológicas e moleculares. A artrite induzida determinou alterações morfológicas nas fibras musculares e menor consumo de ração. Todas as doses de LBP demonstraram significativos efeitos anti-inflamatórios e foram eficazes na proteção das estruturas articulares e musculares. Por apresentar maior eficiência e melhorar significativamente uma quantidade expressiva de parâmetros aplicados, a dose de 20 J/cm<sup>2</sup>, demonstrou ser eficiente.

**Palavras-chave:** Transtornos da Articulação Temporomandibular; Lasers; Músculos mastigatórios.

## ABSTRACT

The objective was to investigate the morphological, biochemical and functional changes in experimental model of temporomandibular joint (TMJ) arthritis, as well as anti-inflammatory effects of low-level laser (LLL) at different dosages. In this study, 100 male Wistar rats were divided into the following groups: GS: healthy control (n = 20); GA: animals with arthritis in the left TMJ induced by intra-articular injection of Freund's Complete Adjuvant - CFA (n = 20); GL5: animals with arthritis treated with LLL at the dose of 5 J/cm<sup>2</sup> (n = 20); GL10: animals with arthritis treated with LLL at the dose of 10 J/cm<sup>2</sup> (n = 20) and GL 20: animals with arthritis and treated with LLL at the dose of 20 J/cm<sup>2</sup> (n = 20). Right TMs, in GA, were used as non-inflamed contralateral group (GD). In articular disc morphological and histomorphometric analyzes were performed from sections stained with HE, AT and picosirius. Histomorphometric analyzes were performed on masticatory muscles (HE staining). The biochemical analyzes of the disc consisted of the dosage of sulfated glycosaminoglycans (GAGs), zymography of metalloproteinases (MMPs) 2 and 9, and concentration of the proinflammatory cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In GA, compared to GS, changes were observed, such as: synovial membrane hyperplasia; chronic inflammatory infiltrate; disorganization of collagen fibers on the disc; reduction of proteoglycans in cartilage; greater disc thickness and lower cartilage thickness; lower feed intake; higher activity of MMP-9 and 2 isoforms and higher concentration of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . While the GD, comparatively to GS, presented: greater thickness of disc (posterior region); reduction of proteoglycans in cartilage; lower organization of collagen fibers of the disc; active MMP-9 and higher concentration of IL-6 and TNF- $\alpha$ . The left masseter muscle in animals with arthritis exhibited larger area and diameter of fibers compared to contralateral muscle and muscles of healthy animals. Joint inflammation reduced the area and diameter of the fibers of temporal (right), medial pterygoid (left) and lateral pterygoid (left and right) muscles, compared to GC. All doses of LLL promoted better organization of collagen fibers in disc, greater amount of proteoglycans in cartilage, reduction of the activity of latent and active isoforms of MMPs 9 and 2, and lower concentration of IL-1 $\beta$  compared to GA. Dose of 20 J/cm<sup>2</sup> promoted reduction of disc thickness in middle region and higher feed intake compared to GA. The dose of 5 J/cm<sup>2</sup> reduced the activity of the intermediate MMP-2 and the concentration of TNF- $\alpha$ , compared to GA. All LLL doses promoted increased area and diameter of fibers of left lateral pterygoid muscle compared to same muscle of animals with arthritis. It was concluded that TMJ contralateral to articulation with induced arthritis exhibited morphological and molecular alterations. Induced arthritis resulted in morphological changes in muscle fibers and lower food intake. All doses of LLL demonstrated significant anti-inflammatory effects and were effective in protecting the joint and muscle structures. Due to the higher efficiency and significantly improved the amount of parameters applied, the dose of 20 J/cm<sup>2</sup> was shown to be efficient.

**Keywords:** Temporomandibular Joint Disorders; Lasers; Masticatory Muscles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Articulação temporomandibular - ATM.....	24
Figura 2: Músculos mastigatórios.....	27
Figura 3: Esquema da distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	41
Figura 4: Injeção intra-articular de CFA na ATM esquerda. ....	42
Figura 5: Imobilização do animal e aplicação do LBP sobre a região da ATM.....	43
Figura 6: Cronograma de aplicação do LBP .....	44
Figura 7: Fotomicrografia da ATM mostrando os locais de mensuração da espessura do disco e cartilagem articular.....	46
Figura 8: Localização dos cortes histológicos nos músculos mastigatórios.....	48
Figura 9: Imagens histológicas da ATM. Coloração com HE. Capítulo 1.....	55
Figura 10: Morfometria das regiões anterior, média e posterior do disco articular (espessura em $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 1.....	56
Figura 11: Morfometria da cartilagem (espessura em $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos experimentais. Média total da espessura. Capítulo 1.....	56
Figura 12: Imagens histológicas da ATM. Coloração em Picrosirius. Capítulo 1 .....	57
Figura 13: Imagens histológicas da ATM. Coloração com Azul de toluidina (AT). Capítulo 1. ....	58
Figura 14: Concentração de GAGs (mg/g de tecido seco) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 1.....	58
Figura 15: Quantidade de ração consumida (g) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 1. ....	61
Figura 16: Zimografia das metaloproteinases nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 1 .....	61
Figura 17:Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondente às isoformas da MMP-9 (Ativa e Latente) e MMP-2 (Latente, Intermediária e Ativa) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 1.	62
Figura 18: Concentração de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ (pg/ $\mu\text{g}$ de proteínas totais) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 1.....	63
Figura 19: Imagens histológicas da ATM. Coloração com HE. Capítulo 2.....	66

Figura 20: Morfometria das regiões anterior, média e posterior do disco articular (espessura em $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 2.....	66
Figura 21: Morfometria da cartilagem (espessura em $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos experimentais. Média total da espessura. Capítulo 2.....	67
Figura 22: Imagens histológicas da ATM. Coloração em Picrosirius. Capítulo 2.....	68
Figura 23: Imagens histológicas da ATM. Coloração com Azul de toluidina (AT). Capítulo 2.....	69
Figura 24: Concentração de GAGs (mg/g de tecido seco) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 2.....	70
Figura 25: Área das fibras ( $\mu\text{m}^2$ ) dos músculos masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral. Capítulo 2.....	71
Figura 26: Diâmetro das fibras ( $\mu\text{m}$ ) dos músculos masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral. Capítulo 2.....	72
Figura 27: Quantidade de ração consumida (g) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 2.....	73
Figura 28: Zimografia das metaloproteinases nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 2.....	74
Figura 29: Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondente às isoformas da MMP-9 (Ativa e Latente) e MMP-2 (Latente, Intermediária e Ativa) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 2.....	75
Figura 30: Concentração de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ (pg/ $\mu\text{g}$ de proteínas totais) nos diferentes grupos experimentais. Capítulo 2.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Área ( $\mu\text{m}^2$ ) e diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) das fibras dos músculos masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral.....	60
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOP – American Academy of Orofacial Pain

AR – Artrite Reumatóide

ARJ – Artrite Reumatóide Juvenil

AT – Azul de Toluidina

ATM – Articulação Temporomandibular

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – Soro de Albumina Bovina

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio

Cbiotec – Centro de Biotecnologia UFPB

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Adjuvante Completo de Freund

CGRP – Calcitonin Gene-Related Peptid (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina)

CINC-1 – Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant 1 (Quimioatraente-1 de Neutrófilos Indutor de Citocina, Homóloga da IL-8)

COX-2 – Ciclooxygenase-2

DMMB – Azul de Dimetilmetileno

DTM – Disfunção Temporomandibular

EDTA-Na<sub>2</sub> – Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate

EGTA - Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

ELISA – Enzime-Linked Immunosorbent Assay

GaAIs – Arseneto de Gálio e Alumínio

GAGs – Glicosaminoglicanos Sulfatados

GA – Grupo de Animais com Artrite

GD – Grupo Contralateral Não-Inflamado

GL5 – Grupo de Animais com Artrite e Tratados com LPB na dose de 5 J/cm<sup>2</sup>

GL10 – Grupo de Animais com Artrite e Tratados com LPB na dose de 10 J/cm<sup>2</sup>

GL20 – Grupo de Animais com Artrite e Tratados com LPB na dose de 20 J/cm<sup>2</sup>

GS – Grupo de Animais Controle Saudáveis

HE – Hematoxilina-Eosina

IFN- $\gamma$  – Interferon-gama

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$

IL-6 – Interleucina 6

IL-12 – Interleucina 12

IL-17 – Interleucina 17

iNOS – Inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico Sintase Indutível)

LBP – Laser de Baixa Potência

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metaloproteinase de matriz (MMP 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 13 e 18)

NaCl – Cloreto de Sódio

NF- $\kappa$ B – Nuclear Factor kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells (Fator Nuclear kappa B)

NGF – Nerve Growth Factor (Fator de Crescimento Nervoso)

NP-40 - Tergitol-type NP-40

OA – Osteoartrite

OR – Retardo Óptico

PG – proteoglicano

PGE2 – Prostaglandina E2

pH – Potencial Hidrogeniônico

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\beta$

Tris-HCl – 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride

Triton X-100 – (1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

ZnCl<sub>2</sub> – Cloreto de Zinco



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
2.1	<i>Articulação temporomandibular: anatomia e histologia .....</i>	22
2.2	<i>Músculos da mastigação.....</i>	26
2.3	<i>Disfunção temporomandibular .....</i>	28
2.4	<i>Modelo experimental de inflamação da ATM – adjuvante Completo de Freund (CFA).....</i>	33
2.5	<i>Laser de baixa potência (LBP).....</i>	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	<i>Objetivo Geral .....</i>	39
3.2	<i>Objetivos Específicos.....</i>	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1	<i>Cálculo amostral.....</i>	40
4.2	<i>Animais da Pesquisa.....</i>	40
4.3	<i>Grupos Experimentais .....</i>	40
4.4	<i>Indução de Artrite na ATM.....</i>	42
4.5	<i>Terapia com LBP.....</i>	43
4.6	<i>Eutanásia dos Animais e Coleta dos Tecidos .....</i>	44
4.7	<i>Análise Morfológica .....</i>	44
4.7.1	<i>Articulação Temporomandibular .....</i>	44
4.7.1.1	<i>Coloração com Hematoxilina-eosina (HE) e Análises Histomorfométricas ..</i>	45
4.7.1.2	<i>Coloração com Azul de Toluidina (AT).....</i>	46
4.7.1.3	<i>Coloração com Picrosirius e Birrefringência das Fibras Colágenas.....</i>	46
4.7.2	<i>Músculos Mastigatórios .....</i>	48
4.7.2.1	<i>Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) e Análises Histomorfométricas..</i>	49
4.8	<i>Avaliação da quantidade de ração ingerida.....</i>	49

4.9	<i>Análise Bioquímica e Molecular</i> .....	49
4.9.1	Quantificação de Glicosaminoglicanos Sulfatados (GAGs) da Matriz Extracelular... ..	50
4.9.2	Zimografia.....	50
4.9.3	Concentração de citocinas pró-inflamatórias .....	51
4.10	<i>Análise Estatística</i> .....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
5.1	<i>Capítulo 1 - Modelo Experimental de Artrite da Articulação Temporomandibular: Efeitos sobre a Articulação Contralateral e Músculos Mastigatórios</i> .....	54
5.1.1	Análise Morfológica e Histomorfométrica .....	54
5.1.2	Coloração com Picrosirius -Organização e Compactação das Fibras Colágenas ...	56
5.1.3	Coloração com Azul de Toluidina (AT) e Dosagem de Glicosaminoglicanos Sulfatados (GAGs) .....	57
5.1.4	Morfometria dos músculos mastigatórios .....	59
5.1.5	Consumo de Ração.....	60
5.1.6	Atividade das Metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9).....	61
5.1.7	Concentração de Citocinas Pró-inflamatórias .....	62
5.2	<i>Capítulo 2 - Atividade Fotobioestimuladora de Dosagens Diferenciadas de LBP sobre a Artrite Induzida na ATM e Músculos Mastigatórios</i> .....	64
5.2.1	Análise Morfológica e Histomorfométrica .....	64
5.2.2	Coloração com Picrosirius -Organização e Compactação das Fibras Colágenas ..	67
5.2.3	Coloração com Azul de Toluidina (AT) e Dosagem de Glicosaminoglicanos Sulfatados (GAGs) .....	68
5.2.4	Morfometria dos músculos mastigatórios .....	70
5.2.5	Consumo de Ração.....	73
5.2.6	Atividade das Metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9).....	74
5.2.7	Concentração de Citocinas Pró-inflamatórias .....	75
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
6.1	<i>Capítulo 1: Modelo Experimental de Artrite da Articulação Temporomandibular: Efeitos sobre a Articulação Contralateral e Músculos Mastigatórios</i> .....	78
6.1.1	Morfologia e morfometria da ATM .....	78

6.1.2	Morfometria das fibras musculares .....	80
6.1.3	Consumo de ração .....	82
6.1.4	Avaliação Bioquímica e Molecular dos Tecidos da ATM .....	82
6.2	<i>Capítulo 2: Atividade Fotobioestimuladora a de Dosagens Diferenciadas de LBP sobre a Artrite Induzida na ATM e Músculos Mastigatórios</i> .....	85
6.2.1	Morfologia da ATM .....	85
6.2.2	Morfometria das fibras musculares .....	87
6.2.3	Consumo de ração .....	87
6.2.4	Avaliação Bioquímica e Molecular dos Tecidos da ATM .....	88
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>107</b>
9.1	<i>Certidão do comitê de ética no uso de animais CEUA/Unicamp</i> .....	107
9.2	<i>Declaração de Direitos Autorias</i> .....	108

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A inflamação articular é a principal causa de dor na articulação temporomandibular – ATM (YAMAZAKI et al., 2008; KRAMER et al 2010; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014) e seus principais fatores etiológicos são trauma direto ou indireto, irritação e infecção, podendo estar associada a outros distúrbios da ATM, como os desarranjos do complexo côndilo-disco (DE LEEUW, 2010). O processo inflamatório pode localizar-se na membrana sinovial (sinovite), cápsula articular (capsulite), tecidos retrodiscais (retrodiscite), estar associado à poliartrites sistêmicas (artrite reumatoide e artrite reumatoide juvenil) ou a processos degenerativos (osteoartrite) (OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008; DE LEEUW, 2010; LEMOS, 2015).

O desenvolvimento e aprimoramento dos modelos experimentais de inflamação articular são fundamentais para melhor compreensão de seus mecanismos moleculares e repercussões morfológicas. Nesta tese buscamos investigar o envolvimento da ATM contralateral em uma inflamação induzida na ATM esquerda através de injeção intra-articular de adjuvante Completo de Freund – CFA (SPEARS et al., 2005; KUROKI et al., 2011; WANG et al., 2012; GEORGE et al., 2013; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). Além disso, até este momento, não temos conhecimento de outras pesquisas relacionadas ao envolvimento dos músculos mastigatórios, após indução de inflamação articular. Estes músculos precisam ser avaliados, pois a presença de distúrbios articulares pode repercutir em sua morfofisiologia, o que os torna importantes parâmetros funcionais da inflamação induzida e dos possíveis tratamentos testados.

A Academia Americana de Dor Orofacial (AAOP) preconiza a adoção de métodos conservadores para tratamento dos distúrbios da ATM, em detrimento a terapias mais agressivas e irreversíveis, tais como a cirurgia e o ajuste oclusal (LEEUW, 2010). Neste sentido, o laser de baixa potência (LBP) pode ser uma importante opção em virtude de seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (PALLOTTA et al., 2012; ALVES et al., 2014; CARLOS et al., 2014; LEMOS et al., 2016), sendo ainda uma técnica de fácil aplicação e não invasiva (ÇETINER; KAHRAMAN; YÜCETAS, 2006).

No entanto, a literatura evidencia uma elevada heterogeneidade em relação aos parâmetros adotados de LBP como dose, frequência e duração das radiações (BJORDAL et al., 2003; MAIA et al 2012; CHEN et al., 2015), dificultando as comparações entre os diferentes estudos.

É necessária, portanto, a realização de outras pesquisas experimentais, sob o ponto de vista da biologia celular e molecular, a fim de melhor compreender os efeitos biológicos do LBP e determinação dos parâmetros ópticos ideais para o tratamento dos distúrbios inflamatórios na ATM, tais como dose, energia, comprimento de onda e número de sessões. A definição destes parâmetros é fundamental para o estabelecimento de um plano de tratamento realista e sem riscos aos pacientes, como ausência de efeitos significativos, danos relacionados a luz refletida, estímulo ao crescimento celular de lesões malignas etc.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Articulação temporomandibular: anatomia e histologia

A ATM é uma articulação sinovial bicondiliana, biaxial e complexa que permite amplos movimentos da mandíbula (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Funcionalmente as duas articulações são interligadas pela mandíbula e interdependentes, com movimentos próprios de cada lado, porém simultâneos, o que as caracteriza como uma única articulação bilateral (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

As partes ósseas da ATM incluem estruturas da mandíbula (côndilos mandibulares) e do osso temporal (eminência articular e fossa mandibular) (MADEIRA, 2008). O côndilo é uma saliência ovóide e convexa, no sentido anteroposterior e mediolateral, apresenta uma superfície posterior, rugosa e uma superfície ântero-superior, lisa (superfície articular) (OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Na superfície anterior, observa-se um plano inclinado, que em articulações saudáveis é paralelo ao plano inclinado, formado pela fossa mandibular e eminência articular do temporal, guiando o deslocamento anterior do côndilo no movimento de translação (OLIVEIRA, 2008).

A eminência articular é um relevo transversal elevado, seu limite anterior é indistinto e sua vertente posterior inclina-se em direção a fossa mandibular (MADEIRA, 2008). Apenas a vertente posterior e o ápice fazem parte da superfície articular da ATM (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Já a fossa mandibular é uma depressão óssea posterior à eminência articular, de forma elipsóide que aloja o côndilo mandibular na posição de repouso ou durante movimentos cêntricos da mandíbula (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). A fissura tímpano-escamosa divide a fossa mandibular em duas partes: uma posterior, denominada de placa timpânica, e outra anterior ou fossa mandibular, propriamente dita (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

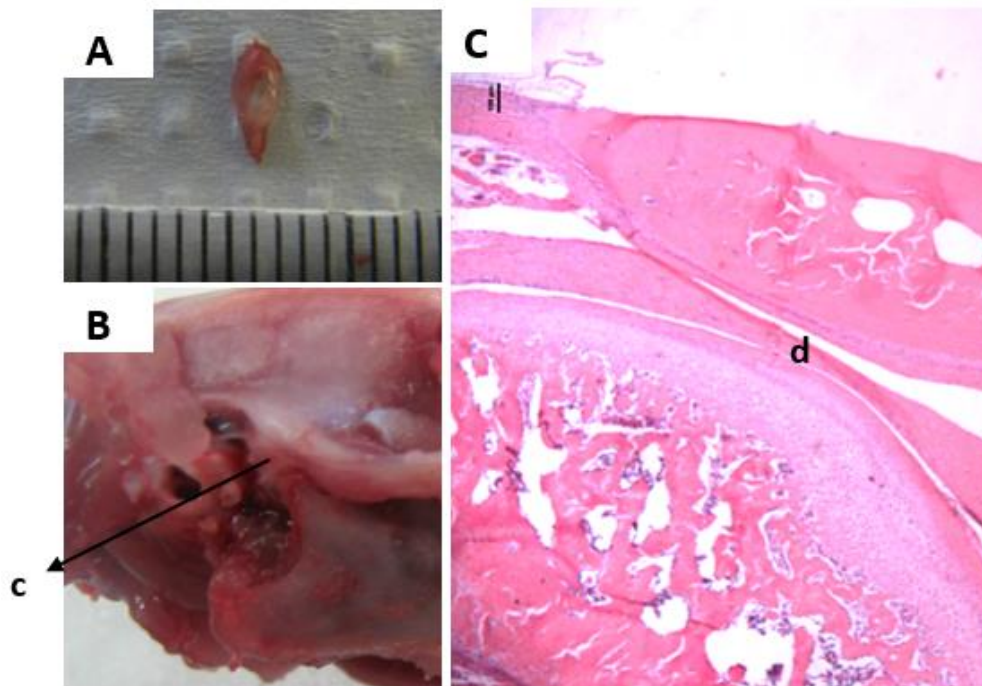
Diferentemente das demais articulações sinoviais, as superfícies articulares das ATMs são revestidas por uma fibrocartilagem articular, constituída por tecido fibroso predominante avascular, contendo condrócitos (OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010). A cartilagem é particularmente mais espessa na vertente anterior do côndilo da mandíbula e na vertente posterior da eminência articular (OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010). Este revestimento tecidual

está organizado em quatro camadas distintas, assim enumeradas da mais profunda para a mais superficial (OLIVEIRA, 2008):

- a) camada calcificada, com atividade remodeladora sobre o osso subcondral;
- b) camada de fibrocartilagem, com fibras colágenas, principalmente do tipo I, distribuídas radialmente em relação às superfícies ósseas, o que oferece resistência a forças compressivas;
- c) camada celular ou proliferativa, responsável pela formação de condrócitos em respostas as exigências funcionais;
- d) camada fibrosa, constituída por fibras colágenas do tipo I paralelas à superfície articular.

Esta organização da cartilagem articular da ATM permite um maior deslizamento das superfícies articulares, oferece elevada resistência à tração e compressão, além de apresentar maior capacidade de reparo em comparação à cartilagem hialina (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995; OLIVEIRA, 2008; DE LEEUW, 2010).

Um disco de fibrocartilagem interpõe-se entre o côndilo e a fossa mandibular/eminência articular do osso temporal, dividindo a cavidade articular em um compartimento superior ou supradiscal, e outro inferior ou infradiscal (GARDNER; GRAY; O'RAHILLY, 1975; GRAY; GOSS, 1988; MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Se considerarmos uma vista frontal da ATM (Figura 1), observamos que o disco articular da ATM, exibe maior espessura em sua parte medial, refletindo a maior concentração de cargas nesta região (GRAY; GOSS, 1988; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Já em uma visão lateral, observa-se que a face superior do disco articular é côncava anteriormente, adaptando-se a eminência articular, e convexa posteriormente, para se adaptar a concavidade da fossa mandibular. Por outro lado, a superfície inferior é totalmente côncava, adaptando-se a convexidade do côndilo mandibular (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).



**Figura 1: Articulação temporomandibular - ATM.** A: Vista superior do disco articular. B: Vista lateral da ATM, mostrando a cápsula articular (c). C: Fotomicrografia de corte sagital da ATM, mostrando o disco articular (c). Coloração HE; Objetiva de 4X. (Barra de Escala = 100  $\mu\text{m}$ ).

Em um corte sagital (Figura 1), pode-se observar que o disco articular apresenta uma parte central mais delgada, isenta de vasos sanguíneos e nervos, localizada entre duas partes mais espessas, vascularizadas e inervadas, uma anterior e outra posterior (OLIVEIRA, 2008; PORTO et al. 2010). A parte anterior é delgada e fixa-se à cápsula articular por meio de dois feixes de fibras colágenas, um superior que se mistura com as inserções temporais da cápsula, e um inferior que se mistura as inserções condilianas. Entre estes dois feixes, insere-se o tendão do feixe superior do músculo pterigóideo lateral (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Já a parte posterior é espessa e contínua com um tecido conjuntivo frouxo, vascularizado e inervado, denominado tecido retrodiscal (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010; PORTO et al. 2010). O tecido retrodiscal é limitado, superiormente, por uma lâmina tecidual rica em fibras elásticas que se prende ao osso temporal (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Esta lâmina exerce uma força de tração que permite o retorno do disco à sua posição de origem durante o movimento de retrusão (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). O limite



inferior do tecido retrodiscal é constituído por uma lâmina rica em fibras colágenas que se prende na borda posterior do côndilo mandibular (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

Ligamentos colaterais prendem o disco articular aos polos medial e lateral do côndilo mandibular, permitindo a translação do complexo côndilo-disco até o ápice da eminência articular durante a abertura máxima (OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; DE LEEUW, 2010). Além dessa característica, também permitem a rotação do côndilo no compartimento mandibulodiscal durante a abertura bucal inicial (DE LEEUW, 2010).

Histologicamente, o disco articular é constituído por uma fibrocartilagem, no qual 30% do peso úmido, é representado por fibras colágenas, principalmente do tipo I (DETAMORE et al., 2005; KALPAKCI et al.2011). As fibras colágenas estão dispostas de forma concêntrica na periferia do disco; em sentido anteroposterior na parte central; e em sentido mediolateral nas partes anterior e posterior (DETAMORE et al., 2005). Já os glicosaminoglicanos sulfatados correspondem a cerca de 0,6 a 10% do peso seco do disco articular, são mais concentrados na região central e relacionam-se as propriedades compressivas (DETAMORE et al., 2005; KALPAKCI et al.2011). As células são escassas e consistem na maioria de fibroblastos e condrócitos, localizadas principalmente na parte medial do disco (DETAMORE et al., 2005; OLIVEIRA, 2008; KALPAKCI et al.2011).

A ATM é envolvida por uma cápsula fibrosa, bastante frouxa, de modo a permitir amplos movimentos mandibulares (MADEIRA, 2008). A cápsula articular é formada por feixes fibrosos verticais que se inserem superiormente na periferia da superfície articular do temporal e, inferiormente, nas bordas da superfície articular do côndilo mandibular, exceto em sua região posterior, onde observa-se uma inserção mais baixa, no colo mandibular (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). São encontrados também feixes de fibras profundas que se inserem na periferia do disco articular (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

A cápsula articular é bastante vascularizada e inervada, incluindo fibras proprioceptivas relacionadas aos nervos auriculotemporal, massetérico e temporal profundo posterior (MADEIRA, 2008). É, também, reforçada lateralmente por um tecido fibroso denominado ligamento temporomandibular (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Este apresenta fibras colágenas em duas direções: uma superficial ou oblíqua, que se estende da eminência articular e processo zigomático até o colo do côndilo mandibular; e um profundo ou horizontal, que se entende da eminência articular ao pólo lateral e superfície posterior do côndilo (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). O ligamento

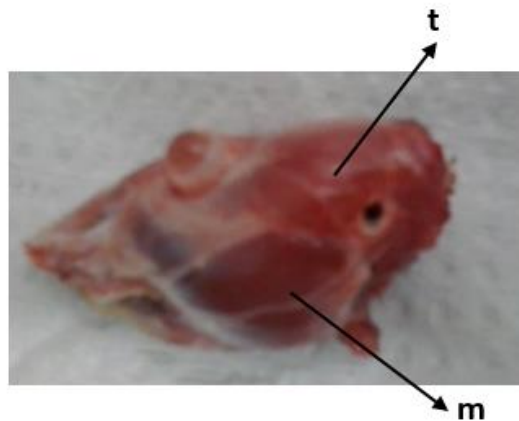
temporomandibular atua limitando a extensão de abertura e o movimento posterior do côndilo-disco (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

Uma membrana sinovial reveste internamente a cápsula articular, sendo formada por um tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado, revestido por células sinoviais especializadas na produção do líquido sinovial (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008, DE LEEUW, 2010). Este líquido, rico em ácido hialurônico, é responsável pela lubrificação da ATM, reduzindo a fricção durante os movimentos mandibulares; proteção biológica e; nutrição, principalmente, da parte central do disco articular que é avascular (OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

A ATM é reforçada ainda por ligamentos acessórios, que não estão ligados diretamente a articulação, mas podem limitar movimentos excessivos, incluindo os ligamentos esfenomandibular e estilomandibular (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010). A rafe pterigomandibular é considerada por Teixeira, Reher e Reher (2008) como sendo também um ligamento acessório da ATM.

## **2.2 Músculos da mastigação**

Os movimentos das ATMs são determinados pela ação dos músculos da mastigação, que são semelhantes aos demais músculos esqueléticos quanto à fisiologia e ergonomia (DE LEEUW, 2010). Os músculos da mastigação incluem o temporal, masseter, pterigóideo medial e pterigóideo lateral (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010). Os músculos supra e infra-hióideos, trabalhando em conjunto, auxiliam a abertura bucal, e os músculos posturais da cabeça e do pescoço dão suporte secundário durante a mastigação, estabilizando estas regiões (OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010).



**Figura 2: Músculos mastigatórios.** Vista lateral, evidenciando os músculos temporal (t) e masseter (m).

O temporal é um músculo em forma de leque (Figura 2), cujas fibras se prendem no assoalho da fossa temporal e face medial da fáscia temporal (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). As fibras convergem e passam pela abertura, em parte delimitada pelo arco zigomático, para se inserirem no processo coronóide da mandíbula (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

Morfologicamente o músculo temporal pode ser dividido em três regiões, de acordo com a direção de suas fibras (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008), definidas como porções:

- a) anterior, com fibras direcionadas, praticamente, no sentido vertical, que age como elevador da mandíbula;
- b) média, com fibras oblíquas, em direção a inserção terminal, que também age como elevador da mandíbula;
- c) posterior, com fibras em direção horizontal, e que possuem função retrusora.

O masseter (Figura 2) é um músculo retangular, espesso e forte, que age como um potente elevador da mandíbula (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Apresenta um feixe superficial, que se origina nos  $\frac{3}{4}$  anteriores da borda inferior do arco zigomático e, termina na face lateral e ângulo da mandíbula, colaborando no movimento de protrusão; e um feixe profundo, que se origina na face medial do  $\frac{1}{4}$  posterior da borda inferior do arco zigomático e, termina na face lateral da mandíbula, colaborando nos movimentos de retrusão da mandíbula (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

O músculo pterigóideo medial, com forma e função semelhante ao músculo masseter, origina-se na fossa pterigóidea e processo piramidal do osso palatino, e termina na face medial do ramo da mandíbula (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). É um sinergista do músculo masseter, executa elevação, ligeira protrusão e auxilia o pterigóideo lateral nos movimentos de lateralidade (mediotrusivo) (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008).

O pterigóideo lateral é um músculo curto, disposto horizontalmente, que se relaciona diretamente com a ATM (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Apresenta dois feixes musculares, considerados por alguns autores como músculos independentes (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008):

- a) feixe superior – origina-se na face infratemporal e crista infratemporal da asa maior do esfenoide e, insere-se na cápsula articular da ATM e borda anterior do disco articular. Atua controlando o movimento de retorno do disco articular durante o fechamento de boca, contrapondo-se a ação das fibras elásticas da lâmina retrodiscal superior.
- b) feixe inferior – origina-se da face lateral da lâmina lateral do processo pterigóideo e insere-se na fóvea pterigóidea, localizada no colo da mandíbula. Atua na protrusão mandibular;

A contração simultânea dos dois músculos pterigóideos laterais determina o movimento de protrusão, essencial para abertura máxima (MADEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008). Já a contração de apenas um dos músculos promove um movimento mediotrusivo da mandíbula, denominado de lateralidade (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010).

### **2.3 Disfunção temporomandibular**

Conforme destacado no tópico anterior (2.1), a organização anatômica e histológica da ATM confere a esta articulação, grande capacidade adaptativa e de reparo. Contudo, assim como outras articulações de suporte de carga, a ATM está sujeita a uma variedade de processos moleculares, potencialmente prejudiciais, que podem ser desencadeados por diversos fatores (hábitos parafuncionais, traumas, posturas do sono incorretas, etc) ou distúrbios sistêmicos, como a artrite reumatóide (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995; HIBI; UEDA, 2005; DE LEEUW, 2010).

Entre os distúrbios que acometem a ATM, as disfunções temporomandibulares (DTMs) são as mais comuns (TANAKA; DETAMORE; MERCURI, 2008). A AAOP define DTM como uma expressão coletiva para vários problemas clínicos que envolvem os músculos da mastigação, as ATMs e estruturas associadas (DE LEEUW, 2010).

Os principais sintomas relatados são: dor na região da ATM, dor muscular, otalgia, ruídos articulares, desvios mandibulares, limitação da abertura bucal, cansaço/fadiga muscular e 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).

De acordo com a AAOP cerca de 40 a 70% da população mundial adulta exhibe ao menos um sintoma DTM (DE LEEUW, 2010); além disso, estudos epidemiológicos transversais demonstram maior prevalência desta disfunção em adultos jovens, solteiros e do sexo feminino (BONJARDIM, et al. 2009a; GONÇALVES et al., 2010; LEMOS et al., 2015; MOURA et al., 2017; PAULINO et al., 2018).

As DTMs podem ser classificadas em duas categorias para fins de diagnóstico: desordens da ATM e desordens dos músculos mastigatórios (OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; DE LEEUW, 2010). Já as desordens da ATM, objeto de estudo desta tese, podem ser divididas, segundo os critérios da AAOP nas seguintes categorias:

- a) distúrbios congênitos do crescimento (aplasia, hipoplasia, hiperplasia, displasia e neoplasia dos ossos do crânio ou da mandíbula);
- b) desarranjos do disco articular (deslocamento de disco com redução e sem redução);
- c) deslocamentos da ATM (subluxação);
- d) anquilose;
- e) distúrbios inflamatórios (sinovite, capsulite, retrodiscite e poliartrite sistêmica);
- f) desordens degenerativas (osteoartrite e osteoartrose)

A inflamação dos tecidos articulares constitui a principal causa de dor na ATM (YAMAZAKI et al., 2008; KRAMER et al., 2010; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014), pode causar excitabilidade de neurônios do gânglio trigeminal, com indução de alodinia e hiperalgesia orofacial; aumento da atividade de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) no gânglio trigeminal; além de efeitos excitatórios centrais secundários, tais como dor referida e co-contração protetora (TAKEDA et al., 2005; OKESON, 2008; YAMAZAKI et al., 2008; KRAMER et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2013; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014).

Capsulite e sinovite são inflamações da cápsula articular e membrana sinovial, respectivamente (OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; DE LEEUW, 2010), causadas por trauma, irritação ou infecção (OLIVEIRA, 2008). Estas condições são caracterizadas pela presença de dor constante, exacerbada pela função e sobrecarga superior ou posterior da articulação (OKESON, 2008; DE LEEUW, 2010).

Por outro lado, retrodiscite é uma inflamação dos tecidos retrodisciais causada por compressão da região retrodiscal pelo cêndilo, decorrente de trauma externo ou deslocamento de disco, com ou sem redução (OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008).

A inflamação articular e alterações estruturais causadas por doenças reumáticas sistêmicas são denominadas poliartrites que incluem a artrite reumatoide (AR), artrite reumatoide juvenil (ARJ), espondiloartropatias, síndrome de Sjögren, dentre outras (DE LEEUW, 2010). Neste sentido, estudos prévios têm demonstrado que pacientes com AR, ARJ e síndrome de Sjögren exibem maior prevalência de sintomas na ATM tais como dor articular, limitação de movimentos e dor muscular em comparação a população geral (CORDEIRO et al., 2016; KERIŞ et al., 2016; DE SOUZA; BANSAL; GALLOWAY, 2016).

Particularmente, a AR é uma doença autoimune crônica e idiopática, caracterizada por inflamação crônica e hiperplasia da membrana sinovial (pannus), afetando múltiplas articulações (CORDEIRO, et al., 2016; KERIŞ et al., 2016; SOUZA; BANSAL; GALLOWAY, 2016). Entre outras características morfológicas desta condição, destaca-se a presença de anormalidades ósseas, tais como o aplainamento e erosão do cêndilo mandibular (KAMEOKA et al., 2009; DE LEEUW, 2010; KUROKI et al., 2011; CORDEIRO et al., 2016; KERIŞ et al., 2016; DE SOUZA; BANSAL; GALLOWAY, 2016; XU et al., 2016).

A AR afeta aproximadamente 1% da população mundial, possui etiologia multifatorial, em especial, com fatores hormonais, ambientais, imunológicos e sob influência de fatores genéticos (GOELDNER et al., 2011; CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PENA, 2016).

Entre as hipóteses que tentam explicar a fisiopatologia da AR, destaca-se o papel das reações de citrulinização de peptídeos (VOSSENAAR; VAN VENROOIJ, 2004; GOELDNER et al., 2011;). Esta reação consiste na substituição pós-traducional de resíduos de arginina em resíduos de citrulina, através da enzima peptidilarginina deiminase (PAD), expressa por alguns leucócitos (VOSSENAAR; VAN VENROOIJ, 2004). O organismo passa a produzir anticorpos para estes peptídeos citrulinados (Anti-CCP) e células apresentadoras de antígeno induzem a ativação de células T (VOSSENAAR; VAN VENROOIJ, 2004; GOELDNER et al., 2011;). Foi demonstrado que as células T produzem interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e outras citocinas, induzindo a ativação de células B e macrófagos (VOSSENAAR;

VAN VENROOIJ, 2004; GOELDNER et al., 2011; CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PENA, 2016). Já as células B produzem auto-anticorpos e citocinas pró-inflamatórias, tais como: fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 17 (IL-17) (GOELDNER et al., 2011).

As reações de citrulinização não são específicas da AR e podem ser observadas em várias condições inflamatórias intra-articulares, contudo são exacerbadas em pacientes com esta patologia (VOSSENAAR; VAN VENROOIJ, 2004). Além disso, tem sido descrito na literatura que fatores ambientais, como o fumo, podem aumentar estas reações (VOSSENAAR; VAN VENROOIJ, 2004; KLARESKOG et al., 2006).

A variável genética da AR tem sido atribuída aos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), denominados HLA (CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PENA, 2016). Neste caso, em indivíduos portadores dos genes HLA-SE as reações de citrulinização aumentam a ligação dos peptídeos modificados ao alelo HLA-DR, tornando a proteína mais imunorreativa (GOELDNER et al., 2011).

Várias citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios foram associados à patogênese da AR, com destaque para seu papel na ativação de enzimas proteolíticas e osteoclastos (DE SOUZA; BANSAL; GALLOWAY, 2016). Neste sentido, vários estudos em animais destacaram os seguintes mediadores inflamatórios, como marcadores importantes de inflamação articular: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, fator de crescimento nervoso (NGF) e óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; GHASSEMI-NEJAD et al., 2011; WANG et al., 2012; WANG et al., 2017).

Na AR, a TNF- $\alpha$  sintetizado por macrófagos estimulados por células T induzem a liberação de outras citocinas como IL-1, metaloproteinases e transformação de monócitos em osteoclastos. Por outro lado, a IL-1 estimula a síntese e ativação de IL-6, quimiocinas, prostaglandinas e colagenases (GOELDNER et al., 2011).

As ATMs são também comumente afetadas por alterações degenerativas – osteoartrite e osteoartrose (ABRAMSON, 2004; MERCURI, 2008). A osteoartrite (OA) é definida como uma condição artrítica de baixa inflamação (MERCURI, 2008; TANAKA; DETAMORE; MERCURI, 2008), caracterizada pela degeneração da cartilagem articular, perda de proteoglicanos, neovascularização, calcificação e perfuração do disco articular, além de erosão óssea (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995; MERCURI, 2008; TANAKA; DETAMORE; MERCURI, 2008; GHASSEMI-NEJAD et al., 2011). Já na osteoartrose são observadas alterações estruturais semelhantes, porém com ausência de inflamação (DWORKIN; LERESCHE, 1992; OKESON, 2008).

A perda progressiva de cartilagem articular na OA é decorrente do desequilíbrio entre os processos, predominantemente, reparadores, controlados pelos condrócitos e, os de degradação; os quais podem ser decorrentes de uma inadaptação do organismo ao progressivo aumento do uso e sobrecarga das articulações (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995; DE LEEUW, 2010).

Muitos estudos também demonstraram o significativo papel da inflamação articular na OA (BROOKS, 2003; ABRAMSON, 2004; MERCURI, 2008; VERNAL et al., 2008; GHASSEMI-NEJAD et al., 2011). De acordo com Oliveira (2008), a degeneração e degradação da cartilagem articular liberam componentes da matriz no fluido sinovial, que induz à inflamação. Estudo realizado por Abramson (2004), destacou a presença de quimiocinas, colagenases e estromelinas em áreas de sinovite associadas à OA, o que revelou um possível papel da inflamação na destruição progressiva da cartilagem articular.

Diferentes citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios têm sido associados à iniciação da degradação da matriz cartilaginosa na OA da ATM, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995; KYRKANIDES et al., 2007; TANAKA et al., 2008; VERNAL et al., 2008; GHASSEMI-NEJAD et al., 2011). Esses mediadores pró-inflamatórios podem induzir a síntese de enzimas proteolíticas, responsáveis pela degradação da matriz extracelular, destacando-se as metaloproteinases de matriz (MMPs) (BROOKS, 2003; ABRAMSON, 2004; GHASSEMI-NEJAD et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

As MMPs constituem uma ampla família de endopeptidases dependentes de zinco que degradam a matriz extracelular (MEC); incluindo as colagenases intersticiais (MMP-1, 8, 13 e 18), que degradam principalmente colágeno do tipo I; gelatinases (MMP-2 e 9), que tem ação sobre o colágeno desnaturado, fibronectina, elastina e agregam; estromelinas (MMP-3, 10 e 11), que degradam principalmente proteoglicanos, colágeno X e XI; matrilisina (MMP-7), com afinidade por fibronectina e plasminogênio; e outras MMPs (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000; ARAÚJO et al., 2011; LEMOS, 2015).

Estas enzimas são secretadas nas suas isoformas latentes ou inativas (pro-MMPs), as quais se tornam ativas quando o seu pro-domínio latente é clivado pela ação de outras proteases presentes no local da lesão, como a plasmina (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000; CHU et al., 2006; HSIEH et al., 2008; GUERRA et al., 2013; LEMOS, 2015).

As gelatinases constituem o grupo de MMPs mais estudadas e, podem ser divididas em: gelatinase A, que incluem as isoformas latente, intermediária e ativa da MMP-2; e gelatinase B, representada pelas isoformas latente e ativa da MMP-9 (CHU et al., 2006;



HSIEH et al., 2008; GUERRA et al., 2013; LEMOS, 2015; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). Diversos estudos têm relacionado a hiperatividade destas enzimas às alterações estruturais observadas na OA, inclusive na ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006).

Estudos recentes têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  podem induzir a síntese e atividade de MMP-2, MMP-3 e MMP-9 (CEVIDANES et al., 2014; ZHANG et al., 2016; CHU et al., 2017). Por outro lado, essas MMPs também podem, direta ou indiretamente, afetar a atividade destas citocinas, potencializando, assim, a resposta inflamatória (PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

Várias pesquisas têm enfatizado o papel das MMPs na osteoartrite da ATM, destacando-se as MMPs-2 e 9 (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006; CEVIDANES et al., 2014; ZHANG et al., 2016; CHU et al., 2017). Neste sentido, Loreto et al. (2013) demonstraram elevada concentração de MMP-9 em discos articulares removidos de pacientes com osteoartrite da ATM. Outros estudos também demonstraram elevadas concentrações de MMP-9 ou MMP-2 no fluido sinovial de pacientes com osteoartrite da ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001) e deslocamento de disco, com ou sem redução (YOSHIDA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2015).

#### **2.4 Modelo experimental de inflamação da ATM – adjuvante Completo de Freund (CFA)**

O estudo de mecanismos de início e progressão do processo inflamatório é de fundamental importância para ampliarmos o entendimento e o desenvolvimento de terapias mais eficientes. Contudo, questões éticas ou técnicas tendem a dificultar a realização de estudos mais aprofundados sobre os eventos moleculares e morfológicos da inflamação, nos tecidos da ATM de humanos, o que requer o desenvolvimento de modelos experimentais para pesquisas nessa condição (LEMOS, 2015).

Os modelos de inflamação na ATM consistem basicamente na injeção intra-articular de uma substância química com capacidade de irritação e desenvolvimento de um processo inflamatório local (KRISTENSEN et al., 2008; KUCUK et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014; LEMOS et al., 2015; RAFAYELYAN et al., 2015; LEMOS et al., 2016; MELO JÚNIOR et al., 2017). Na literatura pode-se observar o uso de várias substâncias, sendo que as mais utilizadas são: formalina, óleo de mostarda, carragenina, ovalbumina, IL-1 $\beta$ , zymozan e CFA (SPEARS et al., 2005; LAI et al., 2006;

KRISTENSEN et al., 2008; BONJARDIM et al., 2009b; KUCUK et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014; ARAÚJO et al., 2017; MELO JÚNIOR et al., 2017).

A maioria dessas substâncias têm sido eficientes apenas na indução de inflamação aguda (KRISTENSEN et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2017; MELO JÚNIOR et al., 2017). Entretanto, o CFA, adjuvante contendo o antígeno *Mycobacterium tuberculosis*, seco e suspenso em óleo mineral, é capaz de induzir uma resposta inflamatória intensa mediada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (SPEARS et al., 2005; WANG et al., 2012). Dentre elas, destaca-se a IL-1 $\beta$ , que mostrou resultados positivos na indução de inflamação persistente da ATM (HARPER et al., 2001; SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; KUROKI et al., 2011; WANG et al., 2012; GEORGE et al., 2013; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). Essa característica permitiu o surgimento 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; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016).

Neste sentido, Spears et al. (2005) demonstraram que o CFA é capaz de manter níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), fator de crescimento nervoso (NGF), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , por até seis semanas. Outros estudos realizados em nosso laboratório evidenciaram elevada atividade de MMP-2 e MMP-9, por até 3 semanas, após injeção intra-articular de CFA, indicando presença de intenso remodelamento local (LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016).

Entre as alterações morfológicas articulares induzidas pelo CFA, destacam-se: hiperplasia da membrana sinovial, presença de intenso infiltrado inflamatório crônico na membrana sinovial e tecido retrodiscal, aumento na espessura do disco articular e na camada fibrosa da cartilagem articular (WANG et al., 2012; GEORGE et al., 2013; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014; LEMOS et al., 2016).

Outros estudos também demonstraram que o CFA pode induzir o aparecimento de anormalidades ósseas no côndilo mandibular e osso temporal, como a osteofitose, erosão e destruição da cartilagem articular após um período de 14 dias (KAMEOKA et al., 2009; KUROKI et al., 2011).

## 2.5 Laser de baixa potência (LBP)

A discussão na literatura científica sobre a utilização de métodos conservadores para o tratamento dos distúrbios da ATM está bem consolidada (LEEUEW, 2010; OMMERBORN et al., 2010; REISSMANN et al., 2015; MOURA et al., 2017). Dentre esses métodos, a fototerapia tem sido estudada e, conseqüentemente, bastante utilizada nos últimos anos.

O Laser (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) e o LED (diodo emissor de luz) são fontes de luz caracterizadas pelas suas propriedades de monocromaticidade, coerência e colimação (KARU, 1989; CONVISSAR, 2011; PAOLILLO et al 2012; CASTRO, 2014). Vários estudos tem mostrado que estes equipamentos operados com parâmetros similares produzem resultados equivalentes nos tecidos-alvo, incluindo redução da dor, angiogênese, efeitos anti-inflamatórios e regeneração tecidual (CORAZZA et al., 2007; CASTRO et al., 2015; PANHOCA et al., 2015; LANGELLA et al., 2018).

A fototerapia com o laser de baixa potência (LBP) tem sido amplamente utilizada e resultados promissores foram descritos (KARU, 1989; LEEUEW, 2010). O LBP apresenta propriedades fotobioestimuladoras sobre os tecidos sem causar efeito térmico direto e exibe potência de saída caracteristicamente menor que 250 mW (KHALIGHI et al., 2010). Os seus efeitos biológicos sobre as células e tecidos ainda são desconhecidos ou controversos (LEEUEW, 2010), contudo, sabe-se que a luz laser afeta, principalmente, as células com diminuição das reações de oxidação-redução - redox (CONVISSAR, 2011). O aumento de adenosina trifosfato (ATP) nas células com baixo redox, deve-se a ação do LBP sobre a enzima fóton-aceptora citocromo-c oxidase, que é inibida pelo óxido nítrico (ON) no ciclo de Krebs. Neste caso, a luz laser dissocia a ligação entre ON e a referida enzima, permitindo que a mitocôndria retome a produção ATP (KARU, 1989; CONVISSAR, 2011; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014).

Farivar; Malekshahabi e Shiari (2014), sugeriram que durante a irradiação dos tecidos com LBP, os fótons são absorvidos pelas mitocôndrias, os quais estimulam a produção de ATP, espécies reativas de oxigênio (ROS) e estimulam fatores de transcrição como NF-κB. Este último ativa vários genes e produtos transcricionais, responsáveis pelos efeitos do LBP. Outros efeitos biológicos incluem: aumento do metabolismo celular, aumento da matriz colagenosa, quimiotaxia e angiogênese (BJORDAL et al., 2003; BJORDAL et al., 2006; KHALIGHI et al., 2010; LEEUEW, 2010).

A fototerapia com LBP segue o princípio da lei de Arndt-Schulz, na qual é possível descrever uma curva de resposta biológica do laser: uma dose muito baixa não causa efeitos, o aumento das dosagens promovem efeitos estimuladores até um ponto ótimo e, a partir deste

ponto o aumento das dosagens induz uma resposta inibitória (PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELL, 2008; CONVISSAR, 2011). Desta forma, é preciso conhecer o conceito de janela terapêutica para aplicação do LBP, uma vez que, para alguns pacientes, o tratamento é a inibição dos processos biológicos e altas doses são requeridas, como em processos agudos; em outros, a estimulação é o objetivo principal e doses menores devem ser aplicadas, a exemplo dos tratamentos para parestesia, cicatrização de feridas e outros processos crônicos (CONVISSAR, 2011).

Vários ensaios clínicos investigaram a ação do LBP nas disfunções temporomandibulares. A maioria destes descreveram significativa ação do laser na redução da dor na ATM (FIKACKOVÁ et al., 2007; MAZZETTO; HOTTA; PIZZO, 2010; SAYED; MURUAVEL; GNANAM, 2014; HOSGOR; BAS; CELENK, 2017), ampliação da abertura bucal e movimentos excursivos de lateralidade (CETINER et al., 2006; MAZZETTO; HOTTA; PIZZO, 2010; SALMOS-BRITO et al., 2012; HOSGOR; BAS; CELENK, 2017), além de redução da dor de origem mio gênica, especialmente a dor miofascial (CETINER et al., 2006; FIKACKOVÁ et al., 2007; OZ et al., 2010; SALMOS-BRITO et al., 2012; SAYED; MURUAVEL; GNANAM, 2014; CAVALCANTI et al., 2016).

Outros estudos clínicos, no entanto, demonstraram que não há diferença entre os efeitos do laser e do placebo em relação à redução da dor de origem articular ou muscular e melhora dos movimentos mandibulares (CARLI et al., 2012; LEAL DE GODOY et al., 2015; SHOBHA et al., 2017). Em contrapartida, outro estudo revelou que, embora o LBP tenha levado a uma imediata redução da queixa de dor em pacientes com desordem miofascial, a taxa de recorrência de dor foi elevada (72,4%) após 180 dias da última sessão (OLIVEIRA et al., 2017a).

De acordo com recente metanálise, uma das mais importantes limitações no estudo do LBP é a heterogeneidade dos parâmetros aplicados, tais como dose, energia, potência de saída, frequência e técnica de aplicação (CHEN et al., 2015), o que leva a resultados contraditórios. Em relação ao tema, outra metanálise sobre a ação do LBP na dor articular crônica, demonstrou que a maioria dos autores analisaram os efeitos clínicos do laser sem levar em consideração os seus efeitos biológicos, além de não salientarem o fato de que a dose de LBP é afetada por características de penetração física e anatômica. De acordo ainda com a metanálise, existe em média 2 mm de profundidade entre a pele e a membrana sinovial da ATM e, portanto, necessária apenas um ponto de aplicação para se fornecer dose ideal de LBP. Além disso, ao utilizar-se o laser com comprimento de onda de 820, 830 ou 1060 nm, a energia aplicada deverá variar entre 0,5 e 15J (BORDJAL et al., 2003).

Estudos em diferentes modelos experimentais de distúrbios inflamatórios, mostraram efeitos positivos do LBP. Entretanto, existe pouca ou nenhuma evidência literária sobre trabalho relacionado à ATM. Neste sentido, Carvalho et al., (2011) ao compararem os efeitos do laser infravermelho (780 nm, 225J/cm<sup>2</sup>) e vermelho (660 nm, 120J/cm<sup>2</sup>), verificaram maior eficácia do primeiro na redução da inflamação e hiperplasia sinovial induzida por meio da injeção intra-articular de carragenina na ATM. Castro et al. (2015) evidenciaram melhores resultados do laser infravermelho (780 nm, 250J/cm<sup>2</sup>), comparado ao LED (850 nm, 20J/cm<sup>2</sup>), sobre a inflamação induzida por carragenina na ATM. Já um estudo realizado em nosso laboratório mostrou que o LPB (830 nm, 3J/cm<sup>2</sup>) acelerou o remodelamento tecidual e reduziu a degradação da matriz extracelular, em modelo de inflamação da ATM, induzida através da injeção intra-articular de CFA (LEMOS et al. 2016).

Outros estudos, também, demonstraram que o LBP reduziu a hiperalgesia orofacial (teste de formalina) (BARRETTO et al., 2013; DESIDERÁ et al., 2015) e alodinia mecânica (teste de Von Frey) (DESIDERÁ et al., 2015) em ratos com inflamação induzida da ATM. Desiderá et al. (2015), demonstraram, também, que o LBP reduziu a atividade de MMP-2 e MMP-9 no gânglio trigeminal, em modelo de inflamação através de injeção intra-articular de CFA.

Por outro lado, Kucuk et al. (2010), em um de seus primeiros trabalhos, estudaram a ação do LPB sobre a inflamação experimental da ATM e, não observaram efeitos significativos do laser (815nm, 12J/cm<sup>2</sup>) na redução de processo inflamatório induzido por formalina ao final de duas semanas de avaliação.

Estudos experimentais realizados em outras articulações descreveram significativo efeito do LBP na redução do processo inflamatório. Nestes, foi demonstrado que a terapia com LBP reduz significativamente o número de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos (CASTANO et al., 2007; PALLOTA et al., 2012; ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; CARLOS et al., 2014; SANTOS et al., 2014), além de reduzir o edema e extravasamento vascular (PALLOTA et al., 2012; ALVES et al., 2013b).

Também foi demonstrado que doses variadas de laser, em diferentes modelos de injúria articular (Zymosan, papaína, collagenase, carragenina, CFA, dentre outros) reduziam significativamente as concentrações de vários biomarcadores inflamatórios ou a expressão do mRNA destes, incluindo TNF- $\alpha$  (ALVES et al., 2013a; OLIVEIRA et al., 2017b; TOMAZONI et al., 2017), IL-1 $\beta$  (PALLOTA et al., 2012; ALVES et al., 2013a; CARLOS et al., 2014, SANTOS et al., 2014; TOMAZONI et al., 2017), IL-6 (PALLOTA et al., 2012; ALVES et al., 2013a; CARLOS et al., 2014; TOMAZONI et al., 2017), prostaglandina E2

(PGE2) (CASTANO et al., 2007; PALLOTA et al., 2012; TOMAZONI et al., 2017), ciclooxigenase-2 (COX-2) (BORDAL et al 2006) e quimioatraente-1 de neutrófilos indutor de citocina (CINC-1), homóloga da IL-8 (OLIVEIRA et al., 2017b).

Como enfatizado anteriormente nesta revisão, o IL-1 $\beta$  e outras citocinas podem modular a atividade de metaloproteínases (CEVIDANES et al., 2014; ZHANG et al., 2016; CHU et al., 2017). Neste sentido, Alves et al. (2014) observaram significativa ação do laser (808 nm, 142 J/cm<sup>2</sup>) na redução da atividade de MMP-2 e MMP-9, em joelhos de ratos com injúria induzida por papaína 4%. Carlos et al. (2014), também descreveram significativa redução da atividade destas MMPs após injúria articular por injeção de Zymosan, utilizando um aparelho com comprimento de onda de 660 nm e dose de 2,5 J/cm<sup>2</sup>. Outros trabalhos também demonstraram redução na atividade da MMP-3 (HSIEH et al., 2014; WANG et al., 2014) e MMP-13 (ASSIS et al., 2016).

Bordal et al. (2006) em metanálise referente a ação do laser sobre a dor aguda, concluíram que há forte evidência do LBP em modular a atividade de mediadores bioquímicos da inflamação, principalmente a PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e COX-2, sendo este um efeito dose dependente, com doses ideais entre 0,7 e 19 J/cm<sup>2</sup>.

Conforme observamos ao longo dessa revisão, a terapia com LBP mostrou resultados positivos no reparo do dano articular, especialmente àqueles de origem inflamatória. Entretanto, não ocorre definição assertiva, quanto à parâmetros apropriados, em especial, com relação à dosagem, energia e número de sessões. Além disso, os estudos biológicos sobre os potenciais efeitos do laser na ATM merecem atenção e, seu mecanismo de ação e efeito anti-inflamatório permanecem ainda com vários pontos a serem estudados.

Desta forma, estudos experimentais realizados em modelos animais são necessários, a fim de que possamos obter melhor compreensão destes mecanismos e com isso, sustentar seu uso de forma segura no tratamento dos distúrbios inflamatórios que acometem esta articulação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos de diferentes dosagens de laser de baixa potência (LBP) no modelo experimental de artrite da articulação temporomandibular (ATM) de ratos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a ATM contralateral é afetada nos aspectos morfológicos e bioquímicos pela indução de artrite na articulação esquerda;
- Verificar se o modelo de artrite induzida na ATM é capaz de promover alterações no diâmetro e área de fibras dos músculos mastigatórios;
- Verificar se o modelo de artrite induzida na ATM é capaz de promover alterações na quantidade de ração consumida pelos animais;
- Verificar a ação das diferentes dosagens de LBP sobre a artrite induzida na ATM a partir dos seguintes aspectos:
  - a) morfologia e aspectos histomorfométricos do disco e cartilagem articular, distribuição de proteoglicanos e organização das fibras colágenas nos tecidos da ATM;
  - b) diâmetro e área de fibras dos músculos mastigatórios;
  - c) quantidade de ração consumida pelos animais;
  - d) quantificação dos níveis de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) na membrana sinovial, disco articular e tecidos retrodiscais da ATM;
  - e) atividade das metaloproteinases - 2 e - 9 e concentração de citocinas pró-inflamatórias na membrana sinovial, disco articular e tecidos retrodiscais da ATM;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cálculo amostral

Para a determinação do número amostral foi utilizada a seguinte fórmula (ZAR, 2010; SOKAL; ROLF, 2012):

$$n = 1 + [2C \times (s/d)^2], \text{ na qual } C = (z\alpha + z\beta)^2$$

Adotou-se um poder estatístico de 90% (erro  $\beta$ ), nível de significância  $p=0,05$  (erro tipo I), desvio máximo (s) de 20% e diferença mínima (d) de 50%. Considerou-se o valor arbitrado de 10,5 para a fórmula  $(z\alpha+z\beta)^2$ . Este valor é aplicado para testes bicaudais, com poder estatístico de 90% e nível de significância 0,05 (FONTELLES et al., 2010).

O resultado obtido foi  $n=4,36$  e aproximado para cinco animais/grupo em cada uma das técnicas realizadas: histologia, dosagem de glicosaminoglicanos sulfatados, zimografia e ELISA; totalizando 100 animais.

### 4.2 Animais da Pesquisa

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), sob protocolo número 3797-1. Foram utilizados um total de 100 ratos *Wistar* machos, com idade média de 60 dias e peso entre 300 e 350 gramas, fornecidos pelo biotério Thomas George pertencente ao Centro de Biotecnologia (Cbiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas padrão - 5 animais por gaiolas, regime hídrico e alimentar *ad libitum*, sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 °C. Cabe destacar que nos grupos destinados à avaliação da quantidade de ração consumida, os animais foram separados e mantidos apenas um (01) por gaiola.

### 4.3 Grupos Experimentais

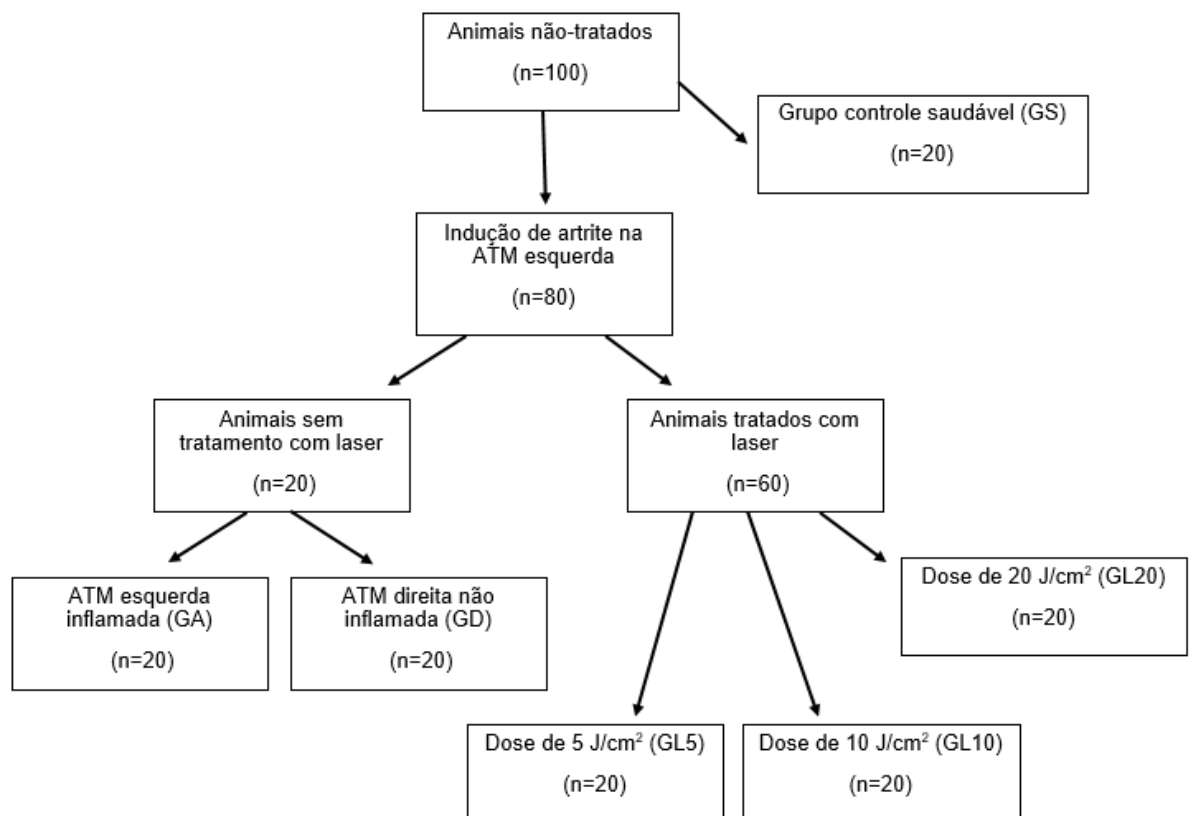
Os animais foram divididos nos seguintes grupos, com 20 animais cada, conforme esquematizado na Figura 3:



- GS: animais controle saudáveis
- GA: animais com artrite na ATM
- GL5: animais com artrite e tratados com LPB na dose de 5 J/cm<sup>2</sup>
- GL10: animais com artrite e tratados com LPB na dose de 10 J/cm<sup>2</sup>
- GL20: animais com artrite e tratados com LPB na dose de 20 J/cm<sup>2</sup>

Todos os experimentos foram realizados em uma articulação (ATM esquerda). As ATMs direitas, apenas no grupo GA, foram utilizadas como GRUPO CONTRALATERAL NÃO-INFLAMADO – GD (LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016).

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



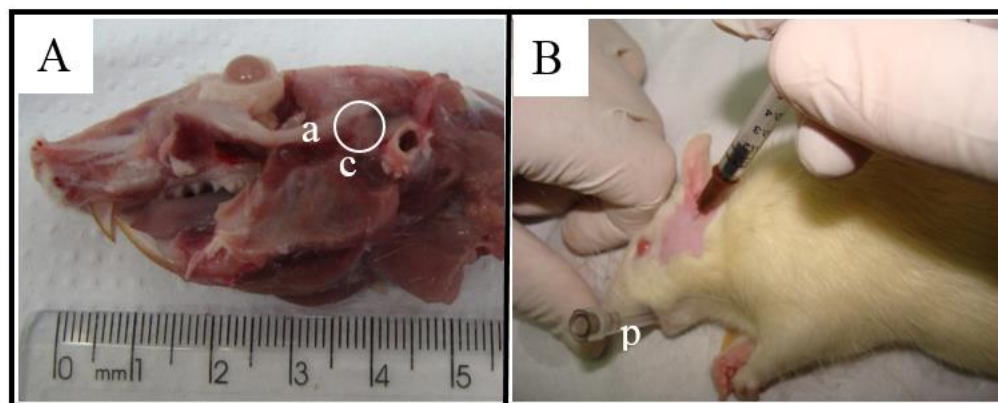
**Figura 3: Esquema da distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais**

#### 4.4 Indução de Artrite na ATM

Para indução de artrite na ATM, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de uma solução de 1:1 de Cetamina (70mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), a fim de permitir a administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) por via intra-articular na ATM esquerda. Antes da injeção do CFA, os pelos na região das ATMs foram removidos para melhor visualização das estruturas anatômicas.

Foi realizada uma diluição de 1:1 (salina/óleo) no volume de 50 µL de solução salina e 50 µL de CFA (5881; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) intra-articular na ATM esquerda, em dose única (SPEARS et al., 2005; NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). Na injeção foi utilizada uma agulha calibre 30 G1/2 acoplada a uma seringa plástica de 1 mL (NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014; LEMOS et al., 2015).

Para localização das ATMs, foi realizada palpação do arco zigomático e do côndilo mandibular, a fim de se evidenciar o local correto da injeção. 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 – Figura 4 (ZHOU et al., 1999).



**Figura 4: 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 conforme técnica descrita por Zhou et al. (1999). A boca do animal foi mantida aberta com o auxílio de um protetor de agulha (p) para facilitar a inserção da agulha na região da ATM. Imagem de LEMOS (2015).

#### 4.5 Terapia com 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 qual consiste em um diodo de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), com comprimento de onda de 830 nm, potência de saída de 30 mW, área de contato de 0,116 cm<sup>2</sup>, densidade de potência ou irradiância 0,259 W/cm<sup>2</sup> e programado para atuar em modo contínuo. A potência de saída do aparelho e a dose emitida foram aferidas ao longo do período experimental, no Centro de Engenharia Biomédica da Unicamp.

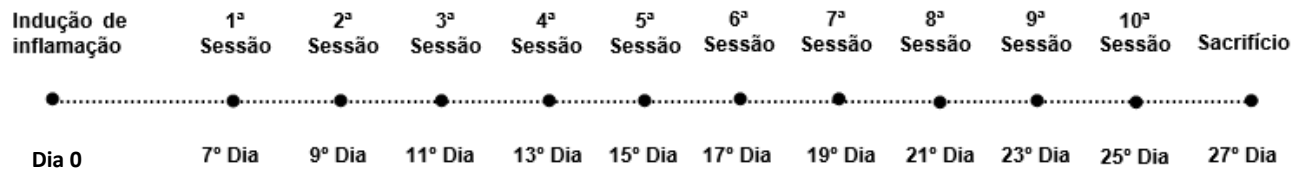
Os animais foram imobilizados manualmente e, aplicou-se o laser em um único ponto, diretamente em contato com a pele, sobre a ATM esquerda (Figura 5). Os animais receberam os seguintes parâmetros de LBP:

- Densidade de energia (dose) 5 J/cm<sup>2</sup>, energia de 0,6 J, durante 20 segundos
- Densidade de energia (dose) 10 J/cm<sup>2</sup>, energia de 1,2 J, durante 40 segundos
- Densidade de energia (dose) 20 J/cm<sup>2</sup>, energia de 2,4 J, durante 80 segundos



**Figura 5: Imobilização do animal e aplicação do LBP sobre a região da ATM. Imagem de LEMOS (2015).**

O tratamento consistiu de dez sessões, com intervalos de 48 horas (Figura 6). Em todas as sessões de LBP foram respeitados os mesmos horários, aparelho e acessórios. Os protocolos foram estabelecidos com base em estudos previamente descritos (FIKÁCKOVÁ et al., 2007; MAZZETTO; HOTTA; PIZZO, 2010; KUKUK et al., 2010; DESIDERÁ et al., 2014; LEMOS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017a).



**Figura 6: Cronograma de aplicação do LBP**

#### 4.6 Eutanásia dos Animais e Coleta dos Tecidos

Os animais tratados com o LBP foram eutanasiados com aprofundamento da anestesia (a mesma descrita no tópico 4.4), 48 horas após o final da última sessão, ocorrendo 27 dias após a indução de artrite na ATM (Figura 4). O grupo de animais tratados apenas com CFA foram submetidos a eutanásia 27 dias após a indução de artrite, com finalidade de padronização dos grupos, quanto ao tempo para as análises morfológicas e bioquímicas subsequentes.

Os músculos mastigatórios (masseter, temporal, pterigóideos medial e lateral) foram dissecados e removidos para análises morfológicas. Em uma parte dos animais (n=5 por grupo), as ATMs foram cuidadosamente dissecadas e removidas em blocos que seguiram para análises histológicas. Em outra parte (n=15 por grupo), removeu-se o disco articular, cápsula (parte lateral aderida ao disco) e tecido retrodiscal. Estes foram armazenados em biofreezer a -80°C para avaliação bioquímica subsequente (metaloproteinases, dosagem de glicosaminoglicanos e citocinas pró-inflamatórias).

#### 4.7 Análise Morfológica

##### 4.7.1 Articulação Temporomandibular

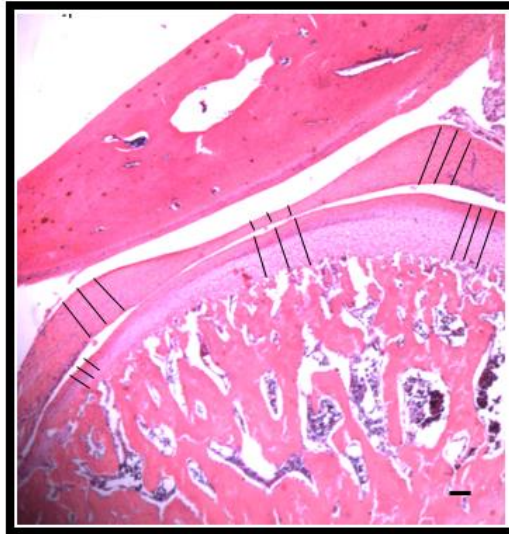
Os blocos contendo a ATM foram fixados em formalina a 10% tamponada, durante 24 horas a 22°C e, em seguida lavados em água corrente por 12 horas. Posteriormente, os blocos foram descalcificados em solução descalcificadora Allkimia (EDTA sódico, tartarato de sódio e potássio, ácido clorídrico e água deionizada). A solução descalcificadora foi trocada a cada três dias até promover uma descalcificação adequada das amostras, as quais foram verificadas atravessando-se uma agulha no tecido sem resistência (cerca de 15 dias). Após completa descalcificação, os blocos foram reduzidos através de navalha de micrótomo e, em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente por 12h, desidratadas em sequência alcoólica, diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast. Após estas etapas, foram realizados cortes

sagitais da ATM, incluindo o côndilo, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular, com espessuras de 7  $\mu\text{m}$  cada. Os cortes foram realizados em micrótomo Leica RM2125RT (Leica Microsystems, Germany).

#### **4.7.1.1 Coloração com Hematoxilina-eosina (HE) e Análises Histomorfométricas**

As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinadas e reidratadas. Em seguida, mergulhadas em solução de Hematoxilina por 1 minuto e 30 segundos, lavadas em água corrente e, posteriormente, mergulhadas em Eosina por 1 minuto. Na sequência, as lâminas foram desidratadas em uma sequência alcoólica (70, 80, 95, 100%), mergulhadas em xilol e montadas com lamínulas em Bálsamo do Canadá (KIERNAN, 1981). Em seguida foram capturadas imagens das ATMs através de um microscópio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japão) e de uma câmera acoplada a este (Nikon D7000, Nikon, Japão). Foi realizada uma análise descritiva quanto à 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.

Na morfometria da ATM foram quantificadas as espessuras do disco e da cartilagem articular por meio do Software Image\_J (Sun Microsystems, EUA), sendo três cortes histológicos seriados para cada amostra. A espessura do disco e cartilagem articular foi mensurada em três diferentes pontos nas regiões anterior (A), média (M) e posterior (P) (Figura 7) (WANG et al., 2012; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016; XU et al., 2016; XU et al., 2017; WANG et al., 2017). A média aritmética da espessura em cada uma das três regiões foi calculada utilizando o software de estatística GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA). Para a cartilagem articular foi realizada uma média geral da espessura. Todas as análises histomorfométricas foram realizadas em imagens capturadas na objetiva de 4X e feitas por único avaliador treinado, em estudo cego (sem conhecimento dos grupos avaliados).



**Figura 7: Fotomicrografia da ATM mostrando os locais de mensuração da espessura do disco e cartilagem articular.** (A): região anterior disco;(M): região média do disco;(P): região posterior do disco. Coloração HE; Objetiva de 4X. (Barra de Escala = 100  $\mu$ m).

#### 4.7.1.2 Coloração com 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 tetraborato de sódio (0,125 g/25 ml de água deionizada). As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinadas e reidratadas. Em seguida, mergulhadas na solução corante por 10 min, 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 à presença de metacromasia na cartilagem articular (LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). As análises qualitativas foram realizadas por um único examinador treinado e, três cortes seriados por articulação foram avaliados.

#### 4.7.1.3 Coloração com Picrosirius e Birrefringência das Fibras Colágenas

Birrefringência é uma propriedade anisotrópica óptica, que permite avaliação do grau de organização das fibras colágenas em diferentes amostras (ROSA, 2007). A luz polarizada ao atravessar um material anisotrópico sofre uma dupla refração, com aparecimento de dois raios refratados em direções perpendiculares: um lento (extraordinário), que no caso das fibras colágenas tem direção de propagação paralela ao eixo da fibra; e um rápido (ordinário),

com direção perpendicular (VIDAL, 1987; ROSA, 2007; VIDAL 2010). As velocidades de propagação são inversamente proporcionais ao índice de refração dos respectivos raios; e a birrefringência é determinada pela diferença do índice de refração do raio extraordinário ( $n_e$ ) pelo índice de refração do raio ordinário ( $n_o$ ), seguindo a fórmula:  $B = n_e - n_o$  (VIDAL, 1987; ROSA, 2007).

Os raios refratados ao emergirem do material com uma diferença de fase, são recombinados no filtro analisador, resultando no brilho visível da birrefringência (ROSA, 2007). Este brilho corresponde ao retardo óptico (OR), determinado pela seguinte fórmula:  $OR = (n_e - n_o) \cdot e$  ou  $OR = B \cdot e$ , onde ( $e$ ) corresponde a espessura do material. Ou seja, o RO varia com a espessura dos cortes ou a concentração de material (VIDAL, 1987).

Quando os raios lento e rápido não estão paralelos ao polarizador ou analisador, o material apresentará um brilho, que é mais intenso a  $45^\circ$ . Se os raios estiverem paralelos ao polarizador ou analisador, ocorrerá desaparecimento da birrefringência e escurecimento da imagem (ROSA, 2007).

Neste estudo, os cortes histológicos submetidos a avaliação da birrefringência das fibras colágenas foram corados previamente com Picosirius. O método baseia-se na utilização do Sirius Red, corante vermelho escuro, fortemente ácido, em associação com o ácido pícrico. Nessa técnica os aminoácidos básicos presentes nas moléculas do colágeno reagem, fortemente, com o corante ácido. Essa reação aumenta a birrefringência normal das fibras colágenas, composta por moléculas agregadas, quando observadas sob luz polarizada (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979; VIDAL; MELLO; PIMENTEL, 1982).

Os componentes fibrilares contendo moléculas orientadas de colágeno aparecem como estruturas brilhantes contra um fundo escuro, quando analisadas em microscópio de luz polarizada. As regiões com maior grau de organização e compactação das fibras colágenas apresentam intenso brilho vermelho e maiores taxas de absorvância. Já as regiões que apresentam fibras colágenas menos compactadas e menos espessas exibem brilho com cor variando do amarelo ao verde (VIDAL; MELLO; PIMENTEL, 1982).

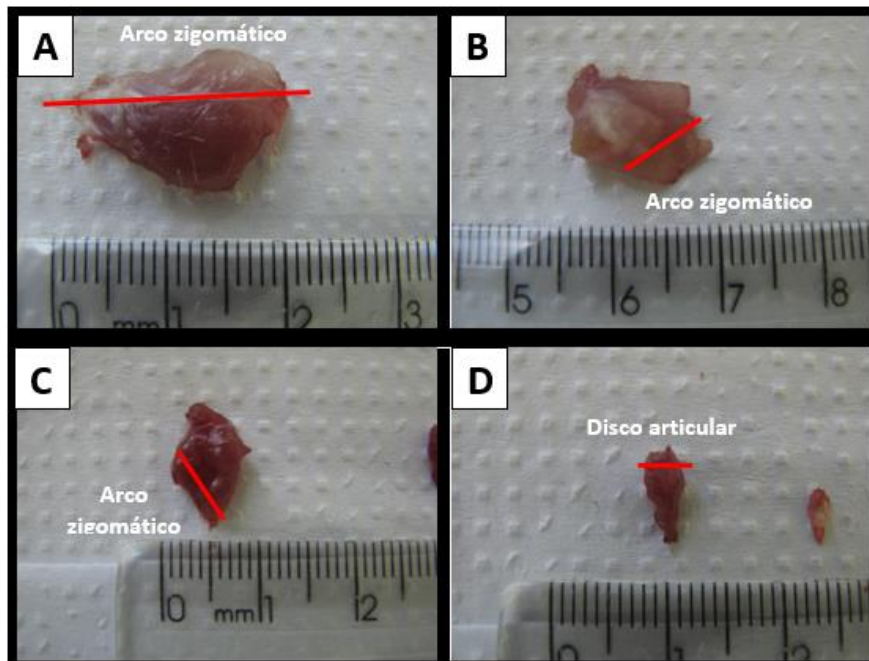
Nesse método, as lâminas com os tecidos da ATM foram desparafinadas, reidratadas, coradas com Picosirius, por aproximadamente 10 minutos, e lavadas em água corrente. Em seguida, receberam coloração de fundo em Hematoxilina de Harris por 10 minutos, foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e, montadas em bálsamo do Canadá.

A birrefringência foi analisada através de um microscópio de luz polarizada Axioskop 40 (Carl Zeiss Light Microscopy, Alemanha) e de uma câmera acoplada a este (Nikon D7000,

Nikon, Japão). Para observação de birrefringência, os cortes corados foram posicionados de modo que o maior eixo dos feixes de colágeno ficasse a 45° em relação ao polarizador e ao analisador. Foi realizada uma análise descritiva quanto à birrefringência das fibras colágenas nas três regiões anatômicas do disco articular (anterior, média e posterior). As análises foram realizadas por um único examinador treinado e, três cortes seriados por articulação foram avaliados.

#### 4.7.2 Músculos Mastigatórios

Após a dissecação, os músculos mastigatórios foram transferidos para um recipiente e fixados em solução de formalina 10% tamponada, durante 24 horas a 22°C e, em seguida, lavadas em água corrente por 12 horas. Após remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em sequência alcoólica, diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast. Posteriormente, foram realizados cortes transversais dos músculos mastigatórios, ao nível de suas respectivas regiões mais próximas à ATM. A Figura 8 mostra a localização e direção dos cortes, tendo como referências, o arco zigomático e o disco articular. A espessura dos cortes foi de 7 µm, realizados em micrótomo Leica RM2125RT (Leica Microsystems, Nussloch, Baden-Württemberg, Alemanha).



**Figura 8: Localização dos cortes histológicos nos músculos mastigatórios.** (A): masseter; (B): temporal; (C): pterigóideo medial; (D): pterigóideo lateral. A linha vermelha indica o local e a direção dos cortes histológicos.



#### **4.7.2.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) e Análises Histomorfométricas**

As lâminas foram coradas com HE, conforme protocolo descrito anteriormente (item 4.7.1.1). Para o estudo histomorfométrico, as imagens coradas com HE foram capturadas através de um microscópio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japão) e de uma câmera acoplada a este (Nikon D7000, Nikon, Japão). Todas as imagens foram capturadas na objetiva de 20X. Na morfometria foram quantificadas a área e o diâmetro de Feret das fibras musculares, com auxílio do Software Image\_J (Sun Microsystems, EUA). Foram avaliados por animal, total de 225 fibras (RISSI et al., 2016), sendo assim obtidas: 15 fibras por campo, cinco campos por corte, em três cortes não-seriados para cada músculo. A seleção dos campos e fibras foi realizada aleatoriamente. Todas as análises histomorfométricas foram realizadas por único avaliador treinado, em um estudo cego (sem conhecimento dos grupos avaliados).

#### **4.8 Avaliação da quantidade de ração ingerida**

Avaliou-se a quantidade de ração consumida, em gramas (g), pelos animais nos diferentes grupos experimentais destinados às análises morfológicas futuras. Após indução de artrite, um total de 5 animais foram separados e mantidos individualmente em cada gaiola, sendo em seguida, submetidos a tratamento com LBP ou não (grupo GA). A ração foi pesada semanalmente no transcorrer do período experimental nos diferentes grupos, totalizando três semanas de avaliações. Os animais do grupo controle saudável (GS), também, foram avaliados em condições experimentais semelhantes aos animais com artrite induzida (número de animais, idades e períodos de avaliação).

A quantidade de ração consumida, semanalmente, foi determinada pela diferença da medida da semana anterior pela medida da semana avaliada. Dessa forma, foi realizada uma média do consumo de ração nas três semanas de avaliações.

#### **4.9 Análise Bioquímica e Molecular**

Para realização das técnicas bioquímicas e moleculares, os tecidos das ATMs foram colocados em eppendorf e armazenados em biofreezer a -80°, para análises subsequentes.

#### 4.9.1 Quantificação de Glicosaminoglicanos Sulfatados (GAGs) da Matriz Extracelular

**Extração dos GAGs:** Os fragmentos do disco articular, cápsula e tecidos retrodiscais da ATM foram triturados com bisturi sobre placa de Petri, 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) (80 mg/g de tecido seco), contendo 100 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 6,5, EDTA 40 mM, e 80 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 24h. Após incubação, o material foi centrifugado (6000 rpm ou 3387  $\times$ g, em 15 min – centrífuga Eppendorf, modelo 5424 R, rotor FA-45-24-11, Alemanha) e o sobrenadante coletado 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 coletado foi lavado com etanol 80% e seco em estufa a 37°C por cerca de 1h. Após essas etapas, as amostras foram ressuspensas em água (volume para cobrir o precipitado) e seguiram para dosagem de GAGs.

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

#### 4.9.2 Zimografia

As metaloproteases (MMP-2 e MMP-9) foram identificadas através da técnica de zimografia (NASCIMENTO et al., 2013), seguindo-se os seguintes procedimentos:

**Extração:** Os tecidos congelados (membrana sinovial, disco articular e tecidos retrodiscais) foram triturados em pulverizador e, em seguida, homogeneizados com tampão de extração RIPA (20 mM Tris-HCl at pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio) diluído em água destilada (1:10) e, contendo inibidor de protease (Sigma) na proporção de 100  $\mu$ L de inibidor para cada 10 mL de tampão diluído. Uma alíquota de 300  $\mu$ L de tampão foi adicionada a cada amostra, para obtenção de uma quantidade significativa de extrato. A extração foi realizada por aproximadamente 1 h e 30 min, em temperatura ambiente e sob agitação. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min, a 4° C (18659  $\times$ g, centrífuga Scilogex, modelo D3024R, rotor AS24-2, EUA) e o sobrenadante coletado. Uma parte do extrato foi separada

para posterior dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Para realização do método de Bradford (1976) foram retiradas alíquotas dos extratos obtidos anteriormente e como padrão foi empregado albumina sérica bovina (BSA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo 8452 A Diode Array HP, EUA) no comprimento de onda de 595 nm.

**Aplicação das amostras:** Foi aplicado um volume de amostra contendo 30 µg de proteína. Em seguida, o volume foi completado para 15 µL com H<sub>2</sub>O 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.

**Eletroforese (aproximadamente 1h30min):** Foi realizada em condições não redutoras a 4°C. Inicialmente as amostras correram por 30 min a 90 V e, em seguida, por mais uma hora a 150 V. 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 CaCl<sub>2</sub> e 1 µM de ZnCl<sub>2</sub>), o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue por 1 h, e descorado (solução de metanol 30% e ácido acético a 10% em água). Finalmente o gel foi 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).

#### **4.9.3 Concentração de citocinas pró-inflamatórias**

A concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  medida através de ensaio imuno-enzimático (ELISA), seguindo-se as seguintes etapas:

**Extração:** Os tecidos congelados (membrana sinovial, disco articular e tecidos retrodisciais) foram triturados em pulverizador e, em seguida, homogeneizados com tampão de extração RIPA (20 mM Tris-HCl at pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio), diluído em água destilada (1:10), contendo inibidor de protease na proporção de 100 µL de inibidor para cada 10 mL de tampão diluído. Uma alíquota de 300 µL de tampão foi adicionado a cada amostra para a obtenção de uma quantidade significativa de extrato. A extração foi realizada por aproximadamente 1 h e 30 min, em temperatura ambiente e sob agitação. Após este período, as amostras foram

centrifugadas a 14000 rpm por 20 min, a 4° C (18659 <sup>x</sup>g, centrífuga Scilogex, modelo D3024R, rotor AS24-2, EUA) e o sobrenadante coletado.

**Quantificação das citocinas:** A quantificação das citocinas foi realizada em duplicata, utilizando Kits de ELISA disponíveis comercialmente (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante. Antes da aplicação das amostras na placa de ELISA, as mesmas foram diluídas na proporção de 50 µL de amostra e 100µL de calibrador RDS-17 do próprio kit Quantikine.

A leitura foi realizada em leitora de microplacas (Multiskan MCC/340) no comprimento de onda de 450 nm e correção de 570 nm. Os dados obtidos foram normalizados pela concentração total de proteínas (método de Bradford), sendo expressos em picogramas (pg)/micrograma (µg) de proteínas totais de IL-6 (R6000B), TNF-α (RTA00) e IL-1β (RLB00).

#### **4.10 Análise Estatística**

Realizou-se, inicialmente, o teste de Kolmogorov-Smirnov que demonstrou distribuição normal dos dados. Para os dados relativos as ATMs, aplicou-se o teste t pareado para determinar as diferenças estatísticas entre GD e GA, enquanto que as diferenças entre GD X GS e GS X GA foram determinadas por meio do teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Para os dados relativos a morfometria dos músculos mastigatórios aplicou-se o *teste t pareado*, para determinar as diferenças entre os músculos direito e esquerdo do mesmo animal e, o *teste t não-pareado*, para os músculos direito e esquerdo de animais diferentes. Os dados foram tabulados e analisados através do software GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA), com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

Baseado nos objetivos propostos, os resultados foram divididos em dois capítulos:

- Capítulo 1: Modelo Experimental de Artrite da Articulação Temporomandibular: Efeitos sobre a Articulação Contralateral e Músculos Mastigatórios
- Capítulo 2: Atividade Fotobioestimuladora de Dosagens Diferenciadas de LBP sobre a Artrite Induzida na ATM e Músculos Mastigatórios

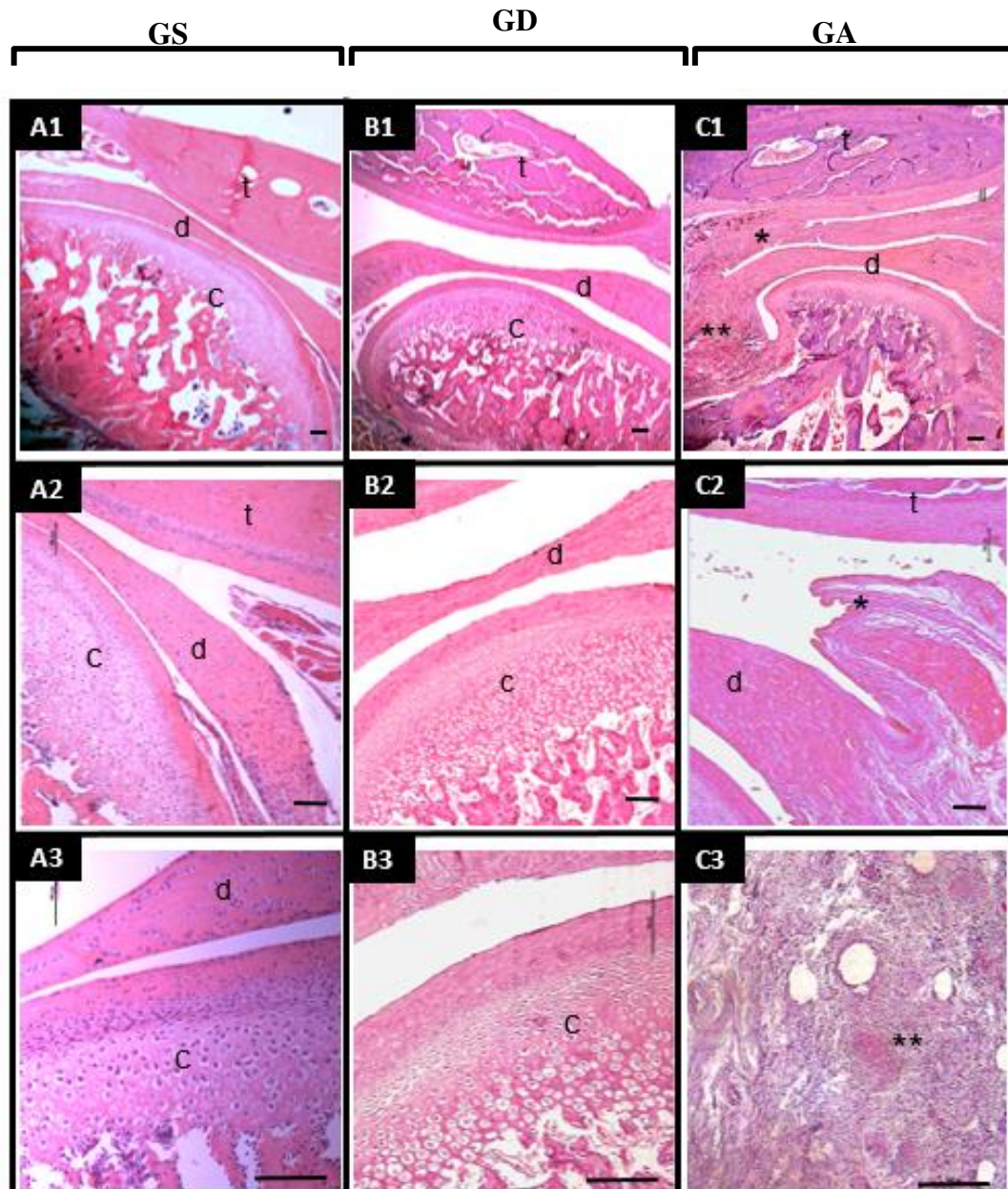
## **5.1 Capítulo 1 - Modelo Experimental de Artrite da Articulação Temporomandibular: Efeitos sobre a Articulação Contralateral e Músculos Mastigatórios**

### **5.1.1 Análise Morfológica e Histomorfométrica**

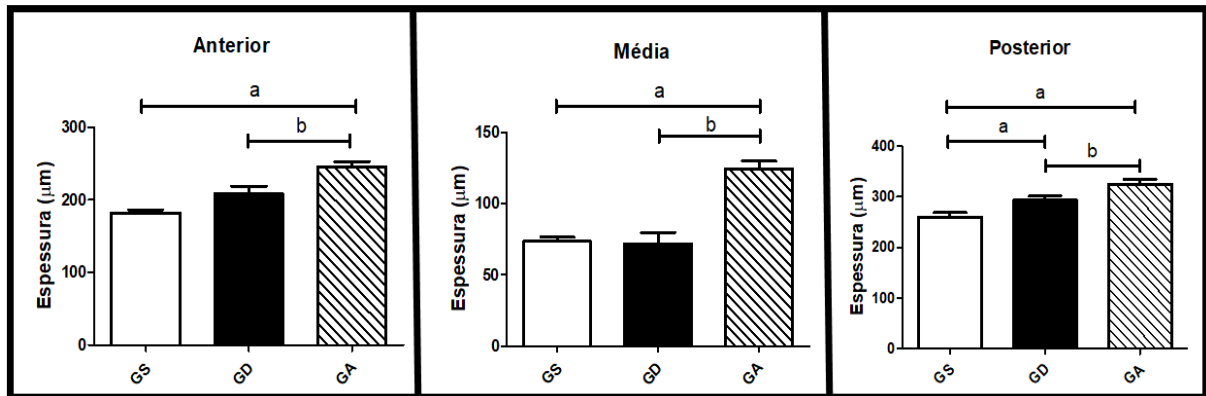
Os animais do grupo saudável (GS) apresentaram morfologia normal do côndilo, osso temporal, disco articular e tecidos periarticulares (Figura 9 A1-3). Os animais de GD exibiram morfologia semelhante a GS (Figura 9 B1-3). A análise histomorfométrica demonstrou que a região posterior do disco articular, em GD, foi estatisticamente mais espessa em comparação ao GS (Figura 10).

Em GA, observaram-se 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 presença de intenso infiltrado inflamatório crônico e proliferação vascular no tecido subsinovial (Figura 9 C1-3), compatíveis com as alterações artríticas desta articulação. A morfometria evidenciou espessura estatisticamente elevada nas regiões anterior, média e posterior do disco articular, em comparação a GS e a GD (Figura 10).

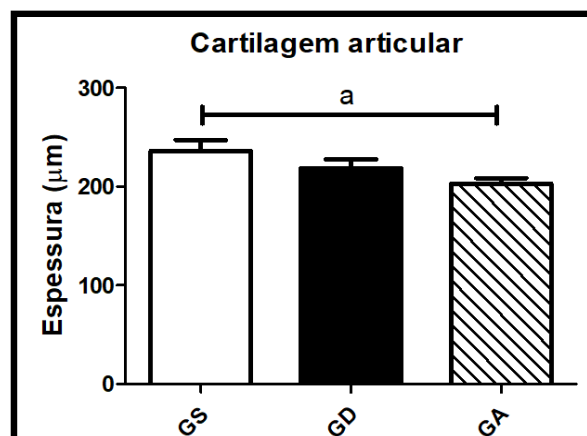
A morfometria da cartilagem articular demonstrou redução estatisticamente significativa na espessura da cartilagem articular no grupo GA em comparação a GS, mas não em comparação a GD (Figura 11).



**Figura 9: Imagens histológicas da ATM. Coloração com HE.** A1-3: grupo controle saudável (GS). Objetiva de 4X, 10X e 20X, respectivamente. B1-3: grupo contralateral não-inflamado (GD). Objetiva de 4X, 10X e 20X, respectivamente. C1-3: grupo artrite (GA). Objetiva de 4X, 10X e 20X, respectivamente. (c): côndilo mandibular. (d): disco articular. (t): osso temporal. (\*): proliferação da membrana sinovial. (\*\*): infiltrado inflamatório crônico. N=5 animais. (Barra de Escala = 100  $\mu$ m).



**Figura 10: Morfometria das regiões anterior, média e posterior do disco articular (espessura em  $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo contralateral não-inflamado (GD) e grupo artrite (GA). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste t pareado. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.



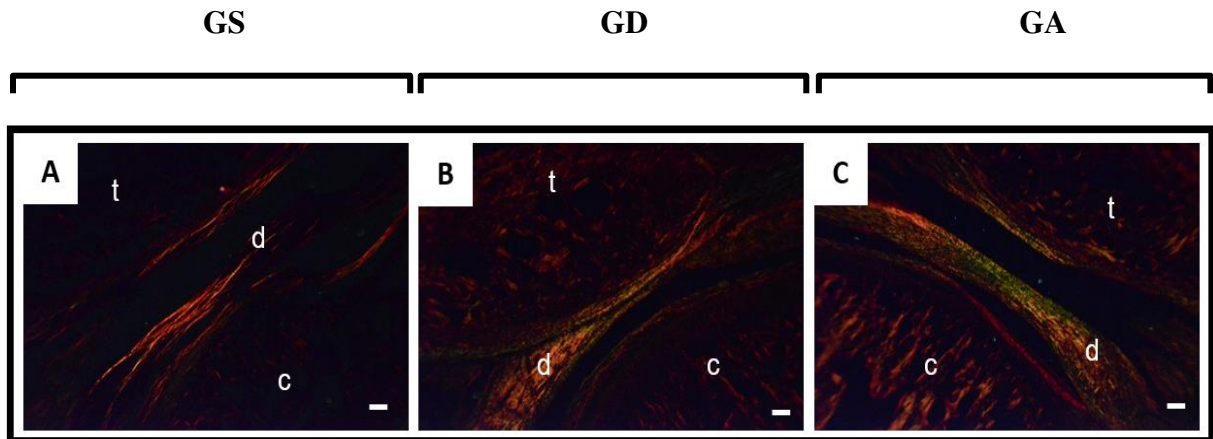
**Figura 11: Morfometria da cartilagem (espessura em  $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos experimentais. Média total da espessura.** Grupo controle saudável (GS), grupo contralateral não-inflamado (GD) e grupo artrite (GA). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

### 5.1.2 Coloração com Picrosirius -Organização e Compactação das Fibras Colágenas

Os cortes sagitais da ATM foram corados com Picrosirius e examinados em microscópio de luz polarizada. As imagens representativas, de cada grupo, estão organizadas na Figura 12. Conforme se observa na figura mencionada, os animais do GS exibiram intenso brilho avermelhado no disco articular, o que indica um alto grau de compactação e organização das fibras colágenas. GD exibiu coloração alaranjada e discreta coloração



esverdeada, o que indica menor grau de compactação das fibras colágenas em comparação ao GS. Por outro lado, o GA mostrou maior intensidade de coloração esverdeada, o que sugere uma desorganização da rede de fibras colágenas e remodelamento do disco articular.

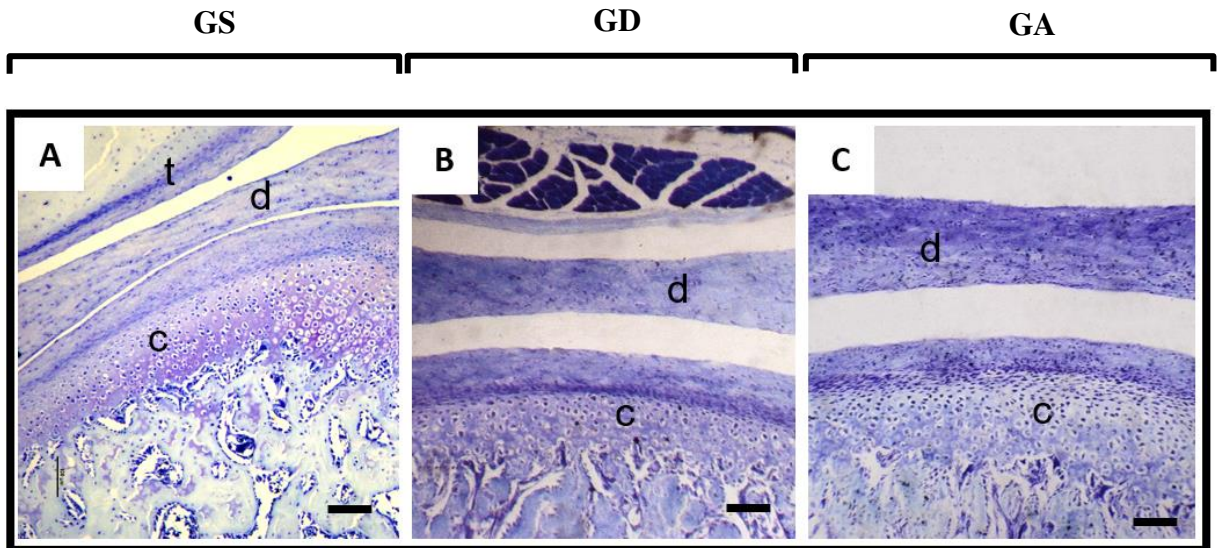


**Figura 12: Imagens histológicas da ATM. Coloração em Picrosirius.** A: grupo controle saudável (GS). B: grupo contralateral não-inflamado (GD). C: grupo artrite (GA). (c): côndilo mandibular. (d): disco articular. (t): Osso temporal. N=5 animais. (Objetiva de 4X. Barra de Escala = 100  $\mu$ m). Áreas com coloração avermelhada indicam maior empacotamento das fibras colágenas. Áreas esverdeadas indicam desorganização das fibras colágenas

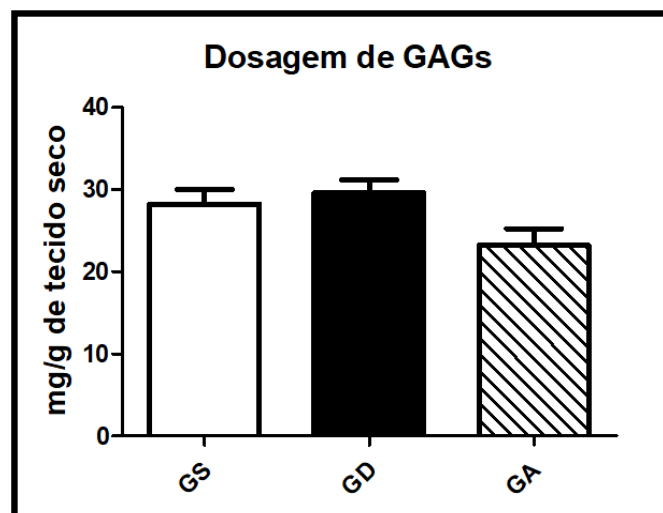
### 5.1.3 Coloração com Azul de Toluidina (AT) e Dosagem de Glicosaminoglicanos Sulfatados (GAGs)

Imagens representativas de cada grupo das ATMs coradas em AT estão organizadas na Figura 13. Observa-se que o GS exibiu maior metacromasia na cartilagem articular da ATM, sugerindo elevada concentração de proteoglicanos na matriz extracelular. O GD e GA apresentaram menor metacromasia na cartilagem articular em comparação ao GS, o que sugere perda de proteoglicanos. No disco articular não foram observadas mudanças evidentes em relação a metacromasia nas três regiões do disco articular (anterior, média e posterior).

Conforme se observa na Figura 14, a dosagem de GAGs, pelo método do DMMB, nos tecidos da ATM, incluindo disco articular, tecido retrodiscal e parte da cápsula articular, não revelou diferença estatisticamente significativa, entre os grupos analisados, condizente com os achados nos cortes corados com AT.



**Figura 13: Imagens histológicas da ATM. Coloração com Azul de toluidina (AT).** A: grupo controle saudável (GS). B: grupo contralateral não-inflamado (GD). C: grupo artrite (GA). (c): côndilo mandibular. (d): disco articular. (t): Osso temporal. N=5 animais. (Objetiva de 10X. Barra de Escala = 100  $\mu$ m). Metacromasia: áreas de coloração com nuance de roxo à violeta, indicando maior quantidade de proteoglicanos na matriz extracelular.



**Figura 14: Concentração de GAGs (mg/g de tecido seco) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo contralateral não-inflamado (GD) e grupo artrite (GA). N=5 animais.

#### **5.1.4 Morfometria dos músculos mastigatórios**

A área e o diâmetro das fibras dos quatro músculos mastigatórios foram quantificados e os dados representados na Tabela 1. Pode-se observar que o músculo masseter esquerdo dos animais com artrite (ATM esquerda), apresentou área e diâmetro das fibras musculares, estatisticamente maiores em comparação ao músculo masseter direito de animais do mesmo grupo. O masseter esquerdo dos animais com artrite também exibiu área e diâmetro das fibras estatisticamente mais elevados em comparação ao masseter esquerdo de animais saudáveis. Por outro lado, o músculo temporal direito nos animais com artrite apresentou significativa redução da área e diâmetro das fibras musculares em comparação ao temporal direito dos animais saudáveis. O músculo pterigóideo medial esquerdo, nos animais com artrite, apresentou, estatisticamente menor área e diâmetro das fibras, em comparação ao pterigóideo medial esquerdo nos animais saudáveis. Já o músculo pterigóideo lateral esquerdo e direito, nos animais com artrite, apresentou significativa redução da área e diâmetro das fibras musculares, em comparação ao mesmo músculo de ambos os lados nos animais saudáveis.

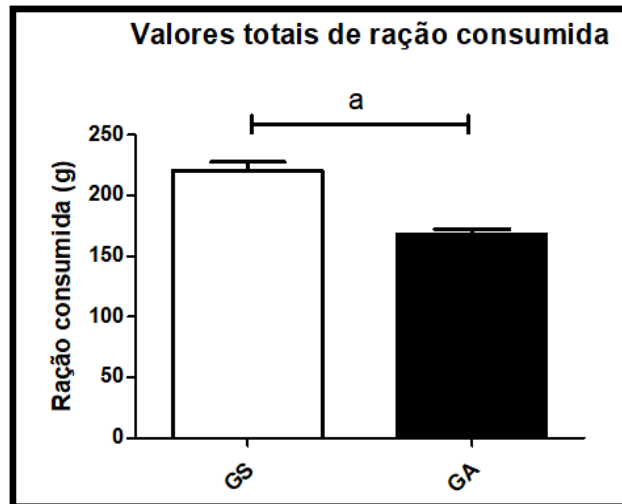
**Tabela 1: Área ( $\mu\text{m}^2$ ) e diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) das fibras dos músculos masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral**

Masseter				
	Área (média $\pm$ EP)		Diâmetro (média $\pm$ EP)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Saudável	527,1 $\pm$ 14,14	518,1 $\pm$ 28,4	33,23 $\pm$ 0,45	33,02 $\pm$ 0,89
Artrite	667,6 $\pm$ 33,79 <sup>a,b</sup>	560,3 $\pm$ 13,81	38,27 $\pm$ 0,87 <sup>a,b</sup>	34,61 $\pm$ 0,61
Temporal				
	Área (média $\pm$ EP)		Diâmetro (média $\pm$ EP)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Saudável	1161 $\pm$ 33,96	1135 $\pm$ 33,73	51 $\pm$ 0,92	49,99 $\pm$ 0,74
Artrite	1019 $\pm$ 72,53	899,6 $\pm$ 36,53 <sup>a</sup>	47,15 $\pm$ 2,06	45,54 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
Pterigóideo medial				
	Área (média $\pm$ EP)		Diâmetro (média $\pm$ EP)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Saudável	781,5 $\pm$ 51,21	699,3 $\pm$ 45,89	41,78 $\pm$ 1,61	39,07 $\pm$ 1,26
Artrite	617,5 $\pm$ 31,89 <sup>a</sup>	614,5 $\pm$ 26,49	37,42 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	37,37 $\pm$ 0,84
Pterigóideo lateral				
	Área (média $\pm$ EP)		Diâmetro (média $\pm$ EP)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Saudável	637,7 $\pm$ 49,02	592,1 $\pm$ 41,3	36,89 $\pm$ 1,53	36,04 $\pm$ 1,28
Artrite	338 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>	359,1 $\pm$ 14,31 <sup>a</sup>	28,1 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	28,41 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>

(a) Diferença significativa em relação aos músculos de animais saudáveis ( $P < 0,05$ ), teste t não-pareado. (b) Diferença significativa em relação ao músculo contralateral – mesmo animal ( $P < 0,05$ ), teste t pareado. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

### 5.1.5 Consumo de Ração

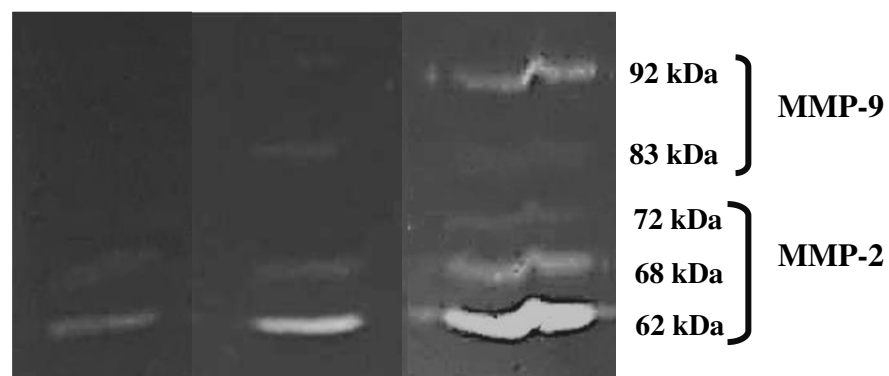
As médias do consumo de ração (gramas), durante três semanas de avaliação, estão representadas na Figura 15. Pode-se observar que os animais de GS exibiram maior média de consumo de ração em comparação aos animais com artrite induzida na ATM esquerda, sendo esta diferença estatisticamente significativa.



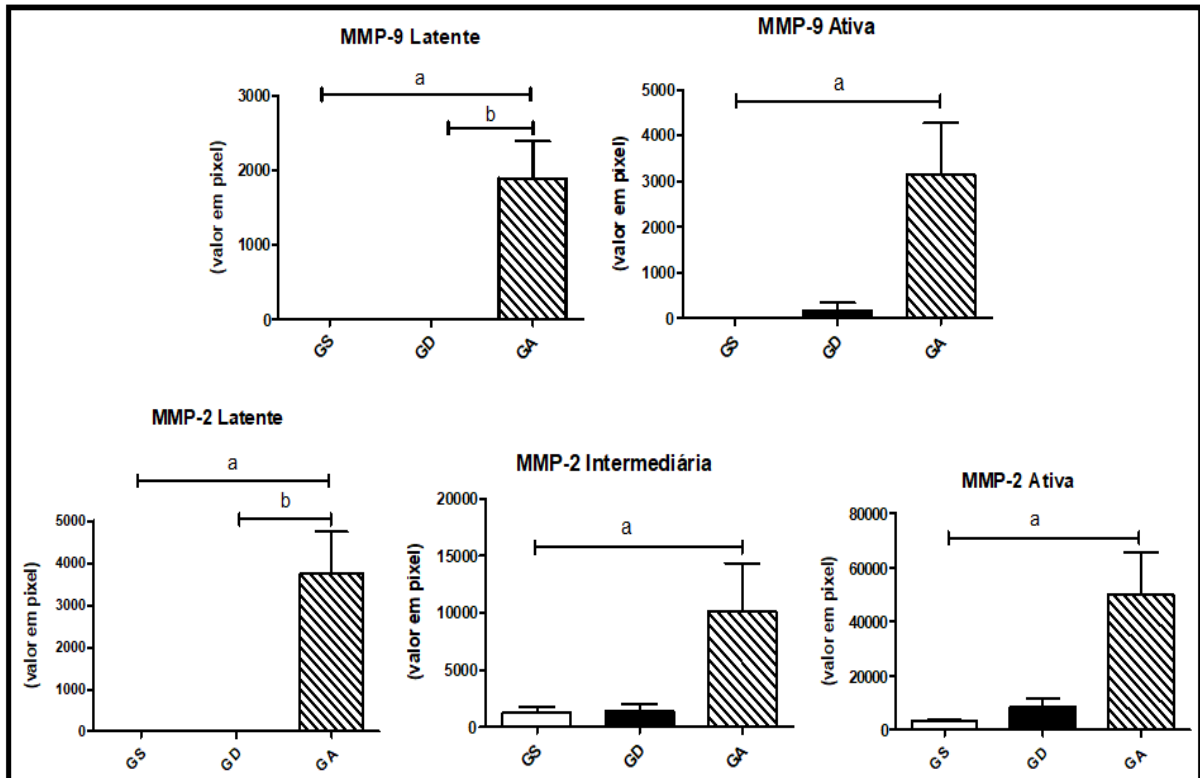
**Figura 15: Quantidade de ração consumida (g) nos diferentes grupos experimentais. Média de três semanas de avaliação.** Grupo controle saudável (GS) e grupo artrite (GA). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste t não-pareado. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

#### 5.1.6 Atividade das Metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9)

Conforme se observa nas Figuras 16 e 17, a isoforma ativa da MMP-9 foi detectada no GD e no GA, mas ausente em GS. MMP-9 latente e MMP-2 latente foram detectadas apenas no GA. A densitometria das bandas revelou que GA exibiu atividade estatisticamente maior da MMP-9 ativa e das isoformas intermediária e ativa da MMMP-2 em comparação ao GS, mas não em relação ao GD (Figura 17).



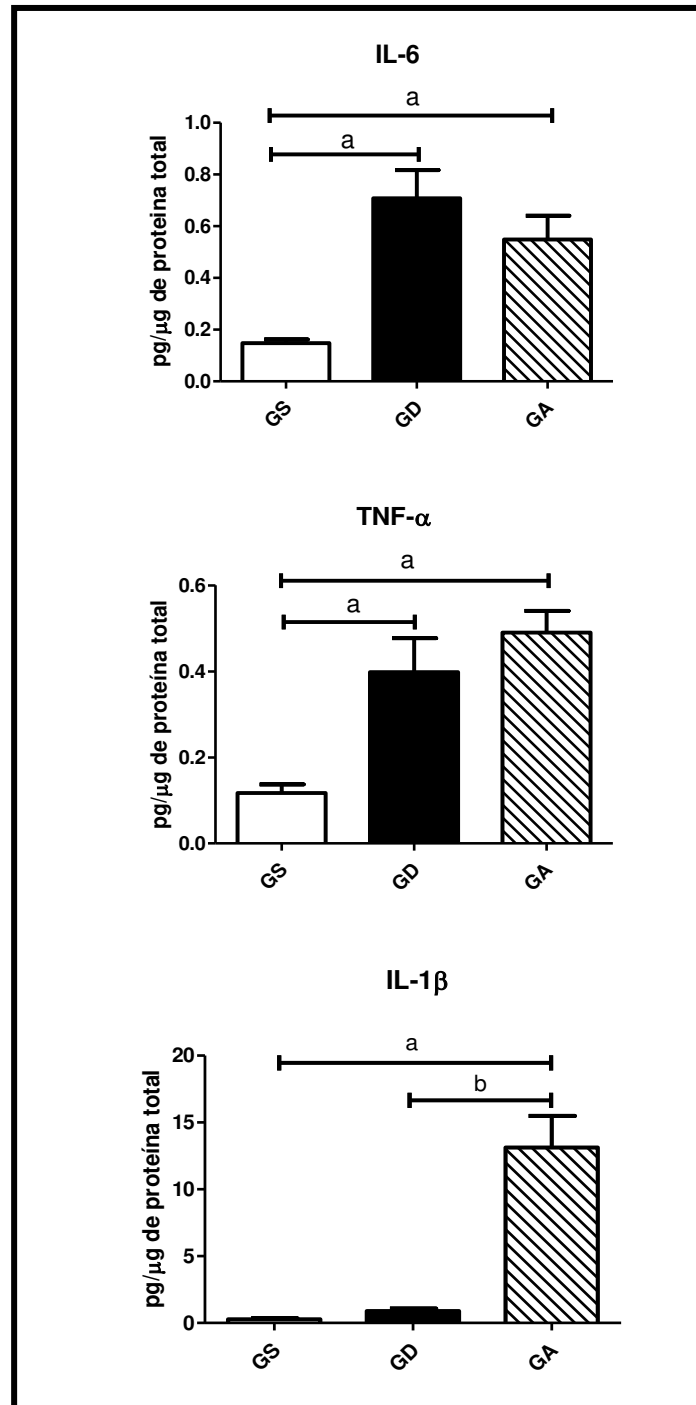
**Figura 16: Zimografia das metaloproteinases nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo contralateral não-inflamado (GD) e grupo artrite (GA). Isoformas latente (92 kDa) e ativa (83 kDa) da MMP-9 e isoformas latente (72 kDa), intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) da MMP-2



**Figura 17:** Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondente às isoformas da MMP-9 (Ativa e Latente) e MMP-2 (Latente, Intermediária e Ativa) nos diferentes grupos experimentais. Grupo controle saudável (GS), grupo contralateral não-inflamado (GD) e grupo artrite (GA). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste t pareado. Média e EP (erro padrão). N=5 animais

### 5.1.7 Concentração de Citocinas Pró-inflamatórias

As concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , nos tecidos da ATM, foram determinadas por meio de ELISA e as médias dos grupos experimentais, representadas na Figura 18. Pode-se observar que as concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  foram estatisticamente superiores no GD, em comparação ao GS. GA exibiu concentrações estatisticamente elevadas nas citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , em comparação ao GS. GA também apresentou concentração da IL-1 $\beta$  estatisticamente maior em comparação ao GD.



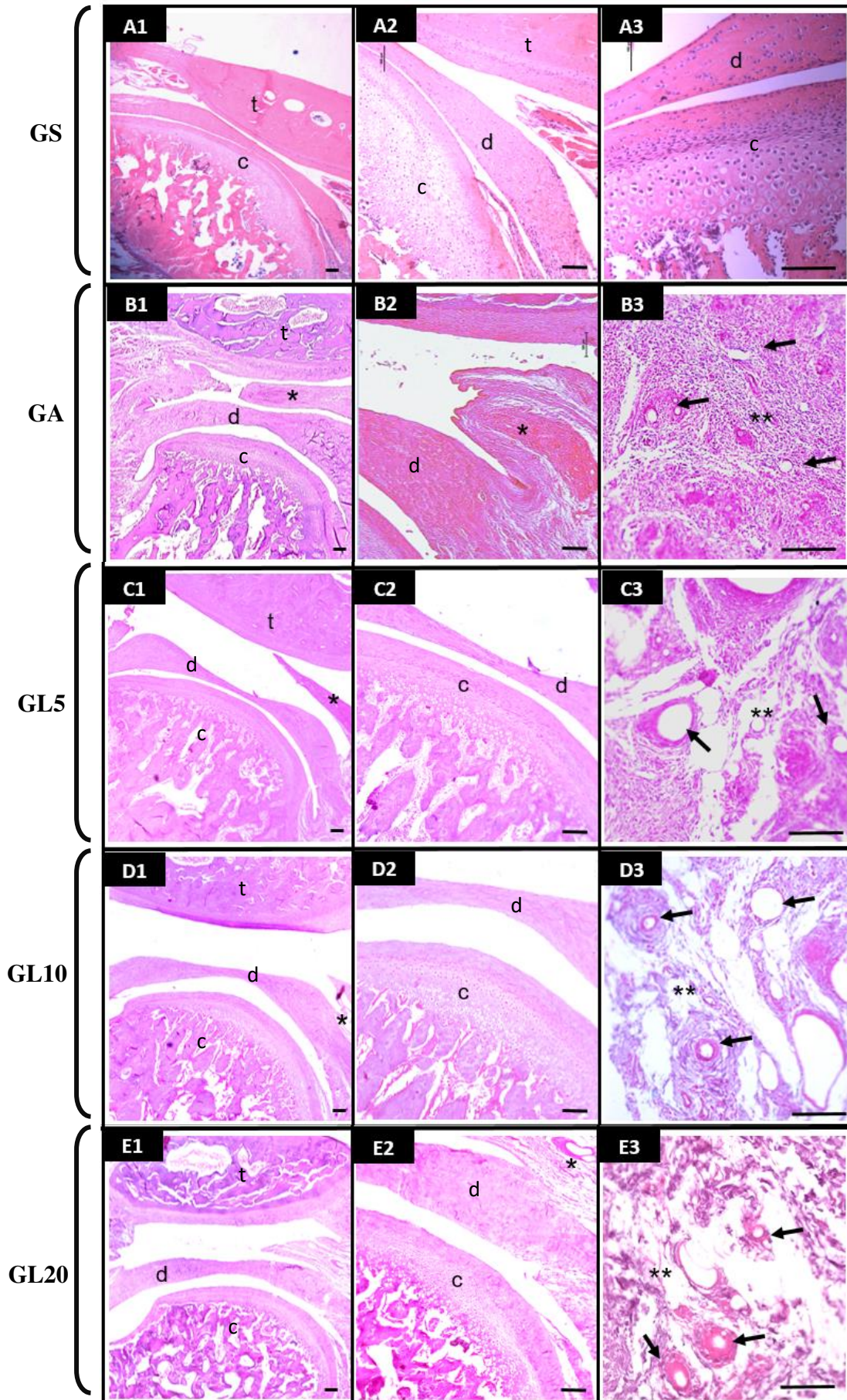
**Figura 18: Concentração de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (pg/ $\mu$ g de proteínas totais) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo contralateral não-inflamado (GD) e grupo artrite (GA). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), teste t pareado. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

## 5.2 Capítulo 2 - Atividade Fotobioestimuladora de Dosagens Diferenciadas de LBP sobre a Artrite Induzida na ATM e Músculos Mastigatórios

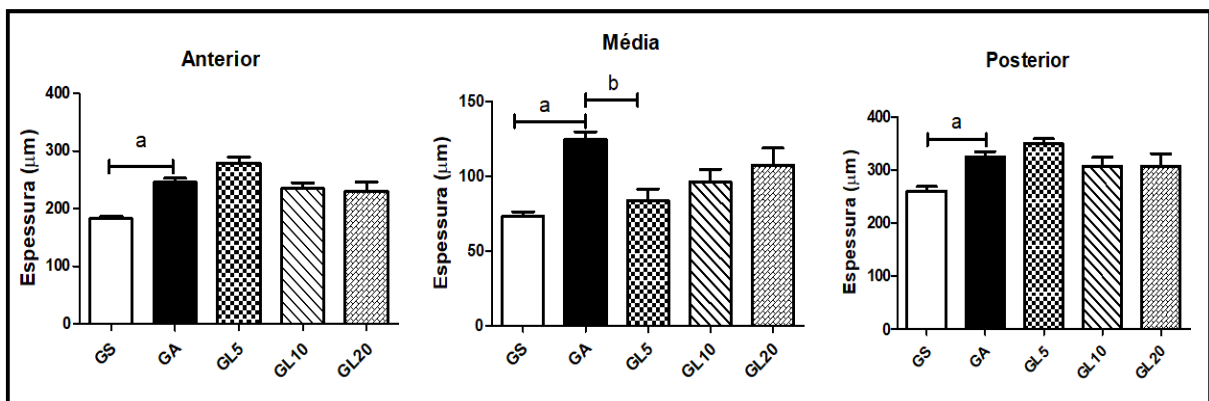
### 5.2.1 Análise Morfológica e Histomorfométrica

As ATMs foram coradas com HE e as imagens representativas, de cada grupo, organizadas na Figura 19. Pode-se observar que os animais tratados com LBP, independente da dose, exibiram alterações morfológicas na ATM em menor intensidade quando comparadas às observadas no GA. Podem ser identificados, nos grupos tratados com laser, a presença de hiperplasia da membrana sinovial, com invasão do espaço articular, sem, no entanto, a formação de *pannus* e, presença de infiltrado inflamatório crônico, constituído por células mononucleares no tecido subsinovial. A análise histomorfométrica demonstrou que, apenas os animais tratados com laser na dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  (GL5), sofreram redução estatística, na espessura da parte média do disco articular, em comparação ao GA (Figura 20). Os tratamentos com LBP não alteram significativamente a espessura da cartilagem articular, em comparação ao GA (Figura 21).

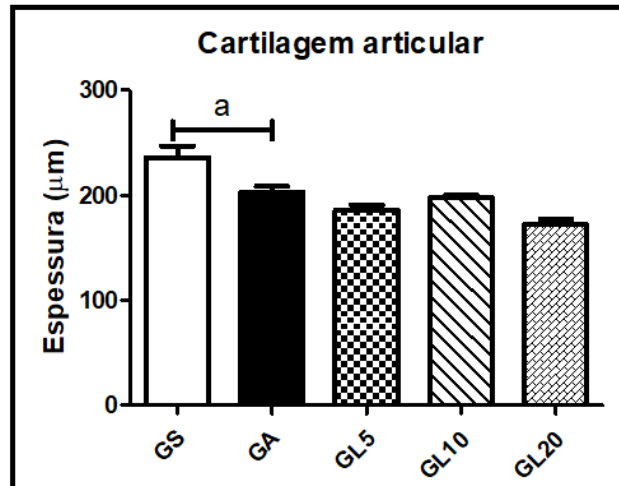




**Figura 19: Imagens histológicas da ATM. Coloração com HE.** A1-3: grupo controle saudável (GS). Objetiva de 4X, 10X e 20X, respectivamente. B1-3: grupo controle artrite (GA). Objetiva de 4X, 10X e 20X, respectivamente. C1-3: Grupo laser 5J/cm<sup>2</sup> (GL5). D1-3: Grupo laser 10J/cm<sup>2</sup> (GL10). Objetiva de 4X, 10X e 20X, respectivamente. E1-3: Grupo laser 20J/cm<sup>2</sup> (GL20). Objetiva de 4X, 10X e 20X, respectivamente. (c): cêndilo mandibular. (d): disco articular. (t) osso temporal. (\*): proliferação da membrana sinovial. (\*\*): infiltrado inflamatório crônico. (Setas): vasos sanguíneos. N=5 animais. (Barra de Escala = 100 µm).



**Figura 20: Morfometria das regiões anterior, média e posterior do disco articular (espessura em µm) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser 5J/cm<sup>2</sup> (GL5), grupo laser 10J/cm<sup>2</sup> (GL10), grupo laser 20J/cm<sup>2</sup> (GL20). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GS e GA. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GA e os grupos tratados com laser. Teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.



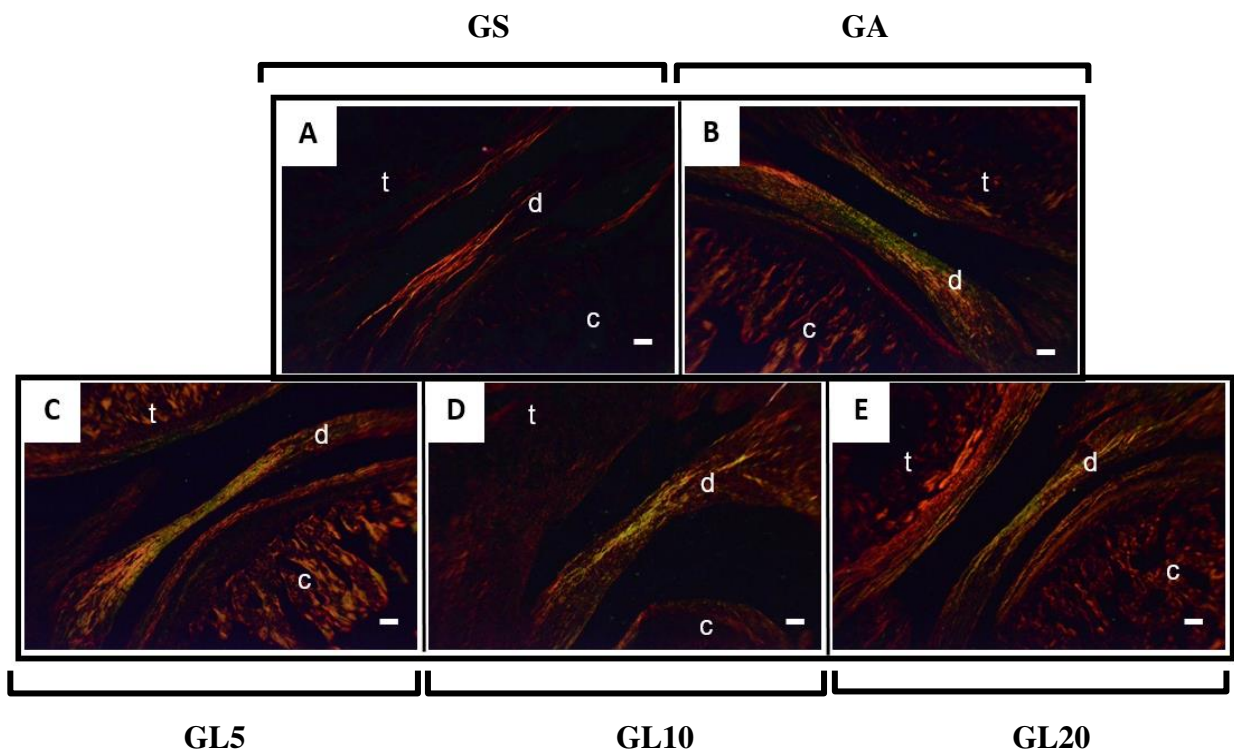
**Figura 21: Morfometria da cartilagem (espessura em  $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos experimentais. Média total da espessura.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser  $5\text{J}/\text{cm}^2$  (GL5), grupo laser  $10\text{J}/\text{cm}^2$  (GL10), grupo laser  $20\text{J}/\text{cm}^2$  (GL20). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GS e GA. Teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

## 5.2.2 Coloração com Picrosirius - Organização e Compactação das Fibras

### Colágenas

Nos cortes da ATM, corados com Picrosirius e examinados em microscópio de luz polarizada, pode-se observar que, em animais tratados com de LBP nas doses de 5, 10 ou  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , a coloração do disco apresentou-se mais amarelada. Essa característica indica uma melhor organização e empacotamento de fibras, comparativamente ao GA, o qual exibiu maior predominância de coloração esverdeada, sugerindo maior desorganização da matriz extracelular (Figura 22). Entre os grupos tratados com LBP, pode-se observar que GL20 apresentou maior brilho (birrefringência), o que indica maior organização da matriz colagenosa. O grupo GS apresentou brilho predominantemente avermelhado, o qual refletiu maior grau de empacotamento e organização da rede de fibras colágenas (Figura 22).





**Figura 22: Imagens histológicas da ATM. Coloração em Picrosirius.** A: grupo controle saudável (GS). B: grupo controle artrite (GA). C: Grupo laser  $5\text{J}/\text{cm}^2$  (GL5). D: Grupo laser  $10\text{J}/\text{cm}^2$  (GL10). E: Grupo laser  $20\text{J}/\text{cm}^2$  (GL20). (c): côndilo mandibular. (d): disco articular. (t): Osso temporal. N=5 animais. (Objetiva de 4X. Barra de Escala =  $100\ \mu\text{m}$ ). Áreas com coloração avermelhada indicam maior empacotamento das fibras colágenas. Áreas esverdeadas indicam desorganização das fibras colágenas.

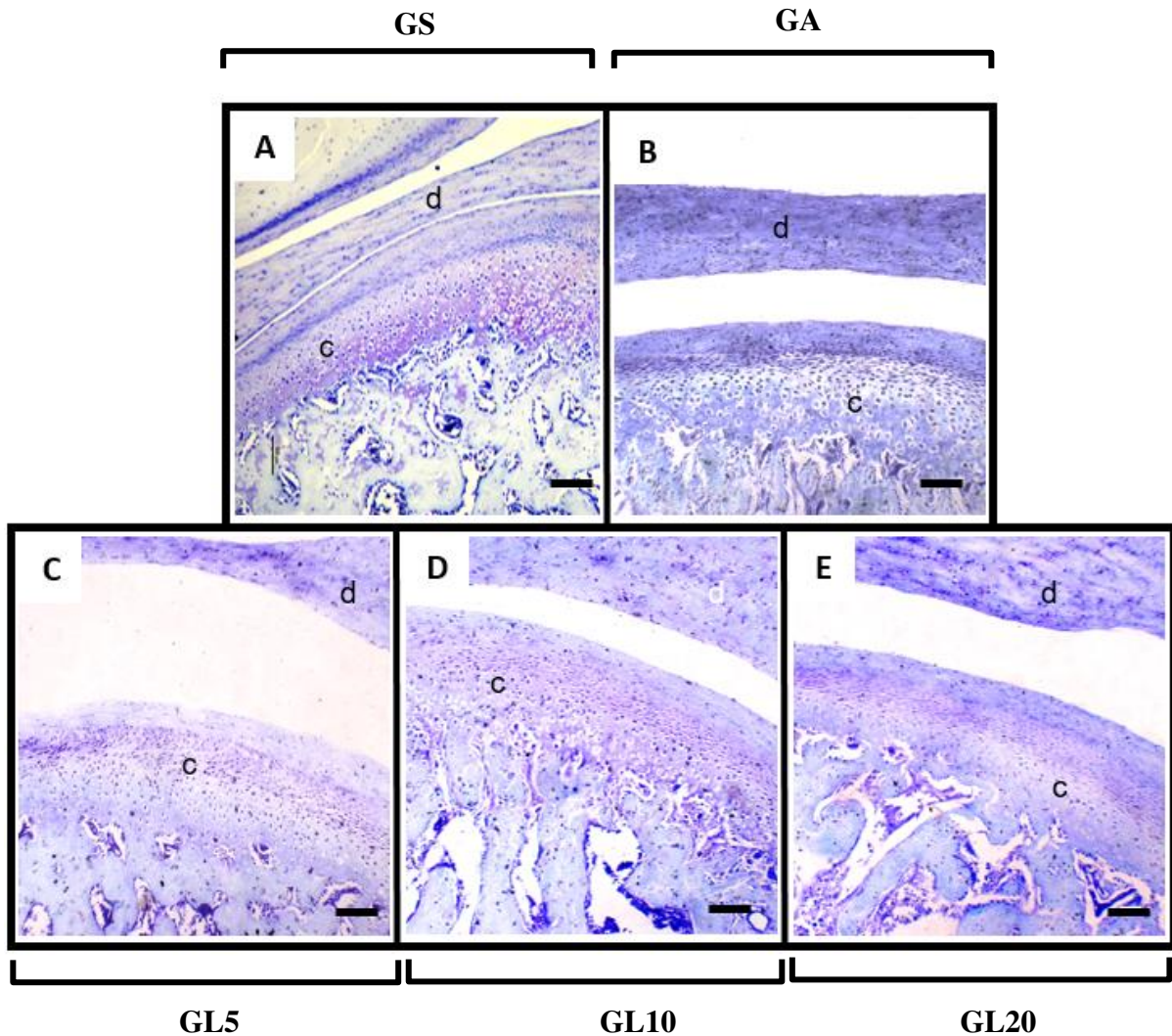
### 5.2.3 Coloração com Azul de Toluidina (AT) e Dosagem de Glicosaminoglicanos Sulfatados (GAGs)

As ATMs foram coradas em AT e as imagens representativas de cada grupo são apresentadas na Figura 23. Pode-se observar que todos os grupos tratados com LBP apresentaram maior metacromasia na cartilagem articular, o que sugere maior quantidade de proteoglicanos na matriz extracelular em comparação ao GA. Entre os grupos tratados com LBP, uma maior metacromasia foi observada no GL10.

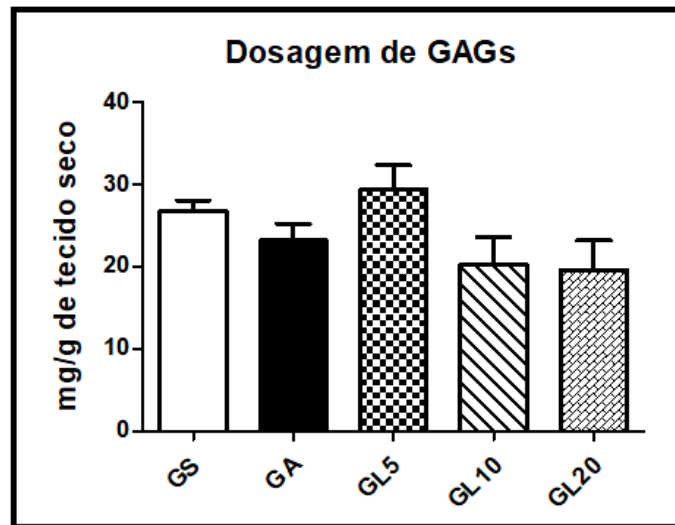
O grupo GS exibiu maior metacromasia na cartilagem articular quando comparado aos demais grupos, o que evidenciou elevada quantidade de proteoglicanos na MEC desta cartilagem.

No disco articular não foram observadas diferenças nítidas em relação a metacromasia, nos diferentes grupos experimentais.

Em relação a dosagem de GAGs nos tecidos da ATM (disco articular, tecido retrodiscal e parte da cápsula articular), pode-se observar na Figura 24 que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.



**Figura 23: Imagens histológicas da ATM. Coloração com Azul de toluidina (AT).** A: grupo controle saudável (GS). B: grupo controle artrite (GA). C: Grupo laser 5 J/cm<sup>2</sup> (GL5). D: Grupo laser 10 J/cm<sup>2</sup> (GL10). E: Grupo laser 20 J/cm<sup>2</sup> (GL20). (c): côndilo mandibular. (d): disco articular. (t): Osso temporal. N=5 animais. (Objetiva de 10X. Barra de Escala = 100 µm). Metacromasia: áreas de coloração com nuance de roxo à violeta, indicando maior quantidade de proteoglicanos na matriz extracelular.

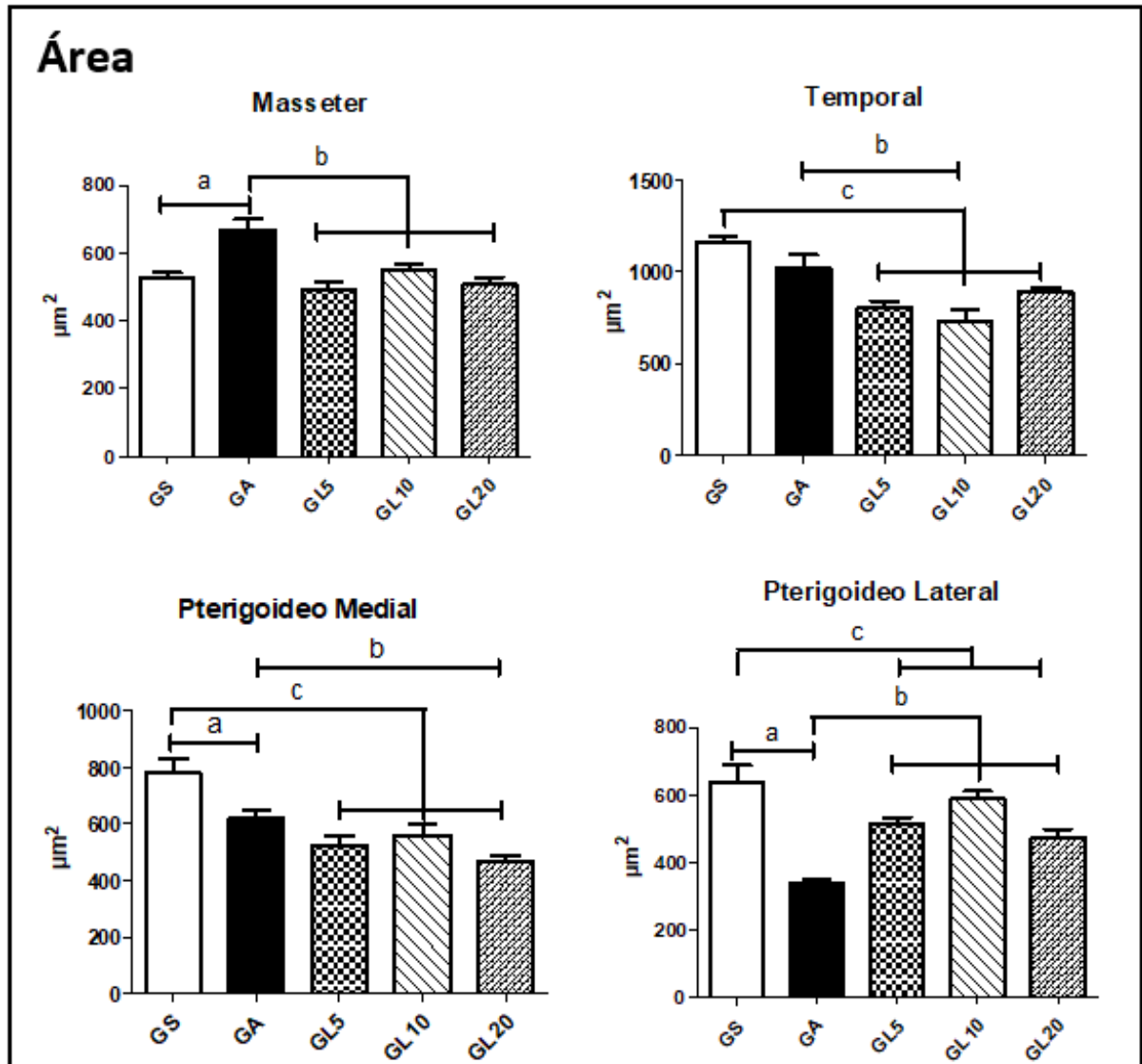


**Figura 24: Concentração de GAGs (mg/g de tecido seco) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser 5 J/cm<sup>2</sup> (GL5), grupo laser 10 J/cm<sup>2</sup> (GL10) e grupo laser 20 J/cm<sup>2</sup> (GL20). N=5 animais.

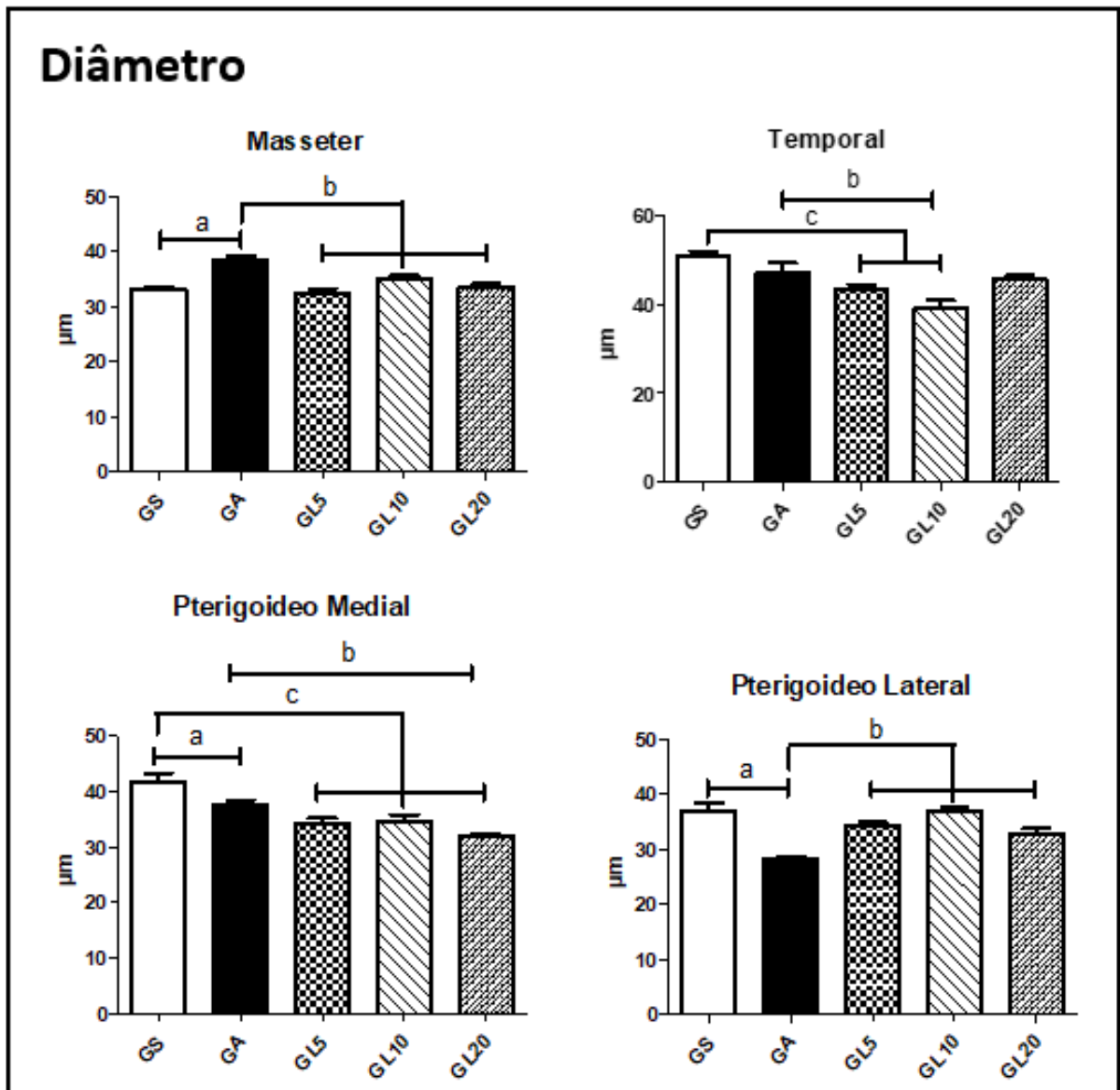
#### 5.2.4 Morfometria dos músculos mastigatórios

A área e o diâmetro das fibras dos quatro músculos mastigatórios estudados, foram quantificados e os dados apresentados nas Figuras 25 e 26, respectivamente. Observa-se que a área e o diâmetro das fibras do músculo masseter esquerdo dos animais tratados com LBP foram estatisticamente menores em comparação ao masseter esquerdo de animais com artrite induzida. Não foi observada diferença estatística significativa ao compararmos os grupos tratados com laser entre si. Os tratamentos com LBP não promoveram efeitos positivos sobre a área de diâmetro das fibras dos músculos temporal e pterigóideo medial esquerdos.

No músculo pterigóideo lateral esquerdo, pode-se observar que todos os tratamentos com LBP promoveram significativo aumento da área e diâmetro das fibras musculares em comparação ao mesmo músculo nos animais com artrite induzida. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos tratados com LBP ao serem comparados entre si.



**Figura 25: Área das fibras ( $\mu\text{m}^2$ ) dos músculos masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  (GL5), grupo laser 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  (GL10) e grupo laser 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  (GL20). Apenas os músculos esquerdos foram avaliados. (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos saudável e artrite. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos artrite e tratados com laser. (c) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos saudável e tratados com laser. Teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão).  $N=5$  animais.

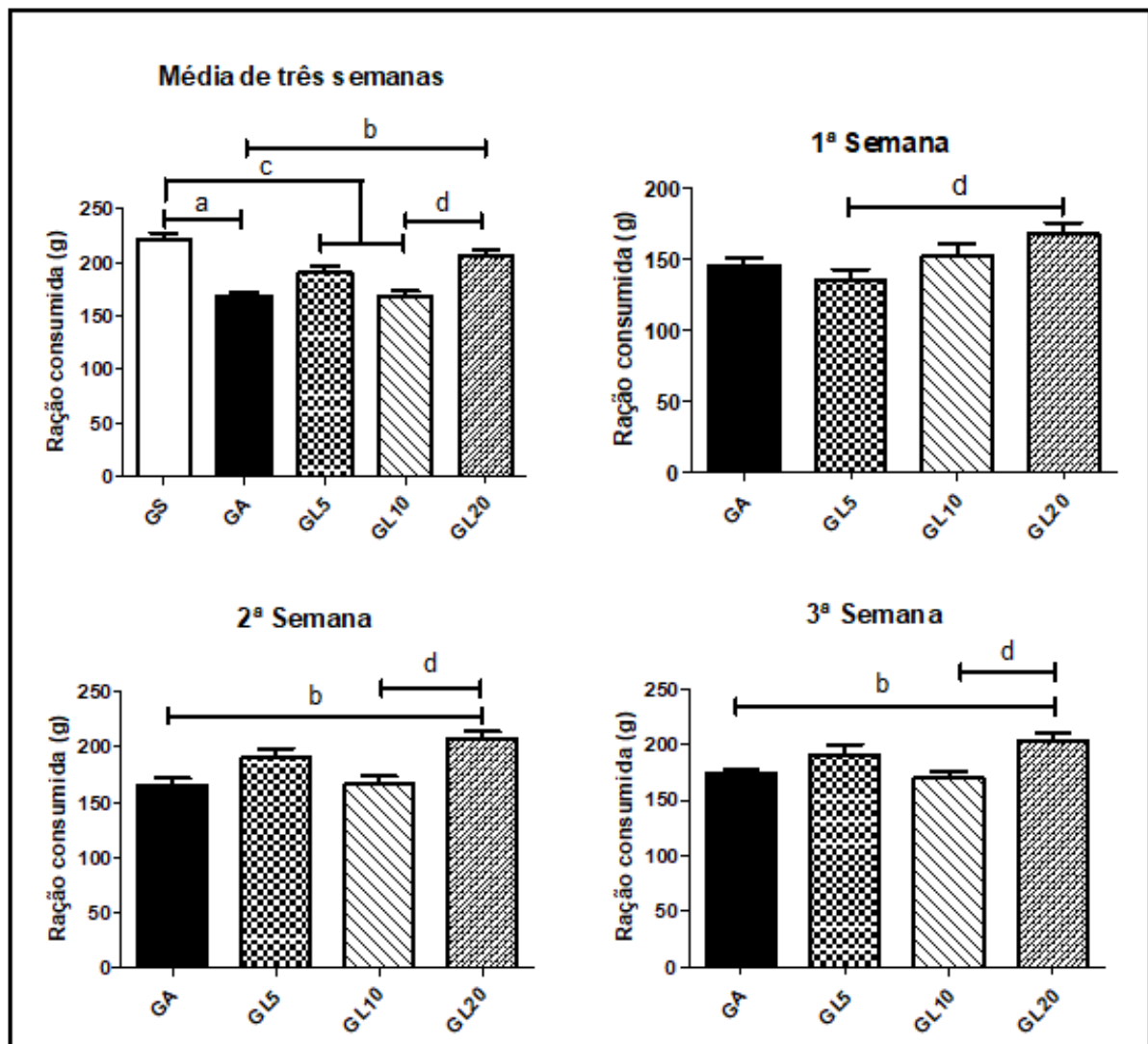


**Figura 26: Diâmetro das fibras ( $\mu\text{m}$ ) dos músculos masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser  $5 \text{ J/cm}^2$  (GL5), grupo laser  $10 \text{ J/cm}^2$  (GL10) e grupo laser  $20 \text{ J/cm}^2$  (GL20). Apenas os músculos esquerdos foram avaliados. (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos saudável e artrite. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos artrite e tratados com laser. (c) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos saudável e tratados com laser. Teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão).  $N=5$  animais.



### 5.2.5 Consumo de Ração

As médias do consumo de ração (gramas), durante três semanas de avaliação, estão representadas na Figura 27. Pode-se observar que os grupos GA e tratados com LBP (GL5 e GL10) apresentaram significativa redução do consumo médio de ração, em comparação ao GS. Os grupos tratados com LBP apresentaram aumento do consumo de ração em comparação ao GA; contudo, diferença estatisticamente significativa foi observada apenas para o GL20. Neste grupo, um aumento significativo no consumo de ração foi observado apenas a partir da segunda semana de avaliação. GL20 também apresentou consumo de ração estatisticamente maior em comparação ao GL5 (primeira semana) e GL10 (média das três semanas; segunda e terceira semana).



**Figura 27: Quantidade de ração consumida (g) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser 5 J/cm<sup>2</sup> (GL5), grupo

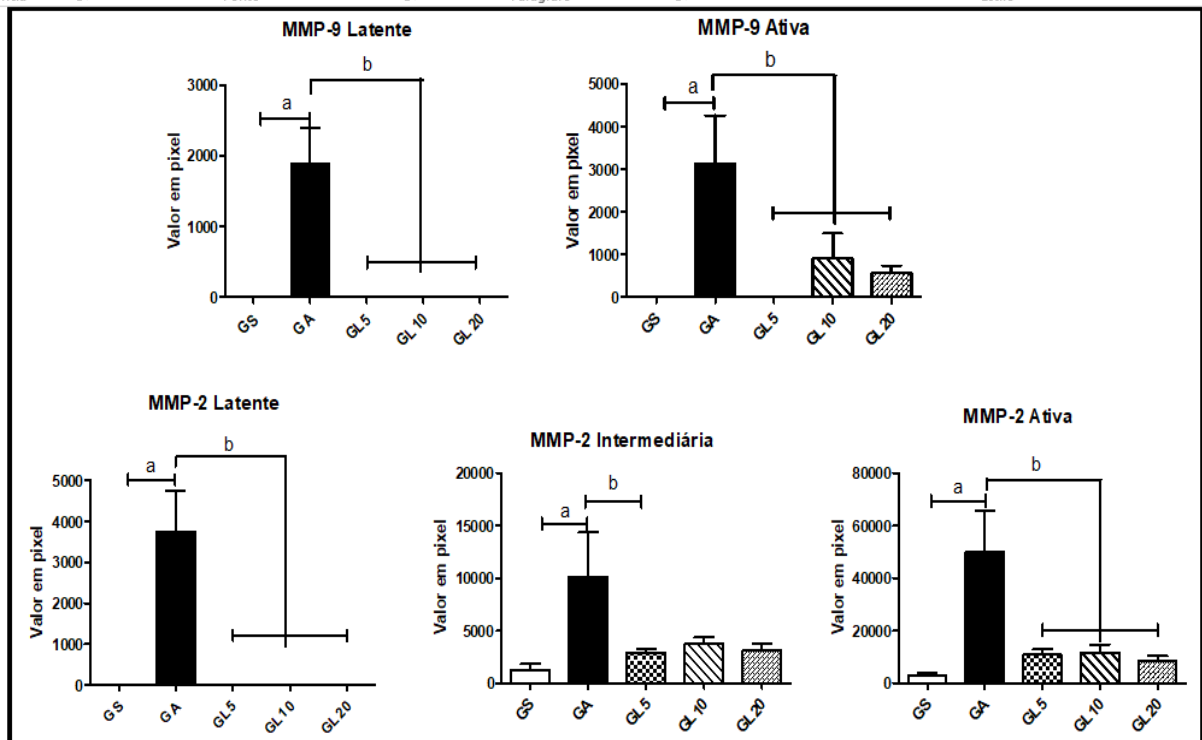
laser 10 J/cm<sup>2</sup> (GL10) e grupo laser 20 J/cm<sup>2</sup> (GL20). (a) Diferença significativa (p<0,05) entre GS e GA. (b) Diferença significativa (p<0,05) entre GA e os grupos tratados com laser. (c) Diferença significativa (p<0,05) entre GS e os grupos tratados com laser. (d) Diferença significativa (p<0,05) entre os grupos tratados com LBP. Teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

### 5.2.6 Atividade das Metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9)

Conforme observa-se nas Figuras 28 e 29, O grupo GA exibiu atividade estatisticamente maior, em todas as isoformas da MMP-9 e MMP-2 em comparação ao GS. Os grupos tratados com distintas doses de LBP reduziram significativamente a atividade das isoformas ativa e latente da MMP-9 e MMP-2, em comparação ao GA. Contudo, apenas GL5 reduziu estatisticamente a atividade da isoforma intermediária da MMP-2. Não foi observada diferença estatística significativa em relação as isoformas da MMP-2 e MMP-9 ao compararmos os grupos tratados com laser entre si.



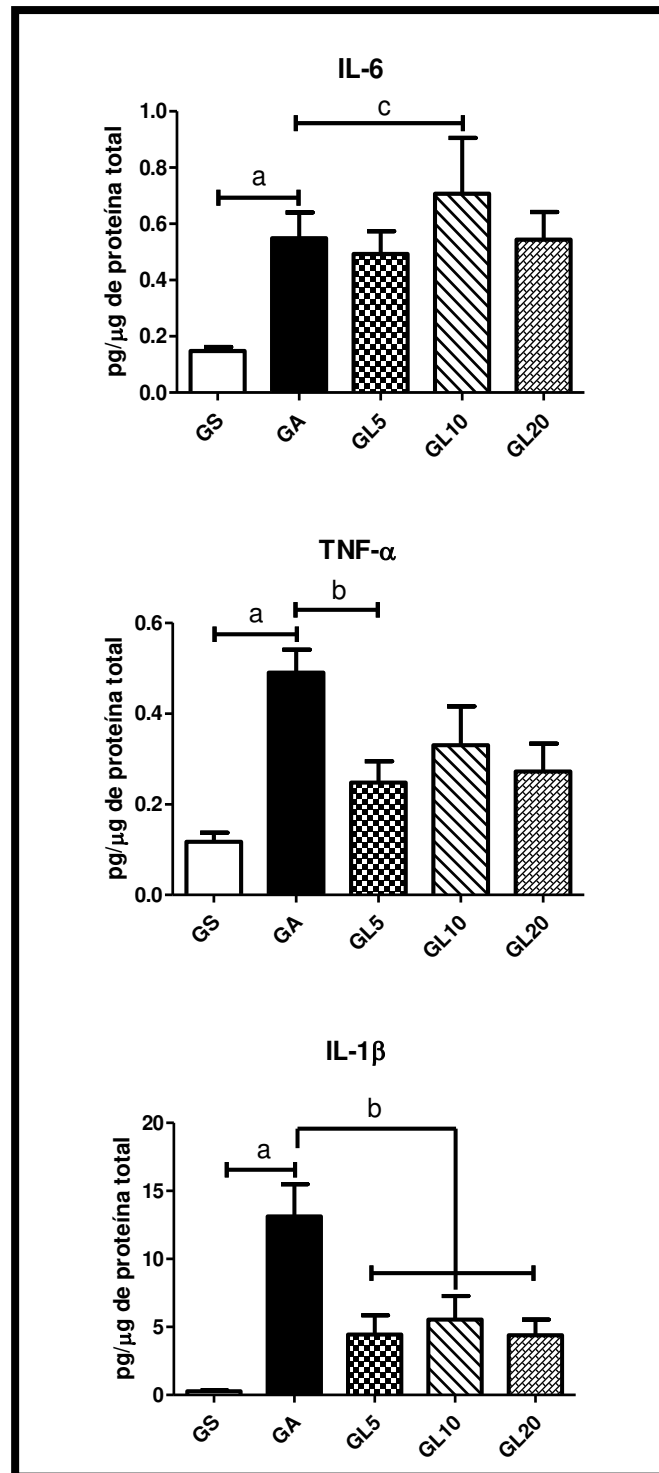
**Figura 28: Zimografia das metaloproteinases nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser 5 J/cm<sup>2</sup> (GL5), grupo laser 10 J/cm<sup>2</sup> (GL10) e grupo laser 20 J/cm<sup>2</sup> (GL20). Isoformas latente (92 KDa) e ativa (83 KDa) da MMP-9 e isoformas latente (72 KDa), intermediária (68 KDa) e ativa (62 KDa) da MMP-2.



**Figura 29: Densitometria das bandas (valor em pixel) correspondente às isoformas da MMP-9 (Ativa e Latente) e MMP-2 (Latente, Intermediária e Ativa) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser 5 J/cm<sup>2</sup> (GL5), grupo laser 10 J/cm<sup>2</sup> (GL10) e grupo laser 20 J/cm<sup>2</sup> (GL20). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GS e GA. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GA e os grupos tratados com laser. Teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

### 5.2.7 Concentração de Citocinas Pró-inflamatórias

A Figura 30 apresenta, respectivamente, as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos tecidos da ATM. Pode-se observar que GA apresentou concentração estatisticamente maior nas três citocinas analisadas, em comparação ao GS. Em GL5, observa-se redução estatística significativa de TNF- $\alpha$  em comparação ao GA. Todos os tratamentos com LBP reduziram significativamente a concentração de IL-1 $\beta$ , em comparação ao GA. Contudo, não foi observada diferença estatística significativa ao compararmos os grupos tratados com laser entre si.



**Figura 30: Concentração de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (pg/ $\mu$ g de proteínas totais) nos diferentes grupos experimentais.** Grupo controle saudável (GS), grupo controle artrite (GA), grupo laser 5 J/cm<sup>2</sup> (GL5), grupo laser 10 J/cm<sup>2</sup> (GL10) e grupo laser 20 J/cm<sup>2</sup> (GL20). (a) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GS e GA. (b) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GA e os grupos tratados com laser. (c) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre GS e os grupos tratados com laser. Teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Média e EP (erro padrão). N=5 animais.

## 6 DISCUSSÃO

Assim como nos resultados, a discussão foi dividida em dois capítulos, baseados nos objetivos propostos:

- Capítulo 1: Modelo Experimental de Artrite da Articulação Temporomandibular: Efeitos sobre a Articulação Contralateral e Músculos Mastigatórios
- Capítulo 2: Atividade Fotobioestimuladora de Dosagens Diferenciadas de LBP sobre a Artrite Induzida na ATM e Músculos Mastigatórios

## **6.1 Capítulo 1: Modelo Experimental de Artrite da Articulação Temporomandibular: Efeitos sobre a Articulação Contralateral e Músculos Mastigatórios**

### **6.1.1 Morfologia e morfometria da ATM**

O desenvolvimento e aprimoramento de modelos experimentais de inflamação da ATM, são fundamentais para uma melhor compreensão dos mecanismos morfológicos, biológicos e moleculares de patologias como a artrite reumatóide, osteoartrite e outros distúrbios com componente inflamatório, que afetam esta articulação.

Nossos resultados indicaram que uma única injeção intra-articular de CFA na ATM esquerda foi capaz de induzir um processo inflamatório crônico no período de 27 dias após injeção. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios, os quais demonstraram maior eficácia do CFA frente a outros agentes irritantes ao induzir inflamação persistente em períodos de tempo variados (SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; WANG et al., 2012; LEMOS et al., 2015; XU et al., 2016; LEMOS et al., 2016; WANG et al., 2017).

A análise morfológica das ATMs com injeção intra-articular de CFA (GA), demonstrou acentuada alteração morfológica. Dentre essas alterações estão incluídas hiperplasia da membrana sinovial, presença de intenso infiltrado inflamatório crônico e proliferação vascular no tecido subsinovial. Os dados histomorfométricos demonstraram ainda significativo aumento da espessura nas regiões anterior, média e posterior do disco articular e redução da espessura da cartilagem articular, em comparação aos animais do grupo controle saudável (GS). Resultados semelhantes foram demonstrados em estudos anteriores (WUANG et al., 2012; GEORGE et al., 2013; LEMOS et al., 2015; BI; DING; GAN, 2016; LEMOS et al., 2016; XU et al., 2016; XU et al., 2017).

Em concordância com os resultados aqui obtidos, estudos recentes, realizados em nosso laboratório, também demonstraram significativo aumento da espessura nas três regiões anatômicas do disco articular após injeção de CFA na ATM (LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). Resultado semelhante, também, foi descrito por Wang et al. (2012). Para estes autores a resposta hipertrófica do disco articular ocorreu devido ao aumento do conteúdo total de colágeno, sintetizado por fibroblastos e condrócitos, frente a agressão persistente causada pelo CFA.

Em relação a cartilagem articular, estudos anteriores corroboraram com nossos resultados, os quais demonstraram significativa redução da espessura da cartilagem articular após injeção de CFA (HAPER et al., 20001; KUROKI et al., 2011; XU et al., 2016; XU et al.,

2017), sendo a camada de cartilagem hialina/transitória e a camada hipertrófica as mais comprometidas (HAPER et al., 2001; XU et al., 2017).

Nos cortes sagitais da ATM corados com Picrosirius e analisados em microscópio de luz polarizada, pudemos observar no GA, menor brilho e predominância da coloração esverdeada no disco articular. Essa característica sugeriu maior desorganização da rede de fibras colágenas e degradação da matriz extracelular-MEC (VIDAL, MELLO, PIMENTEL, 1982; VIDAL, 2010) em comparação aos grupos GS e GC. Em concordância destes achados, foi demonstrado em estudos anteriores que a injeção intra-articular de CFA reduziu a birrefringência das fibras colágenas no disco articular, o que indicou menor grau de empacotamento e organização destas fibras (LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016).

A correlação entre os resultados anteriores aos dados atuais, sugeriu que o disco articular, submetido a uma inflamação persistente, responde inicialmente aumentando sua espessura de forma desordenada. As alterações na MEC associadas ao estresse mecânico podem, no entanto, superar a capacidade adaptativa dos tecidos da ATM, levando ao surgimento de alterações osteoartíticas e perfuração do disco articular (KURIBAYASH et al., 2008; TANAKA; DETAMORE; MERCURI, 2008; GHASSEMI-NEJAD et al., 2011; WANG et al., 2012).

Nos cortes corados em azul de toluidina (AT), observou-se coloração menos intensa e menor metacromasia na cartilagem articular de GA em comparação ao GS e ao GC, sugerindo menor concentração de proteoglicanos na MEC da cartilagem. Corroborando com os nossos resultados, Xu et al. (2016) e Xu et al. (2017), observaram significativa redução do conteúdo de proteoglicanos na cartilagem articular em cortes da ATM corados com AT e Safranina O. Esses mesmos autores, destacaram ainda uma significativa redução do número de condrócitos nesta cartilagem após injeção intra-articular de CFA.

A redução de proteoglicanos na cartilagem articular de GA pode ser responsável pela redução da espessura da cartilagem observado neste grupo, em comparação ao GS. Cada molécula de proteoglicano consiste de uma parte protéica central, da qual se irradiam numerosas cadeias laterais de glicosaminoglicanos (Condroitim-4-sulfatado, condroitim-6-sulfatado e queratam sulfatado), conforme salientaram Junqueira; Carneiro(2008). Estas moléculas são altamente hidratadas e atuam como um sistema amortecedor das pressões mecânicas incidentes sobre a cartilagem (DETAMORE et al., 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KALPAKCI et al., 2011).

Neste estudo, as ATMs direitas, contralaterais à articulação com inflamação induzida por CFA, constituíram o grupo GD. Nos cortes corados com HE as ATMs de GD exibiram

morfologia aparentemente normal, com ausência de infiltrado inflamatório crônico e hiperplasia sinovial. Resultado semelhante foi descrito em estudo prévio realizado em nosso laboratório (LEMOS et al., 2015). Corroborando com nossos resultados, Knudsen et al. (2015), não observaram diferenças quanto a presença de células inflamatórias, proliferação vascular e alterações na membrana sinovial ao compararem ATMs saudáveis com ATMs contralaterais à articulação afetada, em cortes histológicos corados com HE.

Nossas análises histomorfométricas, no entanto, revelaram significativo aumento da espessura do disco articular na região posterior de GD em comparação ao GS. Esta região está sujeita a maior força de tração durante os movimentos mandibulares, principalmente a protrusão e abertura oral (MADEIRA, 2008, OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008)

Nos cortes corados com Picrosirius e analisados em microscópio de luz polarizada, observou-se menor grau de empacotamento das fibras colágenas em comparação ao GS, o qual exibiu intenso brilho vermelho, sugerindo elevada organização/compactação destas fibras. GD também apresentou nos cortes corados com AT menor conteúdo de proteoglicanos na cartilagem articular quando comparado ao GS. Consistente com os nossos resultados, Guerra et al. (2010) demonstraram que a administração de toxina botulínica no músculo masseter esquerdo, provocou alterações estruturais no disco articular da ATM direita, incluindo redução do número de células, maior desorganização das fibras colágenas em cortes corados com Picrosirius e maior metacromasia em cortes corados com AT.

Nossos dados sugeriram que, a articulação contralateral, pode apresentar alterações morfológicas após indução de inflamação na ATM. Neste sentido, acreditamos que a presença de dor e inflamação na ATM esquerda devido à ação do CFA, pode alterar a dinâmica mastigatória do animal, causando sobrecarga funcional e alterações estruturais na ATM contralateral (KWAI et al., 2008; CHEN et al., 2009; GUERRA et al., 2010; SMYTH et al., 2015).

### **6.1.2 Morfometria das fibras musculares**

A análise da literatura sobre a avaliação dos músculos mastigatórios, após indução de inflamação na ATM, mostrou ser escassa ou praticamente nula, para que pudéssemos conflitar os resultados encontrados.

Entretanto, pudemos observar que à exceção do músculo masseter, não foram observadas diferenças significativas relacionadas a área e diâmetro das fibras entre os



músculos esquerdo e direito nos animais com inflamação induzida na ATM esquerda. Estes resultados estão relacionados a complexidade funcional destes músculos e da ATM, bem como a grande capacidade adaptativa dos componentes do aparelho estomatognático (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995; OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008; DE LEEUW, 2010).

O músculo masseter no lado esquerdo, local da inflamação, exibiu área e diâmetro das fibras, estatisticamente mais elevados em comparação ao músculo contralateral e aos músculos de animais saudáveis. Este músculo também exibiu a presença de um infiltrado de células inflamatórias crônicas e áreas de degeneração muscular (dados não mostrados). Acreditamos que durante a técnica de injeção do CFA, pode ocorrer extravasamento da droga para o masseter, já que a agulha atravessou completamente este músculo para alcançar a cápsula da ATM. Portanto, os resultados podem não indicar uma hipertrofia do masseter, mas ser resultado de uma mioosite local e edema. Contudo, mais estudos são necessários para melhor elucidar esta teoria.

Os músculos, temporal (lado direito), pterigóideo medial (lado esquerdo) e pterigóideo lateral (lado direito e esquerdo), nos animais com artrite induzida, apresentaram área e diâmetro das fibras musculares estatisticamente menores do que os músculos correspondentes em animais saudáveis. Estes resultados sugeriram que o músculo pterigóideo lateral é o mais afetado, o que está de acordo com a literatura atual (MOURA et al., 2017). O maior comprometimento deste músculo pode estar relacionado a seus aspectos anatômicos e funcionais, visto que é único músculo mastigatório diretamente relacionado a ATM, através da inserção de seu feixe superior no disco articular, e por participar de uma grande variedade de movimentos mandibulares, incluindo abertura bucal, protrusão e lateralidade (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010; MOURA et al., 2017).

A redução da área e diâmetro das fibras musculares, especialmente do músculo pterigóideo lateral, pode estar associada a uma baixa atividade funcional, constatada pelo menor consumo de ração, observada nos animais do grupo GA em comparação ao GS. Na sequência, foram discutidos dados relativos à alimentação animal e a avaliação bioquímica e molecular da ATM.

### **6.1.3 Consumo de ração**

Durante três semanas de avaliações, animais do grupo GA consumiram volume de ração significativamente menor quando comparado ao GS. Os resultados obtidos estão concordes com os trabalhos de Harper et al. (2001), Kramer et al. (2010), Bi; Ding e Gan, (2016) e Bi et al. (2017), que também descreveram redução significativa da quantidade de ração consumida pelos animais após inflamação na ATM, induzida através da injeção intra-articular de CFA.

De acordo com Kramer et al. (2010), o padrão de refeição do animal pode ser uma importante forma de avaliação funcional e nociceptiva, por longos períodos. Para estes autores, os animais com dor na ATM exibiram maior duração e menor frequência de refeições. Bi; Ding e Gan (2016), destacaram ainda uma associação negativa entre a ingestão de alimentos e a presença de inflamação/dor articular. Para estes autores, a redução do consumo de ração pode ser um forte indicativo de dor articular.

Considerando-se, em conjunto, os dados referentes a morfometria das fibras musculares e a alimentação, sugeriram que o CFA induziu uma inflamação articular persistente e associada à sintomas dolorosos, o que refletiu em menor consumo de ração e, consequente, redução na atividade funcional dos músculos mastigatórios, em especial o músculo pterigóideo lateral. Contudo, destacamos que, aspectos relativos à dor, precisam ser avaliados, em estudos posteriores, através de testes específicos, tais como o teste de formalina para hiperalgesia orofacial e o teste de Von Frey para alodinia mecânica.

### **6.1.4 Avaliação Bioquímica e Molecular dos Tecidos da ATM**

A análise das metaloproteinases (MMPs) 9 e 2 revelou que animais do GA exibiram atividade significativamente maior das isoformas latente e ativa da MMP-9 e isoformas latente, intermediária e ativa da MMP-2, em comparação ao GS. Resultados semelhantes foram descritos em estudos prévios realizados em nosso laboratório (LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016).

Corroborando com nossos resultados, estudos realizados em seres humanos têm mostrado elevada concentração de MMPs, incluindo a MMP-2, MMP-3, MMP-7 e MMP-9 no fluido sinovial ou disco articular de pacientes com osteoartrite da ATM (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006; JIANG et al., 2013; LORETO et al., 2013; CEVIDANES et al., 2014; ALMEIDA et al., 2015). Uma recente metanálise sobre o papel das MMPs, na doença degenerativa da ATM, mostrou alta atividade dessas enzimas em

pacientes com osteoartrite, o que indicou participação como possível biomarcador de doença degenerativa (FERREIRA et al., 2016).

Essas enzimas participam de várias condições fisiológicas e patológicas (FERREIRA et al. 2016). A literatura indicou que a MMP-2 desempenhou um papel essencial no remodelamento natural e na manutenção da integridade da MEC da cartilagem articular; contudo, níveis elevados dessa enzima, podem sugerir condição patológica articular (MIZUI et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2002; GILLARD et al., 2004; YOSHIDA et al., 2006). Em contrapartida, a MMP-9 é sintetizada principalmente por leucócitos polimorfonucleares, e foi associada a condições inflamatórias articulares, inclusive na ATM (MIZUI et al., 2001; YOSHIDA et al., 2006).

Nossos resultados sugeriram, portanto, a presença de atividade degradativa da MEC nos tecidos da ATM em animais do GA. Essa característica foi constatada pelos dados morfológicos, os quais demonstraram hiperplasia sinovial, infiltrado inflamatório crônico, hiperplasia do disco articular e desorganização das fibras colágenas, em comparação ao GS.

A literatura também tem mostrado que a expressão e atividade de MMPs podem ser moduladas por citocinas pró-inflamatórias (IJIMA; KOBAYASHI; KUBOTA, 2001; GE et al., 2009). Neste caso, foi demonstrado, em estudos prévios, que a IL-1 $\beta$  estimula a síntese e atividade de MMP-2, MMP-3 e MMP-9 (CEVIDANES et al., 2014; ZHANG et al., 2016; CHU et al., 2017).

Neste estudo, observamos que as concentrações de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , foram estatisticamente maiores nos tecidos da ATM em GA; incluindo o disco articular, cápsula articular e membrana sinovial, quando comparados ao GS. A concentração de IL-1 $\beta$  também foi maior em GA, quando comparada ao GD. Esses dados sugeriram a presença de inflamação persistente na ATM em até 27 dias, após uma única injeção intra-articular de CFA. Consistente aos nossos resultados, outros autores demonstraram concentrações estatisticamente mais elevadas destes mediadores pró-inflamatórios, após indução de inflamação articular nas fases aguda (HAPER et al 2001), intermediária (WANG et al., 2017) e crônica (SPEARS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; WANG et al., 2012; WANG et al., 2017).

De acordo com evidência científica atual e levando-se em consideração as condições experimentais deste estudo, podemos sugerir que a inflamação persistente induzida pelo CFA, acontece, em virtude do estímulo e manutenção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, os quais podem modular a atividade de MMP-9e MMP-2 e levar à alterações morfológicas nas estruturas da ATM.

Os animais do GD exibiram atividade da isoforma ativa da MMP-9, o que não foi observado em GS. Além disso, GC exibiu concentrações estatisticamente mais elevadas de IL-6 e TNF- $\alpha$  em comparação ao GS. Estes dados, somados aos da avaliação morfológica, sugeriram que a injeção intra-articular de CFA em uma das ATMs, pode provocar alterações morfológicas e moleculares na articulação contralateral.

Além disso, é importante destacar que a ATM, também, apresentou uma capacidade adaptativa e reparadora maior, quando comparada às outras articulações sinoviais. Essas características são em decorrência, principalmente, à presença de uma fibrocartilagem articular (HASKIN; MILAM; CAMERON, 1995; OLIVEIRA, 2008; DE LEEUW, 2010). As alterações observadas, neste estudo, podem ser resultado de um processo adaptativo e de remodelamento dos componentes da ATM frente à sobrecarga funcional articular (KWAI et al., 2008; CHEN et al., 2009; SMYTH et al., 2015).

Nossos resultados, também, mostraram que existe a necessidade de utilização de um grupo de animais saudáveis, como controle, nos modelos experimentais de inflamação da ATM, visto que a articulação contralateral pode ser comprometida.

## **6.2 Capítulo 2: Atividade Fotobioestimuladora a de Dosagens Diferenciadas de LBP sobre a Artrite Induzida na ATM e Músculos Mastigatórios**

### **6.2.1 Morfologia da ATM**

Neste estudo utilizamos um laser de diodo de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), com comprimento de onda de 830 nm (laser infravermelho), potência de saída de 30 mW em modo contínuo e irradiância  $0,259 \text{ W/cm}^2$ . As doses aplicadas foram 5, 10 e  $20 \text{ J/cm}^2$ , correspondendo, respectivamente as energias de 0,6 J; 1,2 J e 2,4 J. Estes parâmetros concordam com a clássica metanálise de Bordal et al. (2003), que recomendaram, para distúrbios na ATM, a utilização de laser infravermelho, em virtude de sua maior penetração nos tecidos. Os respectivos autores afirmaram ainda que, para um comprimento de onda de 830 nm, a energia eficaz aplicada pode variar entre 0, 5 e 15 J.

Nos cortes corados com HE, observou-se que os grupos tratados com LBP, independente da dose aplicada, exibiram menores alterações morfológicas em comparação ao GA, como hiperplasia da membrana sinovial e infiltrado inflamatório crônico. Estes resultados estão de acordo com estudo prévio realizado em nosso laboratório (LEMOS et al., 2016). A morfometria demonstrou que o tratamento com LBP levou a uma tendência de redução da espessura na região média disco articular, contudo, diferença estatística foi observada apenas para a dose de  $20 \text{ J/cm}^2$ , em comparação ao GA. Este resultado tem significado clínico, visto que a região média do disco articular da ATM é responsável por suportar as maiores cargas compressivas durante os esforços mastigatórios (DETAMORE et a., 2005; MADEIRA, 2008, OKESON, 2008; OLIVEIRA, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; KALPAKCI et al., 2011). Além disso, como discutido no capítulo 1 desta tese, o disco articular submetido a um processo inflamatório, responde aumentando de forma desordenada a sua espessura, como forma de adaptação as condições biomecânicas, conforme destacaram outros estudos (WANG et al., 2012; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). Nossos resultados sugerem que o LBP possui efeito anti-inflamatório, principalmente na dosagem de  $20 \text{ J/cm}^2$ .

Em cortes da ATM, corados com Picrosirius e analisados em microscópio de luz polarizada, demonstramos que grupos tratados com LBP, nas doses de  $5 \text{ J/cm}^2$  (GL5),  $10 \text{ J/cm}^2$  (GL10) e  $20 \text{ J/cm}^2$  (GL20), apresentaram maior organização e agregação das fibras colágenas quando comparados ao grupo com artrite induzida (GA), sendo que a maior birrefringência foi observada na dose de  $20 \text{ J/cm}^2$ .

Corroborando com nossos resultados, outros estudos experimentais utilizaram diferentes agentes para indução de inflamação na ATM, e observaram efeitos positivos do LPB, aplicado nas dosagens entre 3 e 225 J/cm<sup>2</sup>. Dentre os efeitos, foram destacados a redução do número de células inflamatórias, menor hiperplasia sinovial, maior organização e distribuição das fibras colágenas e angiogênese (CARVALHO et al., 2011; BARRETTO et al., 2013; CASTRO et al., 2015; LEMOS et al., 2016). Nestes estudos citados, os tratamentos com LBP foram iniciados imediatamente ou após 24h da indução de injúria articular e prosseguiram até 7 dias.

Estudos experimentais realizados na articulação do joelho, também corroboraram com nossos resultados ao demonstrarem efeitos significativos do LPB sobre a artrite induzida, promovendo redução das alterações morfológicas articulares na fase aguda (PALLOTA et al., 2012; ALVES et al., 2013a; CARLOS et al., 2014; SANTOS et al., 2014; TRAWITZKI et al., 2017), intermediária (CASTANO et al., 2007) e crônica (ALVES et al., 2013b ALVES et al., 2014; ISSA et al., 2017). Nesses experimentos as doses variaram entre 2,5 e 142 J/cm<sup>2</sup>.

Vários estudos clínicos também mostraram efeitos significativos da terapia com LBP na redução da dor muscular e articular, bem como na melhora das características funcionais, tais como abertura bucal e movimento de lateralidade (CETNER et al., 2006; FIKACKOVA et al., 2007; MAZZETO; HOTTA; PIZZO, 2010; OZ et al., 2010; SALMOS-BRITO et al., 2012; CARLI et al., 2013; SAYED; MURUGAVEL; GNANAM, 2014; CAVALCANTI et al., 2016; HOSGOR; BAS; CELENK, 2017). Contudo, os parâmetros adotados nesses trabalhos apresentaram heterogeneidade, pois mostraram doses variando de 1,5 a 321 J/cm<sup>2</sup> e número de sessões entre 3 e 12.

Nos cortes histológicos corados com Azul de Toluidina, observamos coloração intensa e maior metacromasia, na cartilagem articular, nos grupos GL5, GL10 e GL20 em comparação ao GA. Essas observações indicaram maior quantidade de proteoglicanos na MEC (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LEMOS et al., 2015; LEMOS et al., 2016). A maior metacromasia verificada se mostrou na dose de 10 J/cm<sup>2</sup>. Os dados histomorfométricos, no entanto, demonstraram que o tratamento com LBP, não melhorou a espessura da cartilagem articular.

Neste estudo, os tratamentos com o LBP tiveram início, uma semana após a indução de inflamação na ATM, ou seja, o laser foi aplicado em articulações com alterações morfológicas já estabelecidas. Levando-se em consideração o tempo de avaliação, nossos dados sugeriram que, os tratamentos com laser preveniram a perda de proteoglicanos da cartilagem articular, porém, foi insuficiente para restabelecer a sua espessura normal.

### 6.2.2 Morfometria das fibras musculares

Não foram observados, na literatura analisada, artigos científicos, que relatassem as características histomorfométricas, pertinentes aos músculos mastigatórios, utilizando-se modelos experimentais de inflamação da ATM, bem como os efeitos que o LBP tem sobre o diâmetro e área das fibras musculares, quanto aplicado apenas na articulação.

Pudemos observar, entretanto, que os efeitos positivos do LBP, foram vistos apenas no músculo pterigóideo lateral. Notamos que o LBP, independente da dose (5, 10 ou 20J/cm<sup>2</sup>) promoveu aumento significativo da área e diâmetro das fibras musculares, em comparação ao mesmo músculo de animais com artrite induzida na ATM esquerda. Não foi observada diferença estatística significativa entre GS e os grupos tratados com LBP, ou entre os próprios grupos laser. Inferimos, portanto, que este resultado possui significado clínico, visto que o músculo pterigóideo lateral foi o músculo mais afetado em pacientes portadores de disfunção temporomandibular, o que concorda com os achados de Moura et al. (2017), uma vez que participa ativamente dos movimentos de abertura bucal, protrusão e lateralidade (MADEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008; OKESON, 2008; TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; DE LEEUW, 2010; MOURA et al., 2017).

Neste sentido, diversos estudos clínicos descreveram efeitos positivos do LBP ao promoverem significativa melhora dos movimentos mandibulares em pacientes com osteoartrite ou DTM articular e muscular (CETINER et al., 2006; MAZZETTO; HOTTA; PIZZO, 2010; OZ et al., 2010; SALMOS-BRITO et al., 2012; SAYED; MURUGAVEL; GNABAM, 2014; HOSGOR; BAS; CELENK, 2017).

### 6.2.3 Consumo de ração

Em três semanas de avaliações, verificamos que animais tratados com LBP consumiram maior quantidade de ração, porém apenas a dose de 20 J/cm<sup>2</sup> diferiu estatisticamente de GA, com efeitos positivos significativos, a partir da segunda semana. Cabe destacar que os animais de GL20 também consumiram, estatisticamente, um volume maior de ração quando comparados ao GL5 (primeira semana) e GL10 (média das três semanas; segunda e terceira semana), sendo que a dose de 20 J/cm<sup>2</sup>, indicou maior efeito anti-inflamatório.

Conforme discutido anteriormente (capítulo 1 desta discussão) e concordantes com Harper et al. (2001), Kramer et al. (2010), Bi; Ding e Gan (2016) e Bi et al. (2017), o padrão e a quantidade de ração consumida são importantes parâmetros de avaliação de dor na ATM em

períodos maiores de tempo. Com relação a esse fato, autores como Kramer et al. (2010) e Bi; Ding e Gan (2016) destacaram que animais com dor articular, diminuem a ingestão e frequência do volume de alimentos, além de se alimentarem num tempo mais longo. Contudo, estudos mais específicos de avaliação da dor precisam ser realizados para melhor compreensão dos efeitos do LBP.

Barretto et al. (2013), verificaram através do teste de formalina, no qual avalia-se o comportamento de esfregar a região orofacial após injeção subcutânea de formalina na região perinatal do animal, que o LBP reduziu o comportamento nociceptivo orofacial. Esses autores aplicaram uma dose de  $52,5 \text{ J/cm}^2$ , energia de 2,1 J, durante 30 segundos, num total de três sessões e tratamento foi iniciado imediatamente após injúria articular. Por outro lado, Desiderá et al. (2015), utilizaram o teste de formalina e o de alodinia mecânica, que avalia o reflexo de retirada da cabeça do animal, durante a aplicação de estímulo mecânico direto (filamento de Von Frey) sobre a região da ATM, e também demonstraram significativa redução do comportamento nociceptivo orofacial. Para tanto, aplicaram uma dose semelhante à aqui adotada ( $20 \text{ J/cm}^2$ ), energia de 0,8 J, durante 20 segundos e 4 sessões, com o tratamento sendo iniciado imediatamente após indução da injúria articular.

Nossos resultados concordam com dados divulgados recentemente na literatura, os quais sugerem que a redução do comportamento nociceptivo e alodinia, deve-se ao efeito anti-inflamatório do LBP sobre os tecidos da ATM (BARRETTO et al., 2013; DESIDERÁ et al., 2015), ao promover redução do número de células inflamatórias e mediadores pró-inflamatórios (CARVALHO et al., 2011; BARRETTO et al., 2013; CASTRO et al., 2015).

#### **6.2.4 Avaliação Bioquímica e Molecular dos Tecidos da ATM**

A análise das MMPs revelou, como um todo, que doses de 5, 10 e  $20 \text{ J/cm}^2$  reduziram estatisticamente a atividade das isoformas latente e ativa da MMP-9 e MMP-2, em comparação ao GA, não sendo observada diferença estatística significativa entre os tratamentos. Apenas a dose de  $5 \text{ J/cm}^2$  reduziu estatisticamente a atividade da isoforma intermediária da MMP-2.

Em estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, Lemos et al. (2016) também observaram significativa redução de todas as isoformas da MMP-9 e MMP-2 ao ser aplicada uma dose de LBP de  $3 \text{ J/cm}^2$  em 7 sessões. Ainda para esses autores, o LBP pode induzir uma limpeza tecidual, o que reduziu o desenvolvimento de alterações estruturais na MEC.



Algumas pesquisas procuraram avaliar a ação do LBP sobre a atividade das MMPs, em injúrias experimentais da ATM. Contudo, estudos realizados na articulação do joelho com lesão articular induzida, corroboraram com nossos resultados ao demonstrarem significativa redução da atividade das MMPs, após terapia com LBP (ALVES et al., 2014; CARLOS et al., 2014). Alves et al. (2014), sugeriram, ainda, que o LBP modulou o processo inflamatório, melhorou a cicatrização, estimulou a síntese de colágeno e regulou a atividade de enzimas que agem no remodelamento da MEC, como as MMPs. Estes autores aplicaram o LPB uma vez ao dia num total de 7 ou 14 dias de tratamento.

A avaliação da concentração de citocinas pró-inflamatórias, nos tecidos da ATM, revelou que os grupos GL5, GL10 e GL20 apresentaram concentração estatisticamente menor de IL-1 $\beta$  em comparação ao GA. O grupo GL5, também exibiu significativa redução da concentração de TNF- $\alpha$  quando comparado ao GA.

Conforme destacado anteriormente neste trabalho (item 2.5 da revisão), estudos experimentais relacionados à ação do LBP sobre a inflamação induzida na ATM, não são comuns de serem encontrados na literatura, atualmente. Contudo, estudos realizados em outras articulações sinoviais dão suporte aos nossos resultados, ao demonstrarem significativa redução da concentração nos tecidos ou expressão do RNAm de diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e PGE2 nas fases aguda (PALLOTA et al., 2012; ALVES et al., 2013a; CARLOS et al., 2014; SANTOS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017b) e intermediária da inflamação (CASTANO et al., 2007). Nos estudos apontados anteriormente, a dose de LPB variou entre 3 e 500 J/cm<sup>2</sup>.

Pallota et al. (2012), avaliaram a ação do LPB, nas doses de 50, 150, 300 e 500 J/cm<sup>2</sup> em única aplicação na articulação do joelho, uma hora após injúria articular com inflamação induzida por carragenina. Estes autores verificaram que todas as doses foram eficazes na redução da concentração de IL-1 $\beta$ , IL-6 e PGE2.

Concordando com nossos resultados, Alves et al. (2013a), descreveram significativa redução na concentração de TNF- $\alpha$ , membrana sinovial e expressão do RNAm de IL-1 $\beta$  e IL-6 em joelho de ratos com inflamação aguda induzida por papaína 4% e tratados com LBP. Estes autores observaram melhores resultados com o laser programado para operar com potência de saída de 50 mW, em comparação à potência de 100 mW. Ambos os tratamentos foram iniciados imediatamente após indução de lesão articular.

Também concordando com os nossos resultados, Borjal et al. (2006), afirmaram que há forte evidência da ação LPB sobre a angiogênese, redução do número de células infamatórias e modulação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6,

PGE2 e COX2. Para estes autores o LBP apresentou um efeito dose depende e que doses entre 0,7 e 19 J/cm<sup>2</sup> são as mais indicadas para obter efeitos anti-inflamatórios.

Conforme destacado ao longo desta discussão, evidenciamos acentuada heterogeneidade dos parâmetros do LBP, principalmente em relação à dose e ao número de sessões, como foi destacado em metanálises anteriores, relacionadas aos efeitos do LBP sobre a ATM (BORJAL et al. 2003; CHANG et al. 2014; CHENG et al. 2015).

Levando-se em consideração as condições experimentais deste estudo, demonstramos que todas as doses propostas e avaliadas foram eficazes no tratamento da artrite induzida na ATM esquerda de ratos através de injeção intra-articular de CFA.

Nossos resultados, analisados conjuntamente, sugeriram que, neste modelo experimental de inflamação da ATM, o LBP modulou os mediadores pró-inflamatórios, o que reduziu as concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nos tecidos afetados. Os dados também sugeriram que, o laser de baixa potência pode induzir uma limpeza tecidual, aumentando o reparo, demonstrado pela baixa atividade das MMPs, e reduziu as alterações morfológicas induzidas pela injeção intra-articular de CFA. Considerando a análise morfológica e bioquímica, a dose de 20J/cm<sup>2</sup> demonstrou ser mais eficaz, ao promover melhora significava em maior número de parâmetros avaliados neste estudo.

## 7 CONCLUSÃO

De forma geral e específica, pudemos concluir que:

- A ATM contralateral à articulação com artrite induzida exibiu alterações morfológicas e moleculares, incluindo aumento da espessura do disco articular na região posterior, atividade da MMP-9 ativa e maior concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  no disco articular, cápsula e tecido retrodiscal.
- A inflamação induzida na ATM esquerda reduziu a área e diâmetro das fibras dos músculos temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral em comparação aos músculos de animais saudáveis.
- A inflamação na ATM causou menor consumo de ração em três semanas de avaliação.
- Os tratamentos com LBP nas doses de 5, 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> foram eficientes na proteção e limpeza das estruturas articulares, acelerando o reparo tecidual. A ação do LBP caracterizou-se por promover:
  - Redução das alterações morfológicas na ATM
  - Redução da espessura na região média do disco articular (apenas na dose de 20 J/cm<sup>2</sup>).
  - Melhor organização das fibras colágenas no disco articular
  - Maior quantidade de proteoglicanos na matriz da cartilagem articular
  - Maior área e diâmetro das fibras do músculo pterigóideo lateral.
  - Maior consumo de ração (apenas na dose de 20 J/cm<sup>2</sup>).
  - Menor atividade das MMPs 9 e 2 no disco articular, cápsula e tecido retrodiscal.
  - Menor concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (apenas na dose de 5 J/cm<sup>2</sup>) no disco articular, cápsula e tecido retrodiscal.
- Levando em consideração as condições experimentais deste estudo, a dose de 20 J/cm<sup>2</sup> demonstrou ser mais eficiente das demais (5 e 10 J/cm<sup>2</sup>) ao promover melhora significativa em maior número de parâmetros avaliados.
- A dose de 20 J/cm<sup>2</sup> deve ser indicada para estudos clínicos e experimentais futuros.

## 8 REFERÊNCIAS

1. ABRAMSON, S. B. Inflammation in osteoarthritis. **J Rheumatol Suppl.** v. 70, p. 70-6, 2004.
2. ALMEIDA, L. E.; CAPORAL, K.; AMBROS, V.; AZEVEDO, M.; NORONHA, L.; LEONARDI, R.; TREVILATTO, P. C. Immunohistochemical expression of matrix metalloprotease-2 and matrix metalloprotease-9 in the disks of patients with temporomandibular joint dysfunction. **J Oral Pathol Med.** v. 44, n. 1, p. 75-9, 2015.
3. ALVES, A. C.; VIEIRA, R.; LEAL-JUNIOR, E.; DOS SANTOS, S.; LIGEIRO, A. P.; ALBERTINI, R.; JUNIOR, J.; DE CARVALHO, P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther.** v.15, n. 5, R116, 2013a.
4. ALVES, A. C.; DE CARVALHO, P. T.; PARENTE, M.; XAVIE, M.; FRIGO, L.; AIMBIRE, F.; LEAL JUNIOR, E. C.; ALBERTINI, R. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. **Lasers Med Sci.** v. 28, n. 2, p. 529-36, 2013b.
5. ALVES, A. C. A.; ALBERTINI, R. SANTOS, S. A.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; SANTANA, E.; JORGE SERRA, A. J. SILVA, J. A. JR.; DE CARVALHO, P. T. 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.
6. ARAÚJO, R. V. S.; SILVA, F. O.; MELO-JÚNIOR, M. R.; PORTO, A. L. F. Metaloproteinasas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **R. Ci. md. biol.,** v.10, n.1, p.82-88, 2011.
7. ARAÚJO, J. C. B.; GONDIM, D. V.; CAVALCANTE, ALC.; LISBOA, MRP.; DE CASTRO BRITO, G. A.; VALE, M. L. Inflammatory pain assessment in the arthritis of the temporomandibular joint in rats: A comparison between two phlogistic agents. **J Pharmacol Toxicol Methods.** v. 88, n. 1, p.100-108, 2017.
8. ASSIS, L.; MILARES, L. P.; ALMEIDA, T.; TIM, C.; MAGRI, A.; FERNANDES, K. R.;MEDALHA, C.; RENNO, A. C. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 24, n. 1, p. 169-77, 2016.

9. BARRETTO, S. R.; DE MELO, G. C.; DOS SANTOS, J. C.; DE OLIVEIRA, M. G.; PEREIRA-FILHO, R. N.; ALVES, A. V.; RIBEIRO, M. A.; LIMA-VERDE, I. B.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L.; BONJARDIM, L. R. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents. **J Photochem Photobiol B**. v. 129, p. 135-42, 2013.
10. BI, R. Y.; DING, Y.; GAN, Y. H. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Attenuate Hyperalgesia and Block Upregulation of Trigeminal Ganglionic Sodium Channel 1.7 after Induction of Temporomandibular Joint Inflammation in Rats. **Chin J Dent Res**. v. 19, 1, p. 35-42, 2016.
11. BI, R. Y.; MENG, Z.; ZHANG, P.; WANG, X. D.; DING, Y.; GAN, Y. H. Estradiol upregulates voltage-gated sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion contributing to hyperalgesia of inflamed TMJ. **PLoS One**. v. 12, n. 6, p. e0178589, 2017.
12. 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, 2009a.
13. BONJARDIM, L. R.; DA SILVA, A. P.; GAMEIRO, G. H.; TAMBELI, C. H.; VEIGA, M. C. F. A. Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and a central opioid analgesic. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 91, n. 3, p. 321-6, 2009b.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. BROOKS, P. Inflammation as an important feature of osteoarthritis. **Bull World Health Organ**. v. 81, n. 9, p. 689-90, 2003.

18. CARLI, M. L.; GUERRA, M. B.; NUNES, T. B.; DI MATTEO, R. C.; DE LUCA, C. E.; ARANHA, A. C.; BOLZAN, M. C.; WITZEL, A. L. Piroxicam and laser phototherapy in the treatment of TMJ arthralgia: a double-blind randomised controlled trial. **J Oral Rehabil.** v. 40, n. 3, p. 171-8, 2013.
19. 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.
20. CARVALHO, C. M.; LACERDA, J. A.; NETO, F. P. S.; CASTRO, I. C. V.; RAMOS, T. A.; LIMA, F. O.; DE CERQUEIRA LUZ, J. G.; RAMALHO, M. J.; DOS SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. 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.
21. CASTANO, A. P.; DAI, T.; YAROSLAVSKY, I.; COHEN, R.; APRUZZESE, W. A.; SMOTRICH, M. H.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers Surg Med.** v. 39, n. 6, p. 543-50, 2007.
22. CASTRO, I. C. V. **Avaliação da utilização das fototerapias Laser ( $\lambda$  790 nm) e LED ( $\lambda$  850  $\pm$  10 nm) no processo inflamatório induzido por carragenina na articulação temporomandibular de rato.** Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2014. 101 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, 2014.
23. CASTRO, I. C.; ROSA, C. B.; CARVALHO, C. M.; ARAGÃO, J. S.; CANGUSSU, M. C.; DOS SANTOS, J. N.; DOS SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. Assessment of different energy delivery settings in laser and LED phototherapies in the inflammatory process of rat's TMJ induced by carrageenan. **Lasers Med Sci.** v. 30, n. 8, p. 2105-13, 2015.
24. CASTRO-SANTOS, P.; DÍAZ-PENA, R. Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino-americanas. *Rev bras reumatol*, v. 6, n. 2, p. 171–177, 2016.
25. CAVALCANTI, M. F.; SILVA, U. H.; LEAL-JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; MARCOS, R. L.; PALLOTTA, R. C.; DIOMEDE, F.; TRUBIANI, O.; DE ISLA, N.; FRIGO, L. Comparative Study of the Physiotherapeutic and Drug Protocol and Low-Level Laser Irradiation in the Treatment of Pain Associated with

- Temporomandibular Dysfunction. **Photomed Laser Surg.** v. 34, n. 12, p. 652-56, 2016.
26. 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.
27. CEVIDANES, L. H.; WALKER, D.; SCHILLING, J.; SUGAI, J.; GIANNOBILE, W.; PANIAGUA, B.; BENAVIDES, E.; ZHU, H.; MARRON, J. S. JUNG, B. T.; BARANOWSKI, D.; RHODES, J.; NACKLEY, A.; LIM, P. F.; LUDLOW, J. B.; NGUYEN, T.; GONCALVES, J. R.; WOLFORD, L.; KAPILA, S.; STYNER, M. 3D osteoarthritic changes in TMJ condylar morphology correlates with specific systemic and local biomarkers of disease. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 22, n. 10, p. 1657-67, 2014.
28. CHANG, W. D.; LEE, C. L.; LIN, H. Y.; HSU, Y. C.; WANG, C. J.; LAI, P. T. A Meta-analysis of Clinical Effects of Low-level Laser Therapy on Temporomandibular Joint Pain. **J Phys Ther Sci.** v. 26, n. 8, p. 1297-300, 2014.
29. CHEN, J.; SORENSEN, K. P.; GUPTA, T.; KILTS, T.; YOUNG, M.; WADHWA, S. Altered functional loading causes differential effects in the subchondral bone and condylar cartilage in the temporomandibular joint from young mice. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 17, n. 3, p.354-61, 2009
30. CHEN, J.; HUANG, Z.; GE, M.; GAO, M. Efficacy of low-level laser therapy in the treatment of TMDs: a meta-analysis of 14 randomised controlled trials. **J Oral Rehabil.** v. 42, n. 4, p. 291-9, 2015.
31. CHU, W. C.; ZHANG, S.; SNG, T. J.; ONG, Y. J.; TAN, W. L.; ANG, V. Y.; FOLDAGER, C. B.; TOH, W. S. Distribution of pericellular matrix molecules in the temporomandibular joint and their chondroprotective effects against inflammation. **Int J Oral Sci.** v. 9, n. 1, p. 43-52, 2017.
32. CONVISSAR, R. A. **Princípios e práticas do laser na odontologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 320 p.
33. CORAZZA, A. V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 2, p. 102-6, 2007.
34. CORDEIRO, P. C.; GUIMARAES, J. P.; DE SOUZA, V. A.; DIAS, I. M.; SILVA, J. N.; DEVITO, K. L.; BONATO, L. L. Temporomandibular joint involvement in

- rheumatoid arthritis patients: association between clinical and tomographic data. **Acta Odontol Latinoam**. v. 29, n. 3, p. 123-129, 2016.
35. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1268p.
  36. DE LEEUW, R. **Dor orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento**. 4ª ed. São Paulo: Quintessence, 2010. 315 p.
  37. DE SOUZA, S.; BANSAL, RK.; GALLOWAY, J. Rheumatoid arthritis - an update for general dental practitioners. **Br Dent J**. v. 221, n. 10, p. 667-73, 2016.
  38. DESIDERÁ, A. C.; NASCIMENTO, G. C.; GERLACH, R. F.; LEITE-PANISSI, C. R. Laser therapy reduces gelatinolytic activity in the rat trigeminal ganglion during temporomandibular joint inflammation. **Oral Dis**. v. 21, n. 5, p. 652-8, 2015.
  39. 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.
  40. 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.
  41. FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. **J Lasers Med Sci**. v. 5, n. 2, p. 58-62, 2014.
  42. FARNDALE, 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.
  43. FERREIRA, L. M.; MOURA, Á. F.; BARBOSA, G. A.; PEREIRA, H. S.; DOS SANTOS CALDERON, P. Do matrix metalloproteinases play a role in degenerative disease of temporomandibular joint? A systematic review. **Cranio**. v. 34, n. 2, p. 112-7, 2016.
  44. 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.
  45. FONTELLAS, M. J.; SIMÕES, M. G.; ALMEIDA, J. C.; FONTELLAS, R. G. S. Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. **Revista Paraense de Medicina**, v. 24, n. 2, p. 57-64, 2010.



46. GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1975.
47. 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.
48. GE, X.; MA, X.; MENG, J.; ZHANG, C.; MA, K.; ZHOU, C. Role of Wnt-5A in Interleukin-1 $\alpha$ -Induced Matrix Metalloproteinase Expression in Rabbit Temporomandibular Joint Condylar Chondrocytes. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 9, p. 2714–22, 2009.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, S. I. M.; UTIYAMA, S. R. R. Artrite reumatoide: uma visão atual. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 5, p. 495-503, 2011.
53. 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.
54. GRAY, H.; GOSS, C. M. **Gray Anatomia**. 29<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
55. 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
56. 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.

57. 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.
58. 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.
59. HIBI, H.; UEDA, M. Body posture during sleep and disc displacement in the temporomandibular joint: a pilot study. **J Oral Rehabil**. v. 32, n. 2, p.; 85-9, 2005.
60. 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.
61. HOSGOR, H.; BAS, B.; CELENK, C. A comparison of the outcomes of four minimally invasive treatment methods for anterior disc displacement of the temporomandibular joint. **Int J Oral Maxillofac Surg**. S0901-5027(17)31471-6, 2017.
62. HSIEH, Y. L.; CHENG, Y. J.; HUANG, F. C.; YANG, C. C. The fluence effects of low-level laser therapy on inflammation, fibroblast-like synoviocytes, and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. **Photomed Laser Surg**. v. 32, n. 12, p. 669-77, 2014.
63. 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.
64. ISSA ,JPM.; TRAWITZKI, BF.; ERVOLINO, E.; MACEDO, AP.; LILGE, L. Low-intensity laser therapy efficacy evaluation in FVB mice subjected to acute and chronic arthritis. **Lasers Med Sci**. v. 32, n. 6, p. 1269-1277, 2017.
65. JIANG, Q.; QIU, Y. T.; CHEN, M. J.; ZHANG, Z. Y.; YANG, C. Synovial TGF- $\beta$ 1 and MMP-3 levels and their correlation with the progression of temporomandibular joint osteoarthritis combined with disc displacement: A preliminary study. **Biomed Rep**. v. 1, n. 2, p. 218-22, 2013.
66. 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.
67. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

68. 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.
69. KAMEOKA, S.; KUROKI, Y.; HONDA, K.; KIJIMA, N.; MATSUMOTO, K.; ASANO, M.;ARAI, Y.; SHIRAKAWA, T. Diagnostic accuracy of microcomputed tomography for osseous abnormalities in the rat temporomandibular joint condyle. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 38, n. 7, p. 465-9, 2009.
70. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.
71. KAWAI, N.; TANAKA, E.; LANGENBACH, G. E.; VAN WESSEL, T.; SANO, R.; VAN EIJDEN, T. M.;TANNE, K. Jaw-muscle activity changes after the induction of osteoarthritis in the temporomandibular joint by mechanical loading. **J Orofac Pain**, v. 22, n. 2, p.153-62, 2008.
72. KERİŞ, E. Y.; YAMAN, S. D.; DEMIRAĞ, M. D.; HAZNEDAROĞLU, S. Temporomandibular joint findings in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and primary Sjögren's syndrome. **J Investig Clin Dent**. p. 1-7, 2016.
73. KHALIGHI, H. R.; ANBARI, F.; BEYGOM TAHERI, J.; BAKHTIARI, S.; NAMAZI, Z.; POURALIBABA, F. Effect of Low-power Laser on Treatment of Orofacial Pain. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**. v. 4, n. 3, p. 75-8, 2010.
74. KIERNAN, J.A. **Histological and histochemical methods**. Theory and practice. 3 ed. Oxford: Pergamo Press, p.81-2, 1981.
75. KLARESKOG, L.; STOLT, P.; LUNDBERG, K.; KÄLLBERG, H.; BENGTSSON, C.; GRUNEWALD, J.; RÖNNELID, J.; HARRIS, HE.; ULFGREN, AK.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; EKLUND, A.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 1, p. 38-46, 2006.
76. KNUDSEN, M.; BURY, M.; HOLWEGNER, C.; REINHARDT, A. L.; YUAN, F.; ZHANG, Y.;GIANNINI, P.; MARX, D. B.; WANG, D.; REINHARDT, R. A. Effect of dexamethasone prodrug on inflamed temporomandibular joints in juvenile rats. **Arthritis Res Ther**. v. 17, p. 267, 2015.
77. 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.

78. KRISTENSEN, K. D.; STOUSTRUP, P.; SELER, A. K.; PEDERSEN, T. K. NYENGAARD, J. R.; HAUGE, E. M.;HERLIN, T. 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.
79. 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.
80. KURIBAYASHI, A.; OKOCHI, K.; KOBAYASHI, K.; KURABAYASHI, T. MRI findings of temporomandibular joints with disk perforation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 106, n. 3, p. 419-25, 2008.
81. KUROKI, Y.; HONDA, K.; KIJIMA, N.; WADA, T.; ARAI, Y.; MATSUMOTO, N.;IWATA, K.; SHIRAKAWA, T.In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint. **Oral Dis**, v. 17, n. 5, p. 499–507, 2011.
82. KYRKANIDES, S.; FIORENTINO, P.M.; MILLER, J. H.; GAN. Y. LAI, Y. C.; SHAFTEL, S. S.;PUZAS, J. E.; PIANCINO, M. G.; O'BANION, M. K.; TALLENTS, R. H. 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.
83. LAI, Y. C.; SHAFTEL, S. S.; MILLER, J. N.; TALLENTS, R. H.; CHANG, Y.; PINKERT, C. A.;OLSCHOWKA, J. A.; DICKERSON, I. M.; PUZAS, J. E.; O'BANION, M. K.; KYRKANIDES, S. 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.
84. LANGELLA, L. G.; SILVA, P. F. C.; COSTA-SANTOS, L.; GONÇALVES, M. L. L.; MOTTA, L. J.; DEANA, A. M.; FERNANDES, K. P. S.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; BUSSADORI, S. K. Photobiomodulation versus light-emitting diode (LED) therapy in the treatment of temporomandibular disorder: study protocol for a randomized, controlled clinical trial. *Trials*, v.19, n. 1, p. 71, 2018.
85. LEAL DE GODOY, C. H.; MOTTA, L. J.; SANTOS FERNANDES, K. P.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; DEANA, A. M.; BUSSADORI, S. K. Effect of low-level laser therapy on adolescents with temporomandibular disorder: a blind

- randomized controlled pilot study. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 73, n. 4, p. 622-9, 2015.
86. LEMOS, G. L. **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: Unicamp, 2015. 93 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2015.
87. LEMOS, G. A.; RISSI, R.; PIMENTEL, E. R.; PALOMARI, E. T. Effects of high molecular weight hyaluronic acid on induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. **Acta Histochem.** V. 117, n. 6, p. 566-75, 2015.
88. LEMOS, G. A.; RISSI, R.; DE SOUZA PIRES, I. L.; DE OLIVEIRA, L. P.; DE ARO, A. A.; PIMENTEL, E. R.; PALOMARI, E. T. Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the temporomandibular joint. **Lasers Med Sci.** v. 31, n. 6, p. 1051-9, 2016.
89. 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.
90. MADEIRA, M.C. **Anatomia da face.** 6ª ed. São Paulo: Sarvier, 2008.
91. 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.
92. 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.
93. MELO JÚNIOR, J. M.; DAMASCENO, M. B.; SANTOS, S. A.; BARBOSA, T. M.; ARAÚJO, J. R.; VIEIRA-NETO, A. E.; WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CAMPOS, A. R. Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacology.** v. 25, n. 2, p. 247-254, 2017.
94. MERCURI, L. G. Osteoarthritis, Osteoarthritis, and Idiopathic Condylar Resorption. **Oral Maxillofacial Surg Clin. N. Am,** v. 20, n. 2, p.169–83, 2008.

95. 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.
96. MIYAMOTO, K.; ISHIMARU, J. I.; KURITA, K.; GOSS, A. N. Synovial Matrix Metalloproteinase-2 in Different Stages of Sheep Temporomandibular Joint Osteoarthritis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 60, n. 1, p. 66-72, 2002.
97. MOURA, W. P.; SILVA, P. L. P.; LEMOS, G. A.; BONAN, P. R. F.; MONTENEGRO, R. V.; BATISTA, A. U. D. Retrospective review of patients referred to a temporomandibular dysfunction care setting of a Brazilian public university. **Rev Dor**. v. 18, n. 2, p. 128-34, 2017.
98. 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.
99. 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.
100. OMMERBORN, M. A.; KOLLMANN, C.; HANDSCHEL, J.; DEPFRICH, R. A.; LANG, H.; RAAB, WH-M. A. survey on German dentists regarding the management of craniomandibular disorders. **Clin Oral Investig**. v. 14, n. 2, p. 137-44, 2010;
101. 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.
102. OLIVEIRA, D. W. D.; LAGES, F. S.; GUIMARÃES, R. C.; PEREIRA, T. S.; BOTELHO, A. M.; GLÓRIA, J. C. R.; TAVANO, K. T. A.; GONÇALVES, P. F.; FLECHA, O. D. Do TMJ symptoms improve and last across time after treatment with red (660 nm) and infrared (790 nm) low level laser treatment (LLLT)? A survival analysis. **Cranio**. v. 20, p. 1-7, 2017a.
103. OLIVEIRA, V. L.; SILVA, J. A. JR.; SERRA, A. J.; PALLOTTA, R. C.; SILVA, E. A.; FARIAS MARQUES, A. C.; FELICIANO, R. D.; MARCOS, R. L.; LEAL-JUNIOR, E. C.; DE CARVALHO, P. T. Photobiomodulation therapy in the modulation of inflammatory mediators and bradykinin receptors in an experimental model of acute osteoarthritis. **Lasers Med Sci**. v. 32, n. 1, p. 87-94, 2017b.

104. OKESON, J. P. **Tratamento das Desordens Temporomandibulares e Oclusão**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
105. ÖZ, S.; GÖKÇEN-RÖHLIG, B.; SARUHANOĞLU, A.; TUNCER, E. B. Management of myofascial pain: low-level laser therapy versus occlusal splints. **J Craniofac Surg**. v. 21, n. 6, p. 1722-8, 2010.
106. PALLOTTA, R. C.; BJORDAL, J. M.; FRIGO, L.; LEAL JUNIOR, E. C.; TEIXEIRA, S.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; MESSIAS, F. M.; LOPES-MARTINS, R. A. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 71-8, 2012.
107. PANHOCA, V. H.; LIZARELLI, RDE F.; NUNEZ, S. C.; PIZZO, R. C.; GRECCO, C.; PAOLILLO, F. R.; BAGNATO, V. S. Comparative clinical study of light analgesic effect on temporomandibular disorder (TMD) using red and infrared led therapy. **Lasers Med Sci**. v. 30, n. 2, p. 815-22, 2015.
108. PAOLILLO, F. R.; CORAZZA, A. V.; FERRARESI, C.; AQUINO, A. E.; BAGNATO, V. S. Fototerapia aplicada à motricidade orofacial e corporal: novas perspectivas. **ImplantNews**, v. 9, n. 1a, supl. esp., p. 62-67, 2012.
109. 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.
110. PAULINO, M. R.; MOREIRA, V. G.; LEMOS, G. A.; SILVA, P. L.; BONAN, P. R.; BATISTA, A. U. D. Prevalência de sinais e sintomas de disfunção temporomandibular em estudantes pré-vestibulandos: associação de fatores emocionais, hábitos parafuncionais e impacto na qualidade de vida. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 23, n. 1 p. 173-186, 2018.
111. PORTO, G. G.; VASCONCELOS, B. C. E.; ANDRADE, E. S. S.; SILVA-JUNIOR, V. A. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 25, n. 3, p. 190-3, 2010.
112. PROCKT, A. P.; TAKAHASHI, A.; PAGNONCELLI, R. M. Uso de Terapia com Laser de Baixa Intensidade na Cirurgia Bucomaxilofacial. **Rev. port. estomatol. cir. maxilofac**, v. 49, n. 4, p. 247-255, 2008.
113. RAFAYELIAN, S.; RADLANSKI, R. J.; MINDEN, K.; PISCHON, N.; JOST-BRINKMANN, P. G.; PRÄGER, T. M. Histomorphometry in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med**. v. 44, n. 1, p. 67-74, 2015.

114. REISSMANN, D. R.; BEHN, A.; SCHIERZ, O.; LIST, T.; HEYDECKE, G. Impact of dentists' years since graduation on management of temporomandibular disorders. **Clin Oral Investig.** v. 19, n. 9, p. 2327-36, 2015.
115. RISSI, R.; LEMOS, G. A.; IDE, B. N.; CAMARGO, R. L.; BRANCO, R. C. S.; MORATO, P. N.; PALOMAR, E. T. Joint immobilization: effects on muscular tissue of obese and malnourished mice. **Rev. bras. cineantropom. desempenho hum.** (Online), v. 18, p. 1-10, 2016.
116. ROSA, R. S. **Avaliação morfológica do colágeno após aquecimento in vivo.** São Carlos: USP, 2007. 99 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2007.
117. SALMOS-BRITO, J. A. L.; MENEZES, R. F.; TEIXEIRA, C. E. C.; GONZAGA, R. K. M.; RODRIGUES, B. H. M.; BRAZ, R.; BESSA-NOGUEIRA, R. V.; GERBI, M. E. 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.
118. SANTOS, S. A.; ALVES, A. C.; LEAL-JUNIOR, E. C.; ALBERTINI, R.; VIEIRA, R. P.; LIGEIRO, A. P.; JUNIOR, J. A.; DE CARVALHO, P. T. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Lasers Med Sci.** v. 29, n. 3, p. 1051-8, 2014.
119. SAYED, N.; MURUGAVEL, C.; GNANAM, A. Management of Temporomandibular Disorders with Low Level Laser Therapy. **J Maxillofac Oral Surg.** v. 13, n. 4, p. 444-50, 2014.
120. SHOBHA, R.; NARAYANAN, V. S.; JAGADISH PAI B. S.; JAISHANKAR, H. P.; JIJIN, M. J. Low-level laser therapy: A novel therapeutic approach to temporomandibular disorder - A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Indian J Dent Res.** v. 28, n. 4, p. 380-387, 2017.
121. SMYTH, T. T.; CARMALT, J. L.; TREEN, T. T.; LANOVAZ, J. L. The effect of acute unilateral inflammation of the equine temporomandibular joint on the kinematics of mastication. **Equine Vet J**, v. 48, n. 4, p. 523-7, 2015.
122. 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.



123. SRINIVAS, R.; SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; NIEMI, E.; RAUSTIA, A.; PERNU, H.;TERONEN, O.; SALO, T. 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.
124. 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.
125. TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; IKEDA, M.; NASU, M.; KADOI, J.; SHIMA, Y.;OHTA, H.; MATSUMOTO, S. 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.
126. TEIXEIRA, L.M.S.; REHER, P.; REHER, V.G.S. **Anatomia aplicada a odontologia**.2<sup>a</sup> ed. Rio de janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.
127. TOMAZONI, S. S.; LEAL-JUNIOR, E. C.; PALLOTTA, R. C.; TEIXEIRA, S.; DE ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R. A. Effects of photobiomodulation therapy, pharmacological therapy, and physical exercise as single and/or combined treatment on the inflammatory response induced by experimental osteoarthritis. **Lasers Med Sci**. v. 32, n. 1, p. 101-108, 2017.
128. VERNAL, R.; VELÁSQUEZ, E.; GAMONAL, J.; GARCIA-SANZ, J. A.;SILVA, A.; SANZ, M. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 10, p. 910-5, 2008.
129. VIDAL, B. C. Form birefringence as applied to biopolymer and inorganic material supraorganization. **Biotech & histochem**, v. 85, n. 6, p. 365–78, 2010.
130. VIDAL, B. C. (1987). **Métodos em Biologia Celular**. In: VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. Biologia Celular. Rio de Janeiro: Atheneu, cap.2, p.4-40.
131. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.; PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. **Histochem j**, v.14, n. 6, p.857-78, 1982.
132. VOSSENAAR, E. R.; VAN VENROOIJ, W. J. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 3, p. 107-11, 2004.
133. XU, L.; GUO, H.; LI, C.; XU, J.; FANG, W.; LONG, X. A time-dependent degeneration manner of condyle in rat CFA-induced inflamed TMJ. **Am J Transl Res**. v. 8, n. 2, p. 556-67, 2016.

134. XU, T.; XU, G.; GU, Z.; WU, H. Hedgehog signal expression in articular cartilage of rat temporomandibular joint and association with adjuvant-induced osteoarthritis. **J Oral Pathol Med**. v. 46, n. 4, p. 284-291, 2017.
135. 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.
136. WANG, P.; LIU, C.; YANG, X.; ZHOU, Y.; WEI, X.; JI, Q.; YANG, L.; HE, C. Effects of low-level laser therapy on joint pain, synovitis, anabolic, and catabolic factors in a progressive osteoarthritis rabbit model. **Lasers Med Sci**. v. 29, n. 6, p. 1875-85, 2014.
137. WANG, D. H.; YANG, M. C.; HSU, W. E.; HSU, M. L.; YU, L. M. Response of the temporomandibular joint tissue of rats to rheumatoid arthritis induction methods. **Journal of Dental Sciences**. v. 12, n. 1, p. 83–90, 2017.
138. 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.
139. YOSHIDA, K.; TAKATSUKA, S.; HATADA, E.; NAKAMURA, H.; TANAKA, A.; UEKI, K.; NAKAGAWA, K.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, E.; FUKUDA, R. 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.
140. ZHANG, C.; WANG, P.; JIANG, P.; LV, Y.; DONG, C.; DAI, X.; TAN, L.; WANG, Z. Upregulation of lncRNA HOTAIR contributes to IL-1 $\beta$ -induced MMP overexpression and chondrocytes apoptosis in temporomandibular joint osteoarthritis. **Gene**. v. 586, n. 2, p. 248-53, 2016.
141. 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.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Certidão do comitê de ética no uso de animais CEUA/Unicamp



CEUA/Unicamp

#### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Influência de diferentes protocolos de laser de baixa potência sobre a articulação temporomandibular e músculos da mastigação em ratos (*Rattus norvegicus*) com artrite induzida" (protocolo nº 3797-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari / George Azevedo Lemos, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **06 de abril de 2015**.

Campinas, 06 de abril de 2015.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

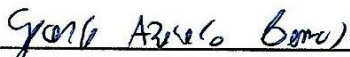
Fátima Alonso  
Secretária Executiva


## 9.2 Declaração de Direitos Autorias

### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Influência de Diferentes Protocolos de Laser de Baixa Potência sobre a Articulação Temporomandibular e Músculos da Mastigação em Ratos com Artrite Induzida**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11/07/2018

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **George Azevedo Lemos**  
RG n.º 3194977

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Evanisi Teresa Palomari**  
RG n.º 11572583