



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ROSANA RODRIGUES MARANA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÔMEGA 3 NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DE DE RATAS OVARIECTOMIZADAS, COM ARTRITE  
REUMATOIDE INDUZIDA**

PIRACICABA

2022

ROSANA RODRIGUES MARANA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÔMEGA 3 NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DE DE RATAS OVARIECTOMIZADAS, COM ARTRITE  
REUMATOIDE INDUZIDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA ROSANA RODRIGUES MARANA, E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. SIDNEY  
FIGUEROBA RAIMUNDO

PIRACICABA

2022

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

M325e Marana, Rosana Rodrigues, 1974-  
Efeito anti-inflamatório do Ômega 3 na articulação temporomandibular de ratas ovariectomizadas, com artrite reumatoide induzida / Rosana Rodrigues Marana. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

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

1. Articulação temporomandibular. 2. Ácidos graxos Ômega-3. 3. Citocinas. 4. Ovariectomia. 5. Inflamação. I. Figueroba Raimundo, Sidney, 1963-. II. Groppo, Francisco Carlos, 1965-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Anti-inflammatory effects of Omega 3 on the temporomandibular joint of ovariectomized rats, with induced rheumatoid arthritis

**Palavras-chave em inglês:**

Temporomandibular joint  
Omega-3 fatty acids  
Cytokines  
Ovariectomy  
Inflammation

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

**Titulação:** Mestra em Odontologia

**Banca examinadora:**

Sidney Figueroba Raimundo [Orientador]  
Luiz Eduardo Nunes Ferreira  
Bruno Vilela Muniz

**Data de defesa:** 30-11-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)  
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6047-5134>  
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5539000306481857>



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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 30 de novembro de 2021, considerou a candidata ROSANA RODRIGUES MARANA aprovada.

PROF. DR. SIDNEY FIGUEROBA RAIMUNDO

PROF. DR. LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA

PROF. DR. BRUNO VILELA MUNIZ

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

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a Deus, por estar sempre presente e por ter me dado força para terminar mais esta etapa de minha vida.

Ao meu esposo, Paulo Cesar Marana, pelo apoio, paciência e compreensão.

Aos meus filhos, Thiago e Matheus, que são minha vida.

Aos meus pais, por sempre prezarem pela minha educação.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do seu magnífico reitor Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles.

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

À coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Gonzales Silvério Ruiz.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cinthia Pereira Machado Tabchoury, Chefe do Departamento de Biociências da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Franz Montan Braga Leite, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo e meu coorientador Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, por toda orientação e apoio para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia na área de farmacologia, anestesiologia e terapêutica da FOP, os quais foram responsáveis por essa etapa importante da minha formação.

A todos que participaram da minha banca examinadora, em todas as etapas, contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

À Sr<sup>a</sup>. Érica Alessandra Sinhoreti, à Sr<sup>a</sup>. Raquel Quintana Sachi e à Sr<sup>a</sup>. Ana Paula Carone Gonzalez, secretárias da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e Leandro Viganó, pela solicitude e presteza de seus serviços.

À Eliane Melo e Maria Elisa dos Santos, pelo carinho e alegria no exercício de suas funções.

Aos amigos, Iago Cortês e Victor Augusto, pelo apoio com a dissertação.

Aos meus grandes amigos Aylla Pestana, Fernanda Ananias, Marco Mafra e José Roberto de Toledo, que sempre, ao longo da minha trajetória deram palavras de ânimo e confiança. Obrigada por compartilharem momentos incríveis comigo.

À amiga Cristiane Okuda por sempre acompanhar e torcer pelo meu sucesso.

## RESUMO

Os efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o eicosapentaenoico do tipo 3 (ômega 3 ou  $\omega$ -3), no processo inflamatório, doenças cardiovasculares e artrite reumatoide (AR) são amplamente aceitos, no entanto o seu impacto sobre a ATM em mulheres na menopausa com AR não tem sido foco na maioria dos estudos clínicos ou em modelo animal. Objetivo é avaliar o efeito do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 ( $\omega$ 3) na articulação temporomandibular (ATM) de ratas ovariectomizadas (OVX) com artrite reumatoide. A artrite reumatoide (AR) foi induzida com adjuvante completo de Freund e colágeno bovino tipo II injetado na base da cauda. Vinte e quatro ratas adultas foram tratadas por gavagem e divididas em quatro grupos:

G1: Sham, tratado com NaCl a 0,9%; G2: OVX, tratado com NaCl a 0,9%; G3: OVX + AR tratado com NaCl a 0,9%; G4: OVX + AR +  $\omega$ 3 tratados com  $\omega$ 3 (300 mg / kg / dia). A indução da artrite reumatoide nos grupos G3 e G4 foi realizada 21 dias após a OVX, os tratamentos foram iniciados 15 dias após a indução da artrite reumatoide, mantidos por 7 dias e sacrificados. Uma das ATM foi submetida à maceração e centrifugação em tampão de extração celular (tris-HCL 50mM, pH 7,5) e, submetida ao imunoensaio (ELISA), para avaliação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL-10). A outra ATM foi preservada por fixação em solução de paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), a 4°C, e parâmetros morfométricos da cabeça da mandíbula foram analisados por micro-TC. Os resultados foram avaliados por ANOVA ou Kruskal-Wallis, na dependência da distribuição dos dados e da homocedasticidade das variâncias. O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). O grupo OVX+AR aumentou a concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e diminuição de IL-10 ( $p < 0,01$ ) em relação aos demais grupos. Níveis mais elevados de citocinas inflamatórias foram encontrados em G2 e G3 ( $P < 0,05$ ) e de citocinas anti-inflamatórias em G1 e G4. A análise da ATM por micro-CT mostrou maior porcentagem de volume ósseo (mediana; desvio interquartil) no G1 (96,2; 1,1) do que no G2 (91,5; 2,0,  $P = 0,0374$ ) e G3 (85,1; 5,2,  $P = 0,0001$ ) mas não mostrou diferenças estatisticamente significativas com o G4 (93,1; 1,7,  $P = 0,79$ ). Conclui-se que ômega-3 reduziu com sucesso os danos na ATM em ratos causados por ovariectomia e artrite reumatoide induzida, e é uma alternativa promissora para reparo ósseo e atenuação de processos inflamatórios.

**Palavras-chave:** Articulação temporomandibular. Ácidos Graxos Ômega-3. Citocinas. Ovariectomia. Inflamação.

## ABSTRACT

The beneficial effects of polyunsaturated fatty acids, especially type 3 eicosapentaenoic ( $\omega$ 3 or  $\omega$ -3), on the inflammatory process, cardiovascular diseases and rheumatoid arthritis (RA) are widely accepted, however their impact on the TMJ in menopausal women with RA has not been the focus of most clinical studies or in an animal model. Objective is to evaluate the effect of  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid ( $\omega$ 3) on the temporomandibular joint (TMJ) of ovariectomized rats (OVX) with rheumatoid arthritis. Rheumatoid arthritis (RA) was induced with Freund's complete adjuvant and type II bovine collagen injected at the base of the tail. Twenty-four adult female rats were treated by gavage and divided into four groups: G1: Sham, treated with 0.9% NaCl; G2: OVX, treated with 0.9% NaCl; G3: OVX + RA treated with 0.9% NaCl; G4: OVX + RA +  $\omega$ 3 treated with  $\omega$ 3 (300 mg / kg / day). Rheumatoid arthritis induction in groups G3 and G4 was performed 21 days after OVX, treatments were started 15 days after rheumatoid arthritis induction, maintained for 7 days and sacrificed. One of the ATMs was subjected to maceration and centrifugation in cell extraction buffer (50mM Tris-HCL, pH 7.5) and subjected to immunoassay (ELISA) for evaluation of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10). The other ATM was preserved by fixation in a 10% paraformaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4), at 4°C, and morphometric parameters of the head of mandible were analyzed by micro-CT. The results were evaluated by ANOVA or Kruskal-Wallis, depending on data distribution and homoscedasticity of variances. The level of significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ). The OVX+RA group increased the concentration of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and decreased IL-10 ( $p < 0.01$ ) compared to the other groups. Higher levels of inflammatory cytokines were found in G2 and G3 ( $P < 0.05$ ) and of anti-inflammatory cytokines in G1 and G4. TMJ analysis by  $\mu$ -CT showed a higher percentage of bone volume (median; interquartile deviation) in G1 (96.2; 1.1) than in G2 (91.5; 2.0,  $P = 0.0374$ ) and G3 (85.1; 5.2,  $P = 0.0001$ ) but showed no statistically significant differences with G4 (93.1; 1.7,  $P = 0.79$ ). It is concluded that  $\omega$ 3 successfully reduced TMJ damage in rats caused by ovariectomy and induced rheumatoid arthritis, and is a promising alternative for bone repair and attenuation of inflammatory processes

**Keywords:** Temporomandibular Joint. Fatty Acids, Omega-3. Cytokines. Ovariectomy. Inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Micro-TC – Microtomografia computadorizada

AA – Ácido araquidônico

AGPI – Ácido graxo poli-insaturado

AINE – Anti-inflamatório não esteroidal

AR – Artrite reumatoide

ATM – Articulação temporomandibular

CFA – Adjuvante completo de Freund

CII – Colágeno bovino do tipo II

COX – Cicloxigenase

DHA – Ácido docosa-hexaenóico

DTM – Disfunção temporomandibular

EPA – Ácido eicosapentaenóico

IL – Interleucina

LOX – Lipoxigenase

OA – Osteoartrite

OVX – Ovariectomizadas

PGE2 – Prostaglandina E2

TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformador beta

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1 DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR.....	15
2.2 ARTRITE REUMATOIDE.....	16
2.2.1 Métodos de indução de artrite reumatoide.....	17
2.3 CITOCINAS .....	18
2.4 HORMÔNIOS GONODAIS.....	20
2.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICOS .....	21
2.5.1 Ácidos graxos poli-insaturados na inflamação .....	22
2.6 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E A ANÁLISE ÓSSEA.....	24
3 PROPOSIÇÃO .....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
4.1 MATERIAIS.....	27
4.2 ANIMAIS E COMISSÃO DE ÉTICA.....	27
4.2.1 Exame colpocitológico (Citologia Vaginal).....	28
4.2.2 Ovariectomia .....	28
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	28
4.3.1 Indução de artrite e administração de medicamentos .....	29
4.3.2 Obtenção dos tecidos.....	29
4.3.3 Imunoensaio .....	29
4.3.4 Preparo das amostras e obtenção das imagens por micro-TC .....	30
4.3.4.1 Reconstrução e análise das imagens obtidas e análise .....	30
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
5 RESULTADOS .....	32
5.1 MASSA CORPORAL .....	32
5.2 CITOCINA .....	32
5.3 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	33
5.3.1. Percentual de volume ósseo .....	35
5.3.2 Espessura trabecular .....	35
5.3.3 Número trabecular .....	35
5.3.4 Espaçamento trabecular.....	36

5.3.5	Volume de poros abertos .....	36
5.3.6	Porosidade aberta .....	36
6	DISCUSSÃO .....	37
7	CONCLUSÃO .....	40
	REFERÊNCIAS .....	41
	ANEXOS .....	55
	Anexo 1 – Comitê de Ética .....	55
	Anexo 2 – Relatório de Similaridade .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica que afeta articulações e ossos. É progressiva e desencadeada por fatores imunológicos, genéticos e ambientais (Lee e Weinblatt, 2001). A causa da AR não é totalmente conhecida; no entanto, ambos os processos autoimunes, adaptativos e inatos, desempenham papéis importantes na patogênese da doença (Holmdahl et al., 2014; Wang et al., 2017). A erosão óssea geralmente ocorre nas articulações das mãos e dos pés em pacientes acometidos pela AR (Miles e Calder, 2012). A articulação temporomandibular (ATM) é menos afetada por apresentar diferentes características morfológicas, biomecânicas funcionais e biológicas em relação às outras articulações sinoviais (Embree et al., 2011).

Apesar dessas diferenças, a ATM está sujeita aos mesmos distúrbios que afetam outras articulações sinoviais, incluindo AR (Aliko et al., 2011), podendo ser grave, debilitante e comprometer todo o sistema de mastigação (Dimitroulis, 2005). As lesões articulares são caracterizadas pela infiltração de células imunes que produzem altas concentrações de vários mediadores químicos (Miles e Calder, 2012). O aumento do nível de citocinas inflamatórias, como a interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandina (PGE2) no líquido sinovial têm sido encontrado no desarranjo interno da ATM, no deslocamento anterior do disco e na osteoartrite (OA) e na AR (Figueroba et al., 2018).

A degeneração da cartilagem articular na disfunção temporomandibular (DTM) é mais frequente em mulheres do que em homens, sugerindo uma possível contribuição dos hormônios gonadais femininos nessa fisiopatologia. Muitos fatores, como idade, sexo, fatores hormonais, traumas e estresse psicológico podem levar a uma adaptação fisiológica ou, caso contrário, ao desarranjo interno da ATM (Figueroba et al., 2014).

O estrogênio é um hormônio gonadal conhecido por regular diversos processos fisiológicos em tecidos-alvo de ambos os sexos (Galal et al., 2008), e em concentrações fisiológicas, o estrogênio desempenha um papel na remodelação da ATM (Yasuoka et al., 2000). Os hormônios gonadais têm um impacto significativo sobre o desenvolvimento de doenças autoimunes em humanos e roedores (Yoneda et al., 2004). Na fisiopatologia da inflamação articular, os estrogênios desempenham funções especializadas, como na presença do estradiol na AR, onde os níveis de IL-6 em sinoviócitos mostraram-se aumentados (Kawasaki et al., 2000). Além disso, os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) apresentaram-se aumentados também em ratas ovariectomizadas (OVX), provavelmente devido a uma redução extrema na produção gonadal (Figueroba et al., 2015).

A IL-1 $\beta$  é um importante fator no desenvolvimento da patologia da AR, que pode ser detectada na cavidade articular (Morin et al., 2015). Ainda baixos níveis de IL-10 anti-inflamatória foram detectados em pacientes com AR e animais induzido por adjunto completo de freund (CFA) (Arab et al., 2017). Células imunológicas envolvidas na AR geralmente contêm uma alta proporção do ácido araquidônico (AA) e baixa proporção de outros ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) de 20 carbonos, sendo que o AA é considerado o principal substrato para síntese de eicosanoides (Calder et al., 2009).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e esteroidais são utilizados para aliviar a dor em processos inflamatórios e em doenças autoimunes, sem reduzir danos a cartilagem e a destruição óssea articular (Cessak et al., 2014). No entanto, as administrações em longo prazo destes fármacos podem causar efeitos colaterais graves, tais como risco cardiovascular e distúrbios gastrointestinais (Cessak et al., 2014), osteoporose, diabetes mellitus, ganho de peso, aumento da pressão sanguínea, do risco de insuficiência cardíaca e cardiovascular (Calder et al., 2009). Não há cura para a AR e o objetivo do tratamento é a remissão dos sintomas para um estado em que a inflamação desapareça, ou seja muito leve (Flurey et al., 2014). Os anti-inflamatórios esteroidais, injetados intra-articularmente ou extra-articularmente, tornaram-se padrão-ouro para o tratamento da AR (Caporali et al., 2013), contudo, o uso prolongado ou repetitivo via intra-articular pode causar um colapso na articulação (Sidebottom e Salha, 2013). Outros fármacos são descritos no controle da reabsorção condilar na AR: como ômega-3, tetraciclinas, estatinas e inibidores do receptor de IL-6 (denosumab, tocilizumab) (Gunson et al., 2012), bloqueadores de TNF- $\alpha$ , como o infliximab (Bevaart et al., 2010). A suplementação com sulfato de glicosamina, apresenta um efeito condroprotetor na ATM de ratas OVX (Figueroba et al., 2021).

Em mulheres na menopausa a utilização do ômega 3 tem uma atividade condroprotetora articular, competindo com o estoque de AA e levando à inibição da produção de eicosanoides pró-inflamatórios. (Serhan et al., 2009). Dessa maneira, mediante interferências na regulação gênica e no metabolismo, o ômega 3 poderia desempenhar um papel modulador das reações inflamatórias, sejam agudas ou crônicas. Estudos relataram que os AGPIs ômega 3 de cadeia longa têm propriedades anti-inflamatórias que podem ser benéficas nas terapias inflamatórias, doenças cardiovasculares, artrite e doença inflamatória intestinal (Olson et al., 2013), pois são constituintes importantes dos fosfolipídios de todas as membranas celulares, onde desempenham um papel na permeabilidade iônica da membrana (Calder, 2013). Estudos em animais demonstraram que esses ácidos graxos ômega 3 reduziram a incidência e gravidade da AR (Knott et al., 2011).

Com base nos dados da literatura, a administração de AGPIs ômega 3 ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) reduzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e aumentam a liberação de a citocina anti-inflamatória (IL-10), podendo reduzir os possíveis danos na estrutura óssea da ATM em ratas ovariectomizadas e com AR induzida.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

A ATM é uma articulação do tipo sinovial. É a principal conexão entre o crânio e a mandíbula, entre as suas funções as mais importantes são mastigação e fala. A ATM tem despertado um grande interesse do ponto de vista estrutural, funcional e adaptabilidade, sendo que, as ATMs direita e esquerda formam uma articulação bicondilar elipsoide, entre as articulações sinoviais se assemelha a articulação do joelho (Alomar et al., 2007).

Inúmeras doenças, como neoplasias, traumas, anquilose e doenças degenerativas podem afetar a ATM e levar à perda de suas estruturas. Estudo realizado por Porto et al. (2010) mostra que existe uma semelhança nas características morfológicas e histológicas entre as ATM de ratos e humanos, sendo que o côndilo articular de rato e humano é revestido por uma espessa camada de cartilagem, principalmente do tipo hialina.

A ATM como as demais articulações sinoviais, apresenta disco articular, osso, cápsula fibrosa, líquido sinovial, membrana e ligamentos. Os movimentos não são apenas guiados pela forma dos ossos, músculos, e ligamentos, mas também pela oclusão dos dentes, uma vez que ambas as articulações são unidas pela mandíbula sendo um único osso (Alomar et al., 2007). No entanto, o que torna esta articulação única é sua superfície articular revestida por fibrocartilagem constituída por colágeno tipo I e as zonas celulares mais profundas que contêm colágeno tipo II (Ghassemi et al., 2017), sendo uma característica única da ATM em comparação com outras articulações contendo cartilagem hialina, que são constituídas inteiramente de colágeno tipo II (Embree et al., 2011). A ATM apresenta diferentes características morfológicas, biomecânicas funcionais e biológicas em relação a outras articulações sinoviais (Embree et al., 2011).

A DTM é uma das as causas mais comuns de dor orofacial, é heterogênea, e diferentes condições podem afetar a ATM. Podendo apresentar alguns sinais e sintomas, como: dor articular, clique, estalo, limitação na abertura, desvio mandibular na abertura e no fechamento, sensibilidade e rigidez muscular, cefaleias, dor e fenômeno otológico, dor e rigidez cervical (De Leeuw e Klasser, 2008). Sua prevalência populacional é considerável em pessoas com idade entre 20-40 anos (Yadav et al., 2018).

Estudos tem sugerido o envolvimento do o hormônio sexual feminino estrogênio nessa patogênese (Warren e Field, 2001; Cairns, 2010), e no mecanismo de modulação da dor, uma vez que mulheres apresentam maior sensibilidade para a maioria das modalidades de dor, devido ao aumento na excitabilidade da dor causada pelo estrogênio (Fillingim et al., 2009;

Bereiter e Okamoto, 2011). Existem relatos sugerindo uma possível contribuição dos hormônios gonadais no processo degenerativo da cartilagem articular da ATM. A inflamação também desempenha um papel na DTM, especialmente em casos associados com artrite, trauma e desarranjo da cartilagem articular (Figueroba et al., 2015). Além disso, há algumas evidências que ansiedade, estresse e outros distúrbios emocionais são fatores agravante das DTMs (Ouanounou et al., 2017).

Os tratamentos das DTMs são direcionados à redução da dor e melhora da função, terapias não invasivas, como autocuidado, fisioterapia e eletroterapia, são comumente usadas (Ouanounou et al., 2017). Agentes farmacológicos tem sido usado no tratamento e na redução dos sintomas, o mais utilizado e eficaz no tratamento da DTM inclui analgésicos, AINEs, opioides, anti-inflamatórios esteroidais, ansiolíticos, relaxantes musculares, antidepressivos, anticonvulsivantes e benzodiazepínicos (Mujakperuo et al., 2011).

## 2.2 ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença progressiva, sistêmica e autoimune, relacionada à produção de anticorpos e incapacitante, afeta mais de 1% da população mundial (Bevaart et al., 2010). Embora o padrão autoimune seja enfatizado, vários fatores contribuem para o desenvolvimento da doença, como predisposição genética, fatores biológicos, hormonais e ambientais (Mehra et al., 2009). É caracterizada por inflamação sinovial crônica, inchaço, destruição da cartilagem e dano articular (Scott et al., 2018; Krasselt e Baerwald, 2019). A patogênese da AR ainda não está bem elucidada e compreendida. Os linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e as células dendríticas estão envolvidas na inflamação da membrana sinovial e junção cartilagem tecido conjuntivo de origem inflamatória granular (Pannus), provocando um aumento na resposta inflamatória e destruição progressiva de cartilagem e osso (Liu et al., 2015).

Esse aumento na resposta inflamatória é provavelmente devido à indução de enzimas destrutivas mediada por citocinas e eicosanoides, como metaloproteinases de matriz (Burska et al., 2014). As células imunológicas envolvidas na AR geralmente contêm uma alta proporção de AA e baixas proporções de outros AGPIs, sendo o AA considerado o principal substrato para síntese de eicosanoides (Morin et al., 2015). Eicosanoides produzidos tanto pela COX quanto pela lipoxigenase (LOX) são encontradas no líquido sinovial de pacientes com AR ativa (Kojima et al., 2002). Células do sistema imune desreguladas induzem uma superprodução de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , resultando em um desequilíbrio na atividade das citocinas pró-inflamatório e anti-inflamatórias levando ao dano articular (Burmester et al., 2014). O líquido sinovial de pacientes com AR contém altos níveis

de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (Morin et al., 2015).

A ATM é suscetível ao desenvolvimento de alterações em decorrência da AR. No entanto, raramente é a primeira articulação a ser comprometida (Mehra et al., 2009; Yilmaz et al., 2012). Estima-se que mais da metade de os pacientes com AR apresentam evidências clínicas de envolvimento da ATM (Mehra et al., 2009; Klareskog et al., 2010). A osteoartrite (AO) da ATM também é um subtipo importante de DTM que tem uma alta preponderância feminina para masculina (2:1) (Zhang et al., 2019) e é caracterizada por degradação progressiva da cartilagem, erosão óssea subcondral e dor crônica (Wang et al., 2015).

Uma das principais causas da dor é a sinovite temporomandibular, ou seja, inflamação na membrana sinovial da ATM. Vários biomarcadores são secretados no líquido sinovial da ATM, citocinas, eicosanoides, fatores de crescimento e proteinases (Ernberg, 2017). A erosão óssea geralmente ocorre nas articulações das mãos e dos pés (Miles e Calder, 2012), contudo, a ATM está sujeita aos mesmos distúrbios que afetam outras articulações sinoviais, incluindo AR (Aliko et al., 2011)

, podendo ser grave, debilitante e comprometer todo o sistema de mastigação (Dimitroulis, 2005).

### 2.2.1 Métodos de indução de artrite reumatoide

Várias abordagens têm sido adotadas para induzir inflamação aguda ou crônica na ATM em modelos animais, tais como o aumento de dimensão vertical, rompimento da zona bilaminar e hiper mobilidade induzida no côndilo (Embree et al., 2011; Figueroba et al., 2014). A inflamação aguda também pode resultar da injeção de agentes irritantes químicos, incluindo a carragenina, a ovalbumina (Habu et al., 2002) e o adjuvante completo de Freund ou CFA (Denadai-Souza et al., 2009; Wu et al., 2010; Kou et al, 2011; Wang et al., 2012; Holwegner et al., 2015). A AR induzida com colágeno do tipo II em ratos tem muitas semelhanças com a artrite humana, sendo que as fêmeas são mais suscetíveis. O início da artrite é rápido, geralmente entre 10 a 13 dias após a indução, atingindo o pico após 20 dias e depois declinando gradualmente (Hegen et al., 2008).

Vários modelos de indução de AR em roedores são utilizados (Tabela 1), todos resultam em inflamação excessiva seguido pela destruição de uma ou mais articulações, tais como edema de extremidades, hiperplasia sinovial, proliferação de tecido sinovial. A administração de antígenos como: albumina sérica bovina, auto antígeno colágeno tipo II e proteoglicano de cartilagem humana, e também antígenos bacterianos, como parede celular

peptidoglicanos de *Streptococcus*, e *Mycobacterium* em CFA (Brand, 2005). O CFA é composto de *Mycobacterium tuberculosis* mortos e secos em óleo, que induz a artrite reumatoide patologicamente idêntica àquela que ocorre em seres humanos (Bendele, 2001). A injeção do CFA é simples e reprodutível, com foco na fase aguda da inflamação (Flake et al., 2006; Wu et al., 2010; Kou et al., 2011). A inflamação dos tecidos da ATM pode ser um fator predisponente para as anormalidades estruturais (Wang et al., 2012). Alguns estudos são relatados com indução sistêmica de artrite o com associação de CFA e colágeno bovino tipo II (CII) (Olson et al., 2013; Liu et al., 2015; Morin et al., 2015).

Tabela 1 – Modelos de indução de artrite reumatoide

Modelo	Tipo	Antígeno	Via	Espécie	Adjuvante	Duração
Antígeno	Induzido	Albumina Sérica Bovina Ovalbumina	Intra-articular	Camundongo, Rato e Coelho	CFA	2 meses
Artrite adjuvante	Induzido	Antígenos <i>Mycobacterium</i>	Intradérmica	Rato e Coelho	CFA	10 dias – 1 mês
Artrite de anticorpos	Induzido	Anticorpos para colágeno tipo II	Intravenosa	Camundongo	Nenhum	3 dias – 3 semanas
Artrite da parede celular estreptocócica	Induzido	Peptido- Glicano de <i>Streptococcus</i>	Intraperitoneal	Rato e Coelho	Nenhum	2 dias – 6 semanas
Artrite induzida por proteoglicano	Induzido	Proteoglicano de cartilagem humana	Intraperitoneal	Coelho, Cachorro e Camundongo	CFA	7 semanas - 5 meses
<b>Artrite induzida por colágeno</b>	<b>Induzido</b>	<b>Colágeno tipo II</b>	<b>Intradérmica</b>	<b>Rato, Camundongo, Primata</b>	<b>CFA</b>	<b>2 semanas – 2 meses</b>

Fonte: Adaptação de Brand, 2005.

### 2.3 CITOCINAS

A destruição do tecido articular induz a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, no espaço articular (Damlar et al., 2015). A PGE2 e o Leucotrieno B4 (LTB4), dois eicosanoides produzidos respectivamente pela COX e LOX, exibem uma série de efeito pró-inflamatório (incluindo aumento da permeabilidade vascular), aumentam o fluxo sanguíneo local, são potentes agentes quimiotáticos para leucócitos, induzem a liberação de enzimas lisossomais e aumentam a liberação de espécies reativas de oxigênio e citocinas (Morin et al., 2015). Entre as citocinas, aquelas que promovem a cascata de inflamação são consideradas mediadores pró-inflamatórios incluindo as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , quimiocina e famílias de interferon. Enquanto citocinas anti-inflamatórias, como antagonista do receptor

de IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13 são produzidas para proibir o processo, regulando respostas de citocinas pró-inflamatórias (Boshtam et al., 2017).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, a TNF- $\alpha$  é a principal e regula a formação de outros mediadores inflamatórios no tecido sinovial (Brzustewicz e Bryl, 2015). A TNF- $\alpha$  é um membro da família de mediadores de peptídeos que atua como mensageiro químico intercelular em processos inflamatórios. Os monócitos e macrófagos são as principais fontes de produção de TNF- $\alpha$ , mas outras células, como linfócitos T e linfócitos B, *natural killers*, mastócitos, células endoteliais, neutrófilos, células musculares lisas e cardíacas também podem liberar essa citocina (Boshtam et al., 2017). O TNF- $\alpha$ , como uma importante citocina pró-inflamatória, tem também papéis críticos na apoptose, proliferação celular e imunidade. As interações e desregulações das células imunológicas podem induzir a superprodução de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , resultando em um desequilíbrio entre pró-inflamatório e atividade de citocinas anti-inflamatórias e danos nas articulações (Burmester et al., 2014).

Elevado nível de IL-6 tem sido identificado, tanto no soro quanto nos tecidos sinoviais de pacientes com AR (Rincon, 2012). A IL-6, semelhante ao TNF- $\alpha$  e IL-1, é um marcador de inflamação contínua. Além disso, embora a AR e a AO sejam ambas doenças inflamatórias, as concentrações de IL-6 foram encontradas elevadas no líquido sinovial de pacientes com AR, mas não na OA, indicando que IL-6 não se acumula em todos os tipos de respostas inflamatórias (Kishimoto, 2010).

A IL-6 exibe uma ação pró-inflamatória via estimulação da secreção de IL-1, que por outro lado, revela efeito anti-inflamatório, por meio de diferentes mecanismos de ação. Pode estimular a síntese de IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) gerando efeito anti-inflamatório (Boshtam et al., 2017). A família da IL-10, que consiste em nove membros, são indispensáveis em muitos processos infecciosos e doenças inflamatórias ante a resposta imune adaptativa, além disso, exerce papel anti-inflamatório, principalmente inibindo as citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, fator estimulador de colônia de granulócitos, proteína inflamatória de macrófagos 1 e 2 (Boshtam et al., 2017).

Estudos mostraram que a IL-10 pode desempenhar um papel importante na promoção da restauração da tolerância em doenças autoimunes, incluindo a AR induzida (Carter et al., 2011; Silva Quinteiro et al., 2014). As citocinas pró-inflamatórias mais representativas no líquido sinovial em pacientes com DTM são IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas promovem a expressão de eicosanoides, quimiocinas e proteínas em sinoviócitos da ATM pela membrana sinovial, induzindo a progressão e expansão da inflamação na ATM (Ibi, 2019).

Outros estudos também mostraram que a injeção intra-articular de CFA na ATM induziria um aumento no nível de IL-1 $\beta$  no tecido do disco da ATM (Wang et al., 2012). A indução sistêmica inflamatória com CFA+CII em outras articulações também mostrou um aumento da IL-1 $\beta$  (Olson et al., 2013), TNF- $\alpha$  (Liu et al., 2015; Ma et al., 2017) e de ambas as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Morin et al., 2015; Xu et al., 2016). Estudo realizado por Barbin et al., 2020 mostrou que a indução sistêmica com injeção na cauda de rato afetou a ATM com níveis de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  aumentado e IL-10 diminuído.

## 2.4 HORMÔNIOS GONODAIS

O sexo feminino tem uma prevalência maior para quase todos os problemas de dor que afetam a cabeça, pescoço e região orofacial. Cefaleias autonômicas dos nervos trigêmeo e glossofaríngeo e as neuralgias são exceções (Shaefer et al., 2018). A maior predisposição das DTMs é em mulheres, especialmente durante a puberdade com gônadas intactas ou anos reprodutivos, indicando que o estrogênio desempenha um papel importante na progressão da DTM, mas o seu mecanismo ainda permanece não elucidado. Ao contrário de outras doenças articulares com predileção feminina ocorrer no pós-menopausa, as DTM acometem mulheres entre 18 e 45 anos (Ye et al., 2018).

Estatísticas clínicas sugerem a participação do estrogênio na remodelação da ATM no processo de doenças inflamatórias e DTM, regulado por meio de duas isoformas de receptor, receptor de estrogênio alfa e beta. A ligação do ligante de estrogênio a qualquer receptor induz uma mudança organizacional, dimerização do receptor, translocação nuclear e transcrição do gene alvo (Robinson et al., 2017). Alguns estudos têm mostrado o papel do estrogênio ou de sua deficiência na DTM, porém, não há consenso a esse respeito (Kou et al., 2011; Robinson et al., 2017)

A destruição do tecido articular induz a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, no espaço articular (Damlar et al., 2015). Os hormônios gonadais mostraram ter efeito anti-inflamatório, e devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, níveis fisiológicos de testosterona e estrogênio podem reduzir os danos à organização reticular e diminuir a perda de colágeno e glicosaminoglicanos na matriz extracelular (Ganesan et al., 2008). Embora alguns estudos tenham mostrado que a OVX aumente a espessura da cartilagem condilar e evidencie mudanças degenerativas, em oposição, outros estudos demonstram que a reposição de estrogênio pode restaurar a maioria dos parâmetros histomorfométricos alterados (Ye et al., 2018).

O tratamento com 17beta-estradiol reduziu a espessura da cartilagem articular em ambos os sexos e acelerou o processo de diferenciação da cartilagem em osso, sendo que este efeito foi mais proeminente em mulheres. Esses resultados confirmam a importância dos efeitos de hormônios gonadais na morfologia da cartilagem condilar e nos níveis de citocina da ATM modulado pelo estrogênio, especialmente nos níveis de IL-6 (Figueroba et al., 2015). Níveis aumentados de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 são encontrados em ratas OVX, além disso, é observado diminuição dos níveis de IL-6 em decorrência da diminuição dos hormônios gonadais, e aumentado na presença de estrogênio, demonstrando que os hormônios gonadais são essenciais para aumentar a liberação de IL-6 em ratas (Figueroba et al., 2015; Figueroba et al., 2021).

No entanto, poucos estudos se concentraram em como o estrogênio afeta a anormal remodelação óssea subcondral da ATM em AR. Embora o estrogênio desempenhe um papel importante na manutenção da homeostase óssea, ele pode ser benéfico para pacientes com OA em estágio inicial ou mulheres na pós-menopausa com OA osteoporótica (Xiao et al., 2016). A remodelação disfuncional evidente e reabsorção do osso condilar subcondral é observado em OA da ATM induzida por mordida cruzada anterior unilateral, sendo que a suplementação de estrogênio reverteu a anormal reabsorção óssea, além disso, em condições fisiológicas, o estrogênio desempenha um papel positivo nas alterações degenerativas do osso subcondral condilar (Ye et al., 2018). Os hormônios gonadais têm um impacto significativo sobre o desenvolvimento de doenças autoimunes em humanos e roedores (Yoneda et al., 2004).

## 2.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICOS

Os tratamentos atuais para a AO e AR da ATM são principalmente terapias sintomáticas para controlar a dor e a inflamação e não existe atualmente nenhuma estratégia modificadora da doença eficaz para reparar e regenerar a ATM danificada (Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2019). Apesar de décadas de desenvolvimento de drogas para AR, ainda há a falta de abordagens terapêuticas viáveis para a prevenção e tratamento.

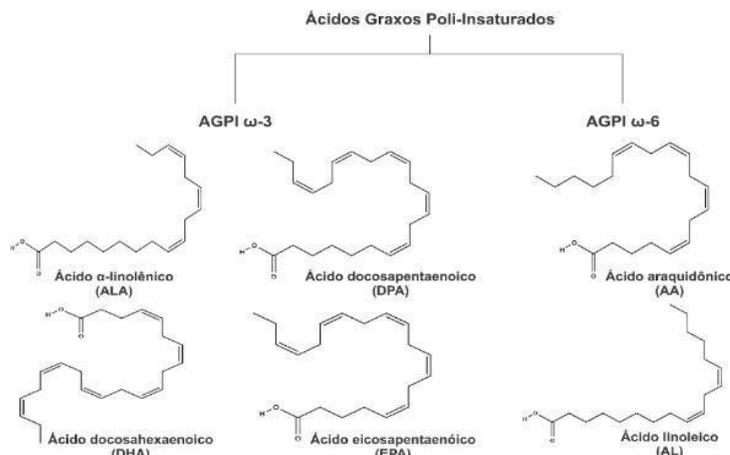
A PGE2 é associada a dor articular, e, portanto, o uso de terapias com AINEs são destinadas a controlar a dor aguda e a inflamação. Os AINEs estão entre os medicamentos mais prescritos para o controle dos transtornos da ATM (Dym e Israel, 2012). Regimes de tratamento variam nove dias a um mês (Gauer e Semidey, 2015), principalmente devido a efeitos colaterais. Os AINEs não seletivos a COX-2 são conhecidos por causar graves efeitos colaterais, especialmente irritação gastrointestinal (Turajane et al., 2009).

Apesar de não haver a cura, os tratamentos para as DTMs podem variar muito, dentre os tratamentos menos invasivos estão o autocuidado, terapia farmacológica, fisioterapia, acupuntura e placas de oclusão. Nesse caso, fármacos anti-inflamatórios esteroidais, AINEs, analgésicos e relaxantes musculares são os mais comuns para aliviar os sintomas (Dym e Israel, 2012; Figueroba et al., 2014). Há também tratamentos considerados invasivos, como aplicações de anti-inflamatórios esteroidais via intra-articular, podendo causar efeitos adversos e reações erosivas no osso e cartilagem (Habib, 2009; Caporali et al., 2013; Romero-Reyes e Uyanik, 2014). O uso sistêmico de anti-inflamatórios em ratos saudáveis mostrou uma diminuição da espessura da cartilagem articular da ATM (Figueroba et al., 2018).

Os AGPI ômega 3 como EPA e DHA, que são encontrados em lipídios de peixes gordurosos, no fígado de peixes brancos magros e na gordura de mamíferos marinhos, têm participação na resolução da inflamação. Sua administração demonstra ótimos resultados no combate da inflamação em osteoartrites (Akbar et al., 2017), inclusive na ATM de ratos (Barbin et al., 2020), já que esses ácidos são constituintes muito importantes da membrana fosfolipídica e o desequilíbrio da ingestão desses ácidos contribuem para um perfil inflamatório danoso para o ser humano (Calder, 2015).

### 2.5.1 Ácidos graxos poli-insaturados na inflamação

Os AGPIs são muito importantes para o controle efetivo da inflamação (Calder, 2015). Os AGPIs contém duplas ligações em suas moléculas e isso causa instabilidade ao calor, acarretando grandes perdas no processamento de alimentos contendo AGPIs e na exposição de altas temperaturas, sendo convertidos em gordura trans, altamente danoso ao ser humano (Schaefer, 2002). As duas maiores famílias de AGPIs de cadeias longas são o  $\omega$ 3 e ômega 6 ( $\omega$ 6) (Figura 1).



**Figura 1.** Principais ácidos graxos poli-insaturados das famílias  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6

Fonte: Adaptação de Saini e Keum, 2018

Nessas famílias encontramos ácidos graxos que não são sintetizados pelo ser humano, sendo assim chamados de ácidos graxos essenciais (Schaefer, 2002; Schmitz e Ecker, 2008).

Acredita-se que os diferentes tipos de ácidos graxos tenham efeitos distintos na inflamação, ácidos graxos saturados ou AGPIs  $\omega 6$  têm mais efeito pró-inflamatório, enquanto AGPIs  $\omega 3$  têm efeito anti-inflamatório. Vários estudos investigaram os efeitos da dieta enriquecida com ácidos graxos, uma dieta rica em AGPIs  $\omega 3$  reduziu danos estruturais associados à OA em comparação com a dieta rica em ácidos graxos saturados ou AGPIs  $\omega 6$  (Loef et al., 2019).

Na família do ômega 3 estão incluídos o ácido  $\alpha$ -linolênico, EPA, ácido docosapentaenoico e DHA. Na família do  $\omega 6$  estão incluídos o ácido linoleico e o AA, além disso, ambas famílias de AGPIs competem pela mesma via de metabolização (Wada et al., 2007; Schmitz e Ecker, 2008; Morin et al., 2015). Os AGPIs  $\omega 3$  e  $\omega 6$  são incorporados nas membranas celulares, liberados de fosfolipídios de membrana e constituem substratos para a síntese de eicosanoides, ou seja, prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Os eicosanoides decorrentes do AA ( $\omega 6$ ) induzem uma resposta inflamatória por prostanoídes da série 2 que são sintetizados. A PGE2 também pode induzir um efeito anti-inflamatório pelo aumento da produção de lipoxina por indução de LOX-15 (Wada et al., 2007; Wiktorowska-Owczarek et al., 2015). Eicosanoides derivados do AA são responsáveis pela pró-agregação e efeito de vasoconstrição (tromboxano A2 e tromboxano B2) e proliferação de células cancerosas, especialmente de mama, colorretal e câncer de próstata (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015).

Os principais sinalizadores, responsáveis pela regulação e mediação de processos inflamatórios são os eicosanoides. São derivados do AA, ácido dihomogama-linolênico, EPA e DHA, que quando metabolizados pelas COX-1, COX-2, LOX-5 e LOX-15, dão origem as prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos, os principais eicosanoides (Tilley et al., 2001).

A alta concentração de AA é responsável por uma participação direta na inflamação, promovendo ação pró-inflamatória, agregação plaquetária e vasoconstrição, atuando como substrato para as COX, LOX, e demais enzimas que sintetizam os eicosanoides. Por outro lado, quando essas enzimas encontram altas concentrações de EPA e DHA, suas metabolizações têm uma participação na resposta anti-inflamatória, promovendo vasodilatação, impedindo a agregação plaquetária e mediando a inflamação (Tilley et al., 2001; Ruiz-Lopez et al., 2014).

Diferentemente do AA, que a sua metabolização origina prostaglandinas e tramboxanos de série 2 e leucotrienos de série 4, a metabolização do EPA origina prostaglandinas e tramboxanos de série 3 e LT de série 5 através da COX-2 e LOX-5 respectivamente (Wada et al., 2007). O DHA por sua vez é metabolizado em resolvinas de série D e protectinas através da LOX-15 (Dennis e Norris, 2015; Fonseca et al., 2017). Produção de lipoxinas e resolvinas, bem como oxilipinas de ambos os grupos de poli-insaturados ácidos graxos permite a extinção do curso do processo inflamatório; a falta de tal reação pode contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamação crônica ou tecido excessivo danoso e desenvolvimento de várias doenças cuja patogênese está associada a processos inflamatórios (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015).

Os ácidos graxos ômega 3 têm propriedades anti-inflamatórias e atividade antialérgica, predominantemente por meio de a inibição da resposta imunológica excessiva, competindo para enzimas mútuas com ácidos graxos  $\omega 6$  na via metabólica. Eles diminuem a síntese de compostos pró-inflamatórios (LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, IL-1, TNF- $\alpha$ ), bem como estimulam a síntese de citocinas com ação anti-inflamatória (IL-2, TGF- $\beta$ ). O alívio dos sintomas inflamatórios foi observado após a administração de ômega 3 no caso de AR, colite ulcerativa, asma, psoríase e outras doenças autoimunes. Além disso, existem alguns relatórios mostrando que eles também podem aliviar o curso de processos inflamatórios de bactéria ou origem viral (Chan et al., 2005; Wiktorowska-Owczarek et al., 2015). O ômega 3 reduziu com sucesso o dano nas ATMs de ratos machos com AR induzida, portanto pode ser uma alternativa promissora. Além disso, a administração de  $\omega 3$  tem um efeito comparável aos anti-inflamatórios esteroidais em animais com AR induzida (Barbin et al., 2020).

## 2.6 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E A ANÁLISE ÓSSEA

O uso de imagem de alta resolução por meio de microtomografia computadorizada (micro-TC) para avaliar morfologia cortical óssea e trabecular em animais e humanos (ex-vivo) cresceu imensamente. As técnicas histológicas quantitativas eram o padrão ouro para avaliar a arquitetura do osso cortical e trabecular, embora as análises histológicas forneçam informações exclusivas sobre celularidade e índices dinâmicos de remodelação óssea, elas têm limitações com relação à microarquitetura óssea. Imagem da microarquitetura óssea em alta resolução 3D por micro-TC mostrada por Feldkamp et al (1989) sem depender de parâmetros morfométricos, tornou-se o padrão ouro para avaliação da morfologia óssea de camundongos e outros animais pequenos (Bouxsein et al., 2010).

A excelente reprodutibilidade e precisão das medições em micro-TC da morfologia óssea foram estabelecidos em vários estudos comparando-os com medidas tradicionais da histomorfometria em animais (Bonnet et al., 2009) e em humanos (Chappard et al., 2005). Atualmente, o scanner do micro-TC alcança um tamanho de voxel isotrópico de alguns micrômetros, o que é suficiente para investigar estruturas como como trabéculas ósseas de camundongo que têm larguras de aproximadamente 30 a 50  $\mu\text{m}$ . (Martín-Badosa et al., 2003),

O primeiro estudo a quantificar a morfologia óssea usando micro-TC foi para avaliar alterações do osso subcondral em ratos com osteoartrite. A partir deste estudo, a micro-TC tem sido usada para uma ampla gama de estudos relacionado ao volume ósseo e morfologia óssea: incluindo análise de crescimento e desenvolvimento (Hankenson et al., 2005) e modelos em animais OVX com osteoporose pós-menopausa (Bouxsein et al., 2005). Além disso, micro-TC é usado para avaliar os efeitos das intervenções farmacológicas (Von Stechow et al., 2004), fissuras em imagem de osso cortical (Uthgenannt e Silva, 2007), para avaliar a consolidação da fratura (Morgan et al., 2009).

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo nesse estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório e protetor do ômega 3 na ATM de ratas OXV com artrite reumatoide induzida, por meio da análise da concentração de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e da avaliação morfométrica da cabeça da mandíbula".

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Foram utilizados para anestesia animais a associação de cloridrato de quetamina injetável (Vertinil, Louveira-SP, Brazil) e cloridrato de xilasina injetável (Anasedan, Sespo Paulínia-SP, Brazil). Outras substâncias utilizadas: suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* (CFA) a 4mg/mL, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), colágeno bovino tipo II (CII) Becton Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), solução salina estéril 0,9% injetável SAMTEC® (Santec Biotecnologia LTDA- São Paulo, Brasil),  $\omega$ 3 (OmegaPure 90%®, EPA 235mg + DHA 165mg, Biobalance Nutraceuticals, Porto Feliz-SP, Brasil), citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, kits de ELISA (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA).

### 4.2 ANIMAIS E COMISSÃO DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia/UNICAMP com protocolo no 5455-1/2019 (Anexo 1). O delineamento dos grupos experimentais foi feito conforme o cálculo amostral disponibilizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, adotando-se: valor crítico para grau de confiança de 95% (1,96); desvio máximo 0,2236 (22,36%), baseado no estudo anterior da literatura e experimentos preliminares; erro padrão mínimo que se deseja encontrar de  $\pm 5\%$  da média (50%); e nível de significância de  $p < 0,05$ . Segue o cálculo:  $n = 1 + [2C \times (s/d)^2]$   $n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2236/0,5)^2]$   $n = 1 + [21,02 \times (0,4472)^2]$   $n = 1 + [21,02 \times 0,2]$   $n = 1 + 4,204$   $n = 5,204$ . O número deve ser arredondado para o próximo número inteiro, ou seja,  $n = 6$  animais.

Foram utilizadas 24 ratas, adultas (*Rattus norvegicus* albinus, Winstar, SPF\*\*\*\*\*<sup>1</sup> com 10 a 12 semanas de vida, com peso entre 250 a 300g.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e passaram uma semana de adaptação ambiental após o transporte antes do início do experimento. Foram mantidos em regime de água e alimentação *ad libitum*, à temperatura média de 23°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, sendo fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7 às 19 horas. A ocorrência e a intensidade da dor nos animais foram monitoradas diariamente por meio da Escala da Careta (Sotocinal et al., 2011). Peso, ingestão de água e consumo de alimentos foram avaliados semanalmente.

<sup>1</sup> S.P.F. = Specific Pathogen Free – livre de 5 patógenos específicos.

#### 4.2.1 Exame colpocitológico (Citologia Vaginal)

Todas as ratas foram submetidas à colheita de secreção vaginal, diariamente, durante três semanas, visando à avaliação da função ovariana. O material colhido em lâminas histológicas foi fixado em uma solução de álcool-éter (1:1), corado pelo método de Harris-Shorr (Shorr, 1941) e analisado ao microscópio de luz. Somente as ratas apresentando dois ou mais ciclos estrais consecutivos de quatro dias foram incluídas no estudo (Montes e Luque, 1988).

#### 4.2.2 Ovariectomia

A OVX foi realizada em 18 ratas, sob anestesia utilizando xilazina a 2% (10mg/kg i.p.) e quetamina a 10% (90mg/kg i.p), o método foi descrito em estudo anterior (Figueroba et al., 2021). A OVX (Figura 2) teve como finalidade eliminar a produção de hormônios gonadais, produzindo um estado permanente de insuficiência estrogênica. Foi realizada analgesia no período pós-operatório imediato com a administração de cloridato de meperidina na dose de 20mg/kg/animal, por via intramuscular (Latt, 1976). Todas as ratas foram novamente submetidas à colheita de secreção vaginal, diariamente, durante 15 dias que sucederam à cirurgia, e somente as ratas que apresentaram esfregaços vaginais de padrão atrófico por 15 dias consecutivos foram incluídas no experimento.



**Figura 2** - Útero após a remoção dos ovários

#### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após 15 dias da indução ou do procedimento simulado, 24 ratas foram divididas nos seguintes grupos (n = 6) de acordo com os tratamentos de dose única aplicados diariamente por gavagem durante sete dias: Grupo 1 - Sham: 02 mL de NaCl 0,9%; Grupo 2 - OVX: 0,2 mL de NaCl 0,9%; Grupo 3 - OVX + AR: 0,2 mL de NaCl 0,9%; Grupo 4 - OVX + AR+ $\omega$ 3:  $\omega$ 3 300 mg/kg. A dose de 300 mg/kg de  $\omega$ 3 foi escolhida de acordo com a proposta de Diretrizes do Health Canada para obter uma dose equivalente à humana de  $\omega$ 3 de 3,0g/dia (Morin et al., 2015)

#### 4.3.1 Indução de artrite e administração de medicamentos

Após 21 dias da castração, os animais dos grupos (OVX + AR e OVX + AR+  $\omega$ 3) foram submetidos a indução de AR, os procedimentos adaptados dos modelos foram descritos previamente por Liu et al. (2015), Morin et al., (2015), Barbin et al., (2020). O CII foi dissolvido em ácido acético 0,05 M para 2,0 mg/mL e completamente emulsificado com o CFA (1:1). Foi injetado 100  $\mu$ L de CFA + CII por via intradérmica na base da cauda de 12 ratas para induzir AR, e após 5 dias, receberam uma segunda dose foi novamente aplicada. Os 12 animais restantes formando o grupo Sham e OVX receberam uma injeção de 100  $\mu$ L de NaCl 0,89% por via intradérmica na base da cauda, repetida após 5 dias (Figura 3).



**Figura 3** - Indução Sistêmica da Artrite na cauda com CFA

#### 4.3.2 Obtenção dos tecidos

Decorridos sete dias dos tratamentos ( $n = 6$ ), os animais foram eutanaziados por aprofundamento da anestesia xilazina a 2% (10mg/kg) e quetamina a 10% (90mg/kg). Uma das ATMs de forma aleatória foi submetida à maceração e centrifugação em tampão de extração celular (tampão tris-HCL 50 mM, pH 7,5) e o sobrenadante foi submetido ao imunoenensaio ELISA. A outra ATM foi preservada por fixação em solução de paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e a 4 °C para a análise posterior dos parâmetros morfométricos por micro-TC.

#### 4.3.3 Imunoensaio

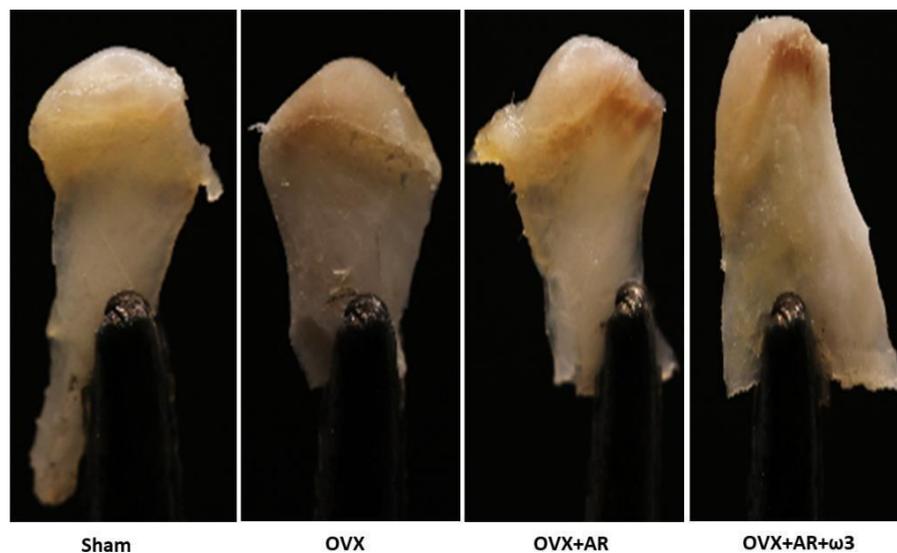
Os sobrenadantes foram analisados em volumes de tecido padronizados usando kits de ELISA (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA), para quantificar as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e anti-inflamatória IL-10 na ATM. As placas foram revestidas com anticorpos específicos para a captura de citocinas, em seguida, amostras experimentais, anticorpos de detecção e anticorpos secundários ligados a enzima foram adicionados à reação. A mudança de cor após a adição de 2,2-azino-bis (ácido 3-

etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e a densidade óptica foi determinada usando comprimento de onda de 405 nm com correção para 650 nm.

#### 4.3.4 Preparo das amostras e obtenção das imagens por micro-TC

As imagens foram obtidas no aparelho de microtomografia computadorizada Skyscan 1174 (Bruker Corp., Kontich, Bélgica/SkyScan). Foram obtidas imagens de 24 cabeça da mandíbula (Figura 4), sendo apenas uma cabeça da mandíbula de cada rata. As amostras foram fixadas com cera em uma haste metálica e posicionadas por meio do ramo da mandíbula, de maneira que as cabeças de mandíbulas ficassem voltada para cima, com o seu centro em 90° em relação à base metálica, as cabeças das mandíbulas foram escaneadas individualmente.

O escaneamento utilizou os seguintes parâmetros de aquisição: energia de 50 kVp, corrente do tubo de raios X de 800  $\mu$ A e um filtro de alumínio com espessura de 0,5 mm posicionado à frente da saída externa dos raios X (Kim et al., 2021). Houve a padronização do tamanho do *pixel* em 6,43  $\mu$ m, posicionamento vertical da amostra em 6,20 mm e aquisição dos *frames* a cada 0,6° de rotação do aparelho, totalizando um giro de 180° e 300 projeções de cada peça.



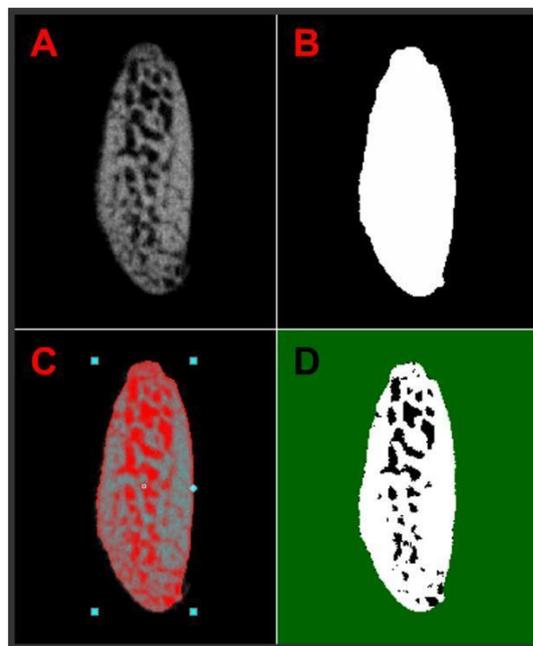
**Figura 4** - Imagem das cabeças das mandíbulas para obtenção das imagens por micro-TC

##### 4.3.4.1 Reconstrução e análise das imagens obtidas e análise

A reconstrução das imagens de micro-CT foram feitas por meio do *software* SkyScan NRecon (Kontich, Bélgica), sendo que as demarcações superior e inferior foram selecionadas individualmente em cada amostra contando trezentas imagens a partir do topo do côndilo antes de cada reconstrução para obtenção da região de interesse (ROI).

As análises das imagens foram realizadas por meio do *software* Skyscan CT Analyzer (Bruker Corp., Kontich, Bélgica/SkyScan). A segmentação da imagem inicial (Figura 5A) foi automatizada pelo próprio software (Figura 5B) e a ROI (Figura 5C) foi selecionada pela ferramenta “ROI *shrink-wrap*”. Após a definição da ROI, foi realizada a binarização da região (Figura 5D), e então, a análise morfométrica para obtenção dos dados. Os valores de threshold utilizados para a avaliação do volume de interesse (VOI) foram de 77 até 255.

Os seguintes parâmetros foram analisados: percentual de volume ósseo (BV), espessura trabecular (Tb.Th), número trabecular (Tb.N), separação trabecular (Tb.Sp), volume de poros abertos (Vop) e porosidade aberta (Op).



**Figura 5** - Segmentação das imagens de microtomografia computadorizada da cabeça da mandíbula

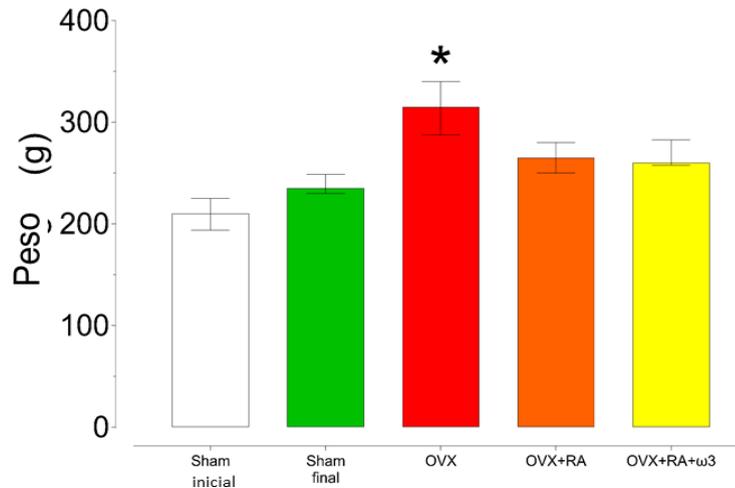
#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para análise de normalidade e ao teste de Bartlett para homocedasticidade. Além disso, os dados foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis (H) e o teste post-hoc de Dunn. Para as análises, o valor alfa foi definido em 5%. Os cálculos estatísticos foram realizados usando os softwares R (4.0.4) e RStudio (1.4.1717), e o software GraphPad Prism (9.1.2) foi usado para criar os gráficos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MASSA CORPORAL

A alteração da massa corporal dos animais ( $n = 6$ ) de cada grupo é mostrada na Figura 6.



**Figura 6** – Alteração na massa corporal do animal (mediana, 1º - 3º quartil,  $n = 6$ ). Os grupos identificados por símbolos diferentes são estatisticamente diferentes uns dos outros (testes de Kruskal-Wallis / Dunn,  $P < 0,05$ ).

Foi possível observar que no curto período da pesquisa houve tendência para as ratas OVX ganharem mais peso ( $H = 23,44$ ,  $P = 0,0001$ ). A mediana (1º - 3º quartil) de peso (em gramas) do grupo OVX (315; 287,5 - 340,0) foi maior ( $P < 0,05$ ) do que a simulação (235; 230 - 248,8), mas não mostrou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) com OVX + AR (265; 250 - 280,0) e OVX + AR +  $\omega 3$  (260; 257,5 - 282,5).

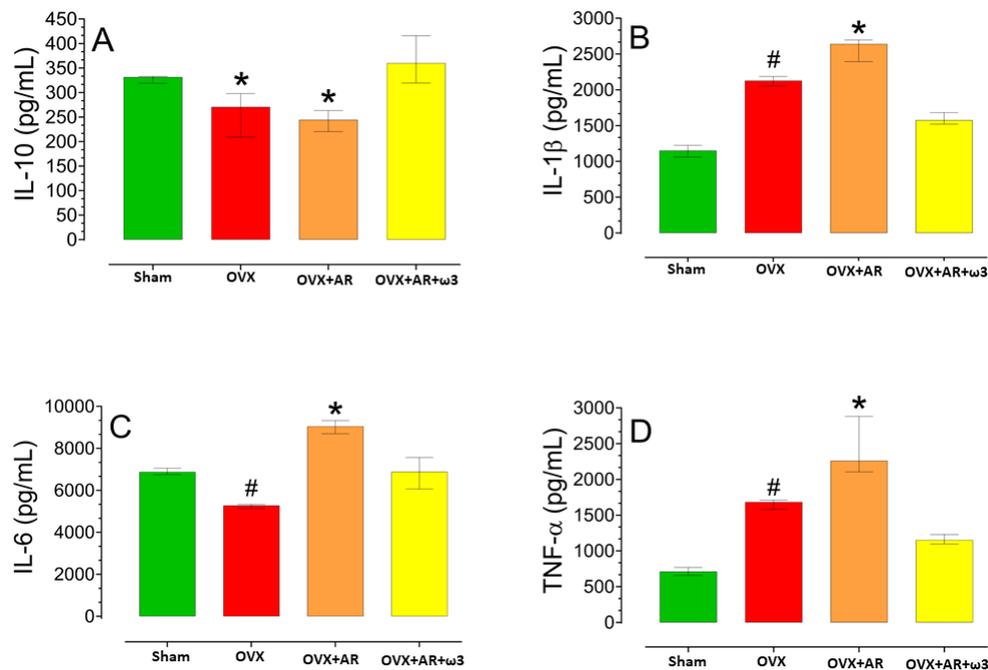
### 5.2 CITOCINA

A Figura 7 mostra os níveis das concentrações de citocinas avaliadas em nosso estudo. Foi possível observar uma diminuição ( $H = 13,7$ ,  $P = 0,0033$ ) no nível de IL-10 (Figura 7A) nos grupos OVX + AR e OVX em relação aos grupos Sham e OVX + AR +  $\omega 3$  ( $P < 0,05$ ). O grupo OVX + AR +  $\omega 3$  não apresentou diferença em relação ao grupo Sham ( $P = 0,82$ ); os grupos OVX + AR e OVX não mostraram diferenças entre eles ( $P = 0,72$ ).

Observamos aumento significativo ( $H = 15,9$ ,  $P < 0,0001$ ) na concentração de IL-1 $\beta$  (Figura 7B) nos grupos OVX + AR e OVX em relação aos demais grupos ( $P < 0,05$ ). A concentração de IL-1 $\beta$  foi semelhante ( $P = 0,21$ ) entre os grupos OVX + AR +  $\omega 3$  e Sham, e foi maior para OVX + AR do que Sham ( $P = 0,0002$ ) e OVX + AR +  $\omega 3$  ( $P = 0,0076$ ).

Um aumento significativo ( $H = 18,5$ ,  $P = 0,0003$ ) na concentração de IL-6 (Figura 7C) foi observado nos grupos OVX + AR ( $P < 0,05$ ) em comparação aos outros grupos. OVX + AR +  $\omega 3$  não mostrou diferenças significativas ( $P = 0,90$ ) com o grupo Sham. O grupo OVX apresentou diminuição estatisticamente significativa na concentração de IL-6 em relação aos demais grupos ( $P < 0,05$ ).

As concentrações de TNF- $\alpha$  (Figura 7D) aumentaram ( $H = 21,6$ ,  $P < 0,0001$ ) na OVX + AR em comparação com Sham ( $P < 0,0001$ ) e OVX + RA +  $\omega 3$  ( $P = 0,0033$ ). Não foram observadas diferenças significativas ( $P = 0,14$ ) entre os grupos OVX + AR +  $\omega 3$  e Sham. OVX induziu maiores concentrações de TNF- $\alpha$  do que Sham ( $P = 0,0030$ ), mas nenhuma diferença com OVX + AR ( $P = 0,14$ ) e OVX + AR +  $\omega 3$  ( $P = 0,14$ ).



**Figura 7** - Mediana (1 $^{\circ}$  - 3 $^{\circ}$  quartis,  $n = 6$ ) de liberação de citocinas (IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ ). Os grupos identificados por símbolos diferentes são estatisticamente diferentes uns dos outros (testes de Kruskal-Wallis / Dunn,  $P < 0,05$ ).

### 5.3 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA

Para a apresentação dos dados obtidos pela análise das reconstruções, utilizou-se a média e o desvio padrão de cada grupo para cada variável, sendo elas: percentual de volume ósseo (BV), espessura trabecular (Tb.Th), número trabecular (Tb.N), espaçamento trabecular (Tb.Sp), volume de poros abertos (Vop) e porosidade aberta (Op) (Tabela 2). A Figura 8 apresenta os gráficos das comparações múltiplas entre os grupos de cada variável, apresentando

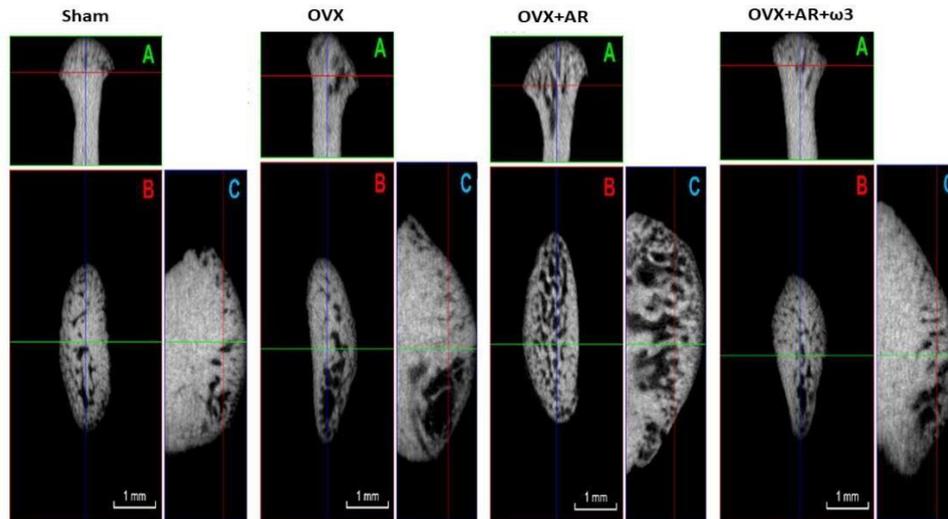
média e desvio padrão (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns: não significante,  $p > 0,05$ ).

Foram analisados os cortes coronal, axial e sagital, representados pelas letras A, B e C respectivamente na Figura 8 por meio das reconstruções com o *software* SkyScan DataViewer (Kontich, Bélgica).

**Tabela 1.** Medianas, 1º e 3º quartis (n = 6) dos dados obtidos pela análise da reconstrução em micro-CT.

Medianas (1º - 3º quartis)						
Grupos	Volume ósseo (%)	Espessura trabecular (mm)	Número trabecular (n/mm)	Espaçamento trabecular (mm)	volume de poros abertos (mm <sup>3</sup> )	Porosidade aberta (%)
Sham	96.23 <sup>a</sup> (95.77 - 96.86)	0.373 <sup>a</sup> (0.313 - 0.396)	2.59 <sup>a</sup> (2.44 - 3.08)	0.056 <sup>a</sup> (0.050 - 0.059)	0.095 <sup>a</sup> (0.078 - 0.105)	3.53 <sup>a</sup> (2.88 - 3.91)
OVX	91.48 <sup>bc</sup> (90.4 - 92.42)	0.364 <sup>a</sup> (0.339 - 0.376)	2.52 <sup>a</sup> (2.45 - 2.72)	0.097 <sup>b</sup> (0.093 - 0.102)	0.281 <sup>b</sup> (0.249 - 0.309)	8.24 <sup>b</sup> (7.23 - 9.30)
OVX+AR	85.12 <sup>c</sup> (83.11 - 88.28)	0.271 <sup>b</sup> (0.261 - 0.277)	3.21 <sup>b</sup> (3.00 - 3.43)	0.100 <sup>b</sup> (0.084 - 0.113)	0.516 <sup>c</sup> (0.436 - 0.577)	14.82 <sup>c</sup> (11.59 - 16.64)
OVX+AR+ω3	93.10 <sup>ab</sup> (92.44 - 94.12)	0.350 <sup>a</sup> (0.334 - 0.371)	2.67 <sup>a</sup> (2.53 - 2.81)	0.087 <sup>b</sup> (0.077 - 0.094)	0.246 <sup>ab</sup> (0.197 - 0.267)	6.63 <sup>ab</sup> (5.60 - 7.19)

OVX= ovariectomizada; AR= artrite reumatoide; ω3= ômega 3. Letras minúsculas diferentes = diferenças estatisticamente significativas



**Figura 8** - Cortes obtidos nas reconstruções dos côndilos da ATM (n = 6) com escala de barra de 1 mm: (A) Coronal, (B) Axial e (C) Sagital. Sham: Estrutura osteocondral com separação trabecular e porosidade de padrão normal. OVX: Alteração intermediária, com aumento da separação trabecular e da porosidade óssea. OVX + RA: Alteração marcada, com aumento da separação trabecular e da porosidade óssea. OVX + RA +  $\omega$ 3: alteração quase normal mostrando diminuição da separação trabecular e da porosidade óssea.

### 5.3.1 Percentual de volume ósseo

Foi possível observar maior percentual de volume ósseo no grupo Sham ( $H = 19,8$ ,  $P = 0,0002$ ) quando comparado aos grupos OVX ( $P = 0,0062$ ) e OVX+ AR ( $P < 0,0001$ ), mas não apresentou diferenças estatisticamente significantes ( $P = 0,13$ ) com o grupo OVX+AR +  $\omega$ 3. Este último grupo apresentou maior proporção de volume ósseo do que o grupo OVX + AR ( $P = 0,0062$ ), mas não diferiu do grupo OVX ( $P = 0,13$ ).

### 5.3.2 Espessura trabecular

A análise da espessura trabecular ( $H = 11,6$ ,  $P = 0,0087$ ) mostrou que o grupo Sham não apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparado aos grupos OVX ( $P = 0,81$ ) e OVX + AR +  $\omega$ 3 ( $P = 0,80$ ), mas foi maior do que no grupo OVX + AR ( $P = 0,0033$ ), que foi menos espesso do que os grupos OVX + AR +  $\omega$ 3 ( $P = 0,0071$ ) e OVX ( $P = 0,0070$ ). Não houve diferenças estatisticamente significantes ( $P = 0,99$ ) entre os grupos OVX e OVX + AR +  $\omega$ 3.

### 5.3.3 Número trabecular

O número de trabéculas ( $H = 9,0$ ,  $P = 0,0297$ ) foi maior no grupo OVX + AR do que Sham ( $P = 0,0305$ ), OVX ( $P = 0,0062$ ) e OVX + AR +  $\omega$ 3 ( $P = 0,0222$ ). Não houve diferenças estatisticamente significantes ( $P > 0,05$ ) entre os outros grupos.

#### 5.3.4 Espaçamento trabecular

O espaçamento trabecular ( $H = 14,3$ ,  $P = 0,0026$ ) foi menor no grupo Sham do que no OVX ( $P < 0,0015$ ), OVX + AR ( $P = 0,0008$ ) e OVX + AR +  $\omega 3$  ( $P = 0,0222$ ), mas lá não houve diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre os outros grupos.

#### 5.3.5 Volume de poros abertos

O volume de poro aberto ( $H = 19,0$ ,  $P = 0,0003$ ) foi significativamente menor no grupo Sham do que no OVX ( $P = 0,0101$ ) e OVX + AR ( $P < 0,0001$ ), mas nenhuma diferença significativa foi observada com OVX + AR +  $\omega 3$  ( $P = 0,0724$ ). OVX + RA induziu o maior volume de poro aberto ( $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre OVX e OVX + AR +  $\omega 3$  ( $P = 0,44$ ).

#### 5.3.6 Porosidade aberta

A porcentagem de porosidade aberta ( $H = 19,8$ ,  $P = 0,0002$ ) não diferiu ( $P = 0,11$ ) entre os grupos Sham e OVX + AR +  $\omega 3$ , mas ambos tiveram uma porcentagem menor ( $P < 0,0001$ ) do que o grupo OVX + AR. A porosidade do grupo OVX foi maior do que a do grupo Sham ( $P = 0,0055$ ), mas não diferiu dos grupos OVX + AR ( $P = 0,13$ ) e OVX + AR +  $\omega 3$  ( $P = 0,24$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram propriedades reparadoras e protetoras de  $\omega 3$  na ATM de ratas OVX com AR. Apenas as ratas ovariectomizadas apresentaram maior ganho de peso do que as ratas simuladas (Sham), durante o curto período do estudo. Tanto a AR quanto a AR associada ao ômega 3 diminuíram de alguma forma o ganho de peso quando comparada à OVX. O ganho de peso em ratos OVX é mediado por hiperfagia, redução da atividade locomotora e redução da taxa metabólica (Dornellas et al., 2018; Witte et al., 2010).

Citocinas de baixo peso molecular, que exercem efeito pró ou antiinflamatório (Boshtam et al., 2017). Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 desempenham um papel vital na patogênese da AR, que é caracterizada por inflamação crônica do tecido sinovial, disfunção articular e dano tecidual nas articulações (Kim e Moudgil, 2017). Os níveis de concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no grupo Sham foram baixos, principalmente pela condição saudável das ATMs, uma vez que o estresse químico e mecânico não foram usados. Este resultado foi observado anteriormente em outros estudos (Barbin et al., 2020; Figueroba et al., 2015). Essas citocinas tiveram um aumento maior no grupo OVX + RA do que nos outros grupos.

A AR induzida aumentou a concentração de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 na ATM de ratas, confirmando achados anteriores (Barbin et al., 2020; Ceotto et al., 2021). Esse aumento também foi observado na ATM após injeção de albumina bovina metilada (Silva Quinteiro et al., 2014; Teixeira et al., 2020).

Além da AR, os animais também apresentavam insuficiência estrogênica causada pela OVX, o que provavelmente contribuiu para um aumento maior na concentração de citocinas. Níveis aumentados de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  também foram observados em outros estudos com ratas ovariectomizadas, provavelmente devido a uma redução extrema das concentrações de 17beta-estradiol. Além disso, a concentração de 17beta-estradiol em ratas OVX geralmente são três a quatro vezes menor do que em ratas não castradas (Figueroba et al., 2015; Qu et al., 2013). Outros estudos mostraram que os hormônios gonadais inibem a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células do estroma ou macrófagos (Figueroba et al., 2015; Ganesan et al., 2008),

Níveis de concentração aumentados de IL-6 foram detectados no soro e líquido sinovial de pacientes com AR (Ogata et al., 2019). Na verdade, encontramos um nível mais alto de concentração de IL-6 no grupo OVX + RA. Quando tratados com  $\omega 3$ , as concentrações de IL-6 foram reduzidas em concentrações semelhantes às do grupo Sham.

Existem várias evidências sugerindo que a IL-6 desempenha um papel vital durante a transição da imunidade inata para a adquirida (Scheller et al., 2011). Em nosso estudo, a IL-6 apresentou níveis reduzidos de concentração no grupo OVX quando comparada aos outros grupos. Curiosamente, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaram no grupo OVX, indicando que outros fatores podem ter influenciado. Estudo realizado por Figueroba et al. (2015) mostraram concentrações aumentadas de IL-6 na presença de 17beta-estradiol em ratas ovariectomizadas, confirmando que os hormônios gonadais são essenciais para aumentar a expressão de IL-6 em mulheres. Assim, é provável que o aumento do nível de IL-6 no grupo OVX + AR tenha sido induzido por CFA + CII.

Nossos resultados mostraram que tanto a AR quanto OVX induzem uma diminuição nos níveis de concentração IL-10 no tecido da ATM. A IL-10 desempenha um papel terapêutico em vários modelos de AR (Kuroda et al., 2006), principalmente inibindo citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 (Boshtam et al., 2017),

Os efeitos benéficos de AGPIs ômega 3 têm sido observados em modelos de AR em roedores (Ierna et al., 2010). Nosso estudo confirmou o efeito anti-inflamatório de ômega 3 na ATM de ratas com OVX e AR, com melhoras significativas na microarquitetura óssea do côndilo, reduzindo a maioria das citocinas das citocinas avaliadas. O ômega 3 foi capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após a indução de OVX e AR, apresentando níveis semelhantes aos do grupo Sham. Barbin et al. (2020) mostraram anteriormente o efeito anti-inflamatório de ômega 3 na ATM em ratos machos com AR.

Além disso, também houve uma maior concentração de IL-10 no grupo tratado com ômega 3; aumento no tecido da ATM após receberem o tratamento com ômega 3. Considerada anti-inflamatória, a IL-10 é uma interleucina anti-inflamatória, apresentando um papel terapêutico em diversos modelos animais de artrite, por inibir a produção e os efeitos de citocinas pró-inflamatórias. Teixeira et al. (2020) mostraram níveis aumentados de IL-10 no tecido da ATM de ratos com AR tratados com ácidos epoxiicosatrienóicos (metabólito do ácido araquidônico). Nosso estudo também mostrou concentrações aumentadas de IL-10 no grupo ômega 3.

Ratas OVX + AR apresentaram degeneração no osso subcondral da ATM, conforme relatado anteriormente por Tanaka et al. (1999), que demonstrou a influência negativa da ovariectomia na microarquitetura óssea do côndilo. Em nosso estudo, a micro-tomografia computadorizada revelou alterações significativas no côndilo mandibular. A maioria dos parâmetros observados apresentou melhora no grupo ômega 3, relacionada à reorganização da matriz óssea.

Outros estudos (Chen et al., 2014; Jiang et al., 2017; Chatterjee et al., 2021) demonstraram redução na porcentagem de volume ósseo e espessura trabecular, além de aumento da separação trabecular e da porosidade total no osso cômulo de ratas ovariectomizadas. Nossos resultados mostraram achados semelhantes principalmente no grupo OVX e OVX-RA, exceto para o número trabecular que não foi afetado em nosso estudo, e um aumento no volume de poros abertos (Vop) e porosidade aberta (Op) semelhante a porosidade total do estudo citado. Cui et al. (2015) também não observaram diferenças no número trabecular de animais OVX

A AR induzida causou mudanças mais pronunciadas na microarquitetura condilar em animais OVX, especialmente na espessura e número trabecular. Outros estudos em animais observaram redução na porcentagem de volume ósseo, espessura trabecular e número trabecular na ATM após 2 a 4 semanas de indução de OA, sendo a redução mais evidente na 2ª semana (Xu et al., 2016; Cui et al., 2020). Nossos resultados foram obtidos após 3 semanas de AR e OVX, e o tempo pode não ser adequado para observar mudanças mais evidentes

O ômega 3 contribuiu para preservar a microarquitetura do cômulo em alguns dos parâmetros da micro tomografia computadorizada, conforme mostrado na Tabela 1. Lukas et al. (2011) observaram os efeitos positivos de dietas com diferentes fontes de ômega 3 em ratas em crescimento por oito semanas. O tratamento com ômega 3 restaurou parcialmente o padrão de normalidade no osso cômulo da ATM, melhorando alguns dos parâmetros ósseos. Na verdade, um estudo anterior mostrou um aumento significativo na porcentagem de volume ósseo em camundongos, sugerindo que a suplementação com ômega 3 contribui para o processo de desenvolvimento ósseo e otimiza as características do osso trabecular (Rozner et al., 2020).

Os efeitos de preservação do ômega 3 nos tecidos sinoviais da ATM também foram relatados em estudo anterior por meio de análise histológica. O ômega 3 induziu uma maior espessura das camadas fibrosas maduras, proliferativas e hipertróficas em ratos AR machos. No entanto, Gunson et al. (2012) mostraram que os efeitos benéficos do ômega 3 foram rapidamente revertidos com a retirada da ingestão de alimentos.

Dessa forma, nosso estudo traz novas evidências sobre o efeito do ômega 3 na ATM, inibindo citocinas pró-inflamatórias, auxiliando no processo de reparo e prevenindo a destruição da cartilagem articular e erosão óssea.

## **7 CONCLUSÃO**

Ômega 3 reduziu com sucesso o dano da articulação temporomandibular em ratos com ovariectomia induzida por artrite reumatoide. Portanto, é considerada uma alternativa promissora, pois precursores de mediadores lipídicos da inflamação podem atenuar a inflamação e modular a resposta autoimune, auxiliando no processo de reparo ósseo.

## REFERÊNCIAS

Akbar U, Yang M, Kurian D, Mohan C. Omega-3 fatty acids in rheumatic diseases a critical review. *J Clin Rheumatol* 2017;23:330–9.

Aliko A, Ciancaglini R, Alushi A, Tafaj A, Ruci D. Temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jul;40(7):704-9.

Alomar X, Medrano J, Cabratosa J, Clavero JA, Lorente M, Serra I, Monill JM, Salvador A. Anatomy of the Temporomandibular Joint. *Semin Ultrasound CT MR.* 2007 Jun;28(3):170-83.

Arab HH, Salama SA, Abdelghany TM, Omar HA, Arafa EA, Alrobaian MM, Maghrabi IA. Camel Milk Attenuates Rheumatoid Arthritis Via Inhibition of Mitogen Activated Protein Kinase Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(2):540-552.

Barbin, T., Groppo, F.C., Toledo, F.C., Costa, Y.M., Clemente-Napimoga, J.T., Figueroba S.R., 2020. The effect of omega-3 in temporomandibular joint synovial tissues of rats with induced arthritis: pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 49 (10), 1319-1325.

Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1:377–85.

Bereiter DA, Okamoto K. . Neurobiology of estrogen status in deep craniofacial pain. *Int Rev Neurobiol.* 2011;97:251-84.

Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2010 Aug;62(8):2192-205.

---

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D, Benhamou CL. Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D, Benhamou CL. Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different X-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices. *Med Phys*. 2009 Apr;36(4):1286-97.

Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation*. 2017 Feb;40(1):340-349.

Bouxsein ML, Myers KS, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of Mice. *J Bone Miner Res*. 2005 Jul;20(7):1085-92.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86.

Brand DD. Rodent Models of Rheumatoid Arthritis. *Comp Med*. 2005 Apr;55(2):114-22.

Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-- Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine*. 2015 Dec;76(2):527-536.

Burmester GR, Feist E, Dörner T. *Nat Rev Rheumatol*. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. 2014 Feb;10(2):77-88.

Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:545493.

Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain: basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil*. 2010 May;37(6):391-410

Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*. 2009 May;101 Suppl 1:S1-45.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2015;1851:469–84.

Caporali R, Todoerti M, Sakellariou G, Montecucco C. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2013;73(1):31-43.

Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, Ehrenstein MR, Flavell RA, Mauri C. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5569-79.

Ceotto BH, Figueroba SR, Ferreira LEN, Amorim KS, Sánchez JB, Gercina AC, Dos Santos VAB, Groppo FC. The effect of association of aspirin and omega 3 in rat temporomandibular joint with induced arthritis. *Ann Anat*. 2021 Aug 9;239:151812.

Cessak G, Kuzawińska O, Burda A, Lis K, Wojnar M, Mirowska-Guzel D, Bałkowiec-Iskra E. TNF inhibitors—mechanisms of action, approved and off-label indications. *Pharmacol Rep*. 2014 Oct;66(5):836-44.

Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 10;23(32):8152-60.

Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res*. 2005 Jul;20(7):1177-84.

Chatterjee M, Faot F, Correa C, Kerckhofs J, Vandamme K. Is the Jaw Bone Micro-Structure Altered in Response to Osteoporosis and Bisphosphonate Treatment? A Micro-CT Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 18;22(12):6559.

Chen K, Zhang N, Ding L, Zhang W, Hu J, Zhu S. Early intra-articular injection of alendronate reduces cartilage changes and subchondral bone loss in rat temporomandibular joints after ovariectomy. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014

Cui SJ, Zhang T, Fu Y, Liu Y, Gan YH, Zhou YH, Yang RL, Wang XD. DPSCs Attenuate Experimental Progressive TMJ Arthritis by Inhibiting the STAT1 Pathway. *J Dent Res*. 2020 Apr;99(4):446-455.

Cui Z, Xu C, Li X, Song J, Yu B. Treatment with recombinant lubricin attenuates osteoarthritis by positive feedback loop between articular cartilage and subchondral bone in ovariectomized rats. *Bone*. 2015 May;74:37-47.

Damlar I, Esen E, Tatli U. Effects of glucosamine-chondroitin combination on synovial fluid IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 May 1;20(3):e278-83.

De Leeuw R, Klasser GD. Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis, and management. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008; 134: 171.

Denadai-Souza A, Camargo Lde L, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscara MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain* 2009;13:812-819.

Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015;15:511–23.

Dimitroulis G (2005). The role of surgery in the management of disorders of the temporomandibular joint: a critical review of the literature. Part 2. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 May;34(3):231-7.

Dornellas APS, Boldarine VT, Pedroso AP, Carvalho LOT, de Andrade IS, Vulcani-Freitas TM, Dos Santos CCC, do Nascimento CMDPO, Oyama LM, Ribeiro EB. High-Fat Feeding Improves Anxiety-Type Behavior Induced by Ovariectomy in Rats. *Front Neurosci*. 2018 Sep 3;12:557.

Dym H, Israel H. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *Dent Clin North Am*. 2012 Jan;56(1):149-61, ix.

Embree M, Ono M, Kilts T, Walker D, Langguth J, Mao J, et al. Role of subchondral bone during early-stage experimental TMJ osteoarthritis. *J Dent Res* 2011;90:1331-1338.

Ernberg, M., 2017. The role of molecular pain biomarkers in temporomandibular joint internal derangement. *Journal of Oral Rehabilitation*. 44 (6), 481-491.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 1989 Feb;4(1):3-11.

Figueroba SR, Desjardins MP, Ferreira LE, Berto LA, Valdrighi HC, Groppo FC. The influence of altered occlusion on pro-inflammatory cytokine levels in the TMJ synovial tissues of rats. *Arch Oral Biol* 2014;59:1164-1171.

Figueroba SR, Franco GC, Omar NF, Groppo MF, Groppo FC. Dependence of cytokine levels on the sex of experimental animals: a pilot study on the effect of oestrogen in the temporomandibular joint synovial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Nov;44(11):1368-75.

Figueroba SR, Groppo MF, Faibish D, Groppo FC. The action of anti-inflammatory agents in healthy temporomandibular joint synovial tissues is sex-dependent. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Feb;47(2):205-213.

Figueroba SR, Moreira JC, Amorim KS, et al. Effect of glucosamine sulphate on the temporomandibular joint of ovariectomised rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2021;59(2):202-208.

Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*. 2009 May;10(5):447-85.

Flake NM, Hermansteyne TO, Gold MS. Testosterone and estrogen have opposing actions on inflammation-induced plasma extravasation in the rat temporomandibular joint. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R343-R348.

Flurey CA, Morris M, Richards P, Hughes R, Hewlett S. It's like a juggling act: Rheumatoid arthritis patient perspectives on daily life and flare while on current treatment regimes. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Apr;53(4):696-703.

Fonseca F, Orlando R, Turchetti-Maia R, Francischi J. Comparative effects of the  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid derivatives resolvins E1 and D1 and protectin DX in models of inflammation and pain. *J Inflamm Res* 2017;10:119–33.

Galal N, El Beialy W, Deyama Y, Yoshimura Y, Yoshikawa T, Suzuki K, Totsuka Y. Effect of estrogen on bone resorption and inflammation in the temporomandibular joint cellular elements. *Int J Mol Med*. 2008 Jun;21(6):785-90.

Ganesan K, Tiwari M, Balachandran C, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Estrogen and testosterone attenuate extracellular matrix loss in collagen-induced arthritis in rats. *Calcif Tissue Int*. 2008 Nov;83(5):354-64.

Gauer RL, Semidey MJ. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *Am Fam Physician* 2015;91:378–86

Ghassemi Nejad S, Kobezda T, Tar I, Szekanecz Z. Development of temporomandibular joint arthritis: the use of animal models. *Joint Bone Spine*. 2017 Mar;84(2):145-151.

Gunson MJ, Arnett GW, Milam SB. Patho-physiology and pharmacologic control of nonosseous mandibular condylar resorption. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Aug;70(8):1918-34.

Habib GS. Systemic effects of intra-articular corticosteroids. *Clin Rheumatol* 2009;28:749–56.

Hankenson KD, Hormuzdi SG, Meganck JA, Bornstein P. Mice with a disruption of the thrombospondin 3 gene differ in geometric and biomechanical properties of bone and have accelerated development of the femoral head. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(13):5599-606.

Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Nov;67(11):1505-15.

Holmdahl R, Malmstrom V, Burkhardt H. Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation—the three stages of rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*. 2014 Jun;44(6):1593-9.

Holwegner C, Reinhardt AL, Schmid MJ, Marx DB, Reinhardt RA. Impact of local steroid or statin treatment of experimental TMJ arthritis on bone growth in young rats. *Am J Orth. Dentofacial Orthop* 2015Jan;147:80-88.

Ibi, M., 2019. Inflammation and Tissue Remodeling as Potential Therapeutic Targets. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 42 (4), 538-542.

Ierna M, Kerr A, Scales H, Berge K, Griinari M. RSupplementation of diet with krill oil protects against experimental rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010 Jun 29;11:136.

Jiang L, Shen X, Wei L, Zhou Q, Gao Y. Effects of bisphosphonates on mandibular condyle of ovariectomized osteoporotic rats using micro-ct and histomorphometric analysis. *J Oral Pathol Med*. 2017 May;46(5):398-404.

Kawasaki T, Ushiyama T, Inoue K, Hukuda S. Effects of estrogen on interleukin-6 production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;18:743– 5.

Kim EY, Moudgil KD. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. *Cytokine*. 2017 Oct;98:87-96.

Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications *Int Immunol*. 2010 May;22(5):347-52.

Klareskog L, Gregersen PK, Huizinga TW. Prevention of autoimmune rheumatic disease: state of the art and future perspectives. *Ann Rheum Dis*. 2010 Dec;69(12):2062-6.

Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Okamoto R, Koshino T, Kawai S. Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol*. 2002;29:1836–42.

Kou XX, Wu YW, Ding Y, Hao T, Bi RY, Gan YH, Ma X. 17beta-estradiol aggravates TMJ inflammation through the NF-kappaB pathway in ovariectomized rats. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1888-97.

Knott L, Avery NC, Hollander AP, Tarlton JF. Regulation of osteoarthritis by omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids in a naturally occurring model of disease. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Sep;19(9):1150-7.

Krasselt M, Baerwald C. Sex, symptom severity, and quality of life in rheumatology. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019 Jun;56(3):346-361.

Kuroda T, Maruyama H, Shimotori M, Higuchi N, Kameda S, Tahara H, Miyazaki J, Gejyo F. Effects of viral interleukin 10 introduced by in vivo electroporation on arthrogen-induced arthritis in mice. *J Rheumatol*. 2006 Mar;33(3):455-62.

Latt RH. Drug dosages for laboratory animals. In: Melby Jr EC, Altman NH Eds. *Cleveland: Handbook of laboratory animal science*. CRC Press. 1976; 561-68.

Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):903-11.

Liu Q, Zhu XZ, Feng RB, Liu Z, Wang GY, Guan XF, Ou GM, Li YL, Wang Y, Li MM, Ye WC. Crude triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* (Di Wu) exert anti-arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats. *Chin Med*. 2015 Jul 25;10:20.

Loef M, Schoones JW, Kloppenburg M, Ioan-Facsinay A. *Joint Bone Spine*. 2019 Jul;86(4):451-458.

Lukas R, Gigliotti JC, Smith BJ, Altman S, Tou JC. Consumption of different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids by growing female rats affects long bone mass and microarchitecture. *Bone*. 2011 Sep;49(3):455-62.

Ma A, Yang Y, Wang Q, Wang Y, Wen J, Zhang Y. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells. *Mol Med Rep.* 2017 Jun;15(6):3615-3622.

Martín-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, Elmoutaouakkil A, Vico L, Peyrin F. Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT. *Radiology.* 2003;229(3):921-928.

Mehra P, Wolford LM, Baran S, Cassano DS. Single-stage comprehensive surgical treatment of the rheumatoid arthritis temporomandibular joint patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Sep;67(9):1859-72.

Miles EA, Calder PC. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr.* 2012 Jun;107 Suppl 2:S171-84.

Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel).* 1988;133(3):192-9.

Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone.* 2009 Feb;44(2):335-44.

Morin C, Blier PU, Fortin S. Eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid monoglycerides are more potente than docosahexaenoic acid monoglyceride to resolve inflammation in a rheumatoid arthritis model. *Arthritis Res Ther.* 2015 May 29;17:142.

Mujakperuo HR, Watson M, Morrison R, Macfarlane TV. Pharmacological interventions for pain in patients with temporomandibular disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Oct 6;(10):CD004715.

Ogata A, Kato Y, Higa S, Yoshizaki K. IL-6 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis: A comprehensive review. *Mod Rheumatol.* 2019 Mar;29(2):258-267.

Olson MV, Liu YC, Dangi B, Paul Zimmer J, Salem N Jr, Nauroth JM. Docosahexaenoic acid reduces inflammation and joint destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Inflamm Res*. 2013 Dec;62(12):1003-13

Ouanounou A, Goldberg M, Haas DA. Pharmacotherapy in Temporomandibular Disorders: A Review. *J Can Dent Assoc*. 2017 Jul;83:h7.

Paula FS, Alves JD. Non-tumor necrosis factor-based biologic therapies for rheumatoid arthritis: present, future, and insights into pathogenesis. *Biologics*. 2014;8:1-12.

Porto GG, Vasconcelos BC, Andrade ES, Silva-Junior VA. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. *Acta Cir Bras*. 2010 Jun;25(3):290-3. =

Qu N, Wang L, Liu ZC, Tian Q, Zhang Q. Oestrogen receptor a agonist improved long-term ovariectomy-induced spatial cognition deficit in young rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Jun;16(5):1071-82.

Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol*. 2012 Nov;33(11):571-7.

Robinson JL, Cass K, Aronson R, Choi T, Xu M, Bottenbaum R, Drissi H, Lu HH, Chen J, Wadhwa S. Sex Differences in the Estrogen-Dependent Regulation of Temporomandibular Joint Remodeling in Altered Loading. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 Apr;25(4):533-543.

Romero-Reyes M, Uyanik JM. Orofacial pain management: current perspectives. *J Pain Res* 2014;7:99–115.

Rozner R, Vernikov J, Griess-Fishheimer S, Travinsky T, Penn S, Schwartz B, Mesilati-Stahy R, Argov-Argaman N, Shahar R, Monsonego-Ornan E. The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Different Sources in Bone Development. *Nutrients*. 2020 Nov 13;12(11):3494.

Ruiz-Lopez N, Usher S, Sayanova O V., Napier JA, Haslam RP. Modifying the lipid content and composition of plant seeds: engineering the production of LC-PUFA. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;99:143–54.

Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr* 2002;75:191–212.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and antiinflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813(5):878-88.

Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 2008;47:147–55.

Scott IC, Machin A, Mallen CD, Hider SL. The extraarticular impacts of rheumatoid arthritis: moving towards holistic care. *BMC Rheumatol*. 2018 Oct 30;2:32.

Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF, Spite M. Maresins: novel macrophage mediators with potent anti-inflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 2009. Jan 16;206(1):15-23.

Shorr E. A new technic for staining vaginal smears: III, a single differential stain. *Science*. 1941 Dec 5;94(2449):545-6.

Silva Quinteiro M, Henrique Napimoga M, Gomes Macedo C, Furtado Freitas F, Balassini Abdalla H, Bonfante R, Trindade Clemente-Napimoga J15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 5;740:58-65.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The rat grimace scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011 Jul 29;7:55.

Tanaka M, Ejiri S, Nakajima M, Kohno S, Ozawa H. Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. *Bone*. 1999 Sep;25(3):339-47.

Teixeira JM, Abdalla HB, Basting RT, Hammock BD, Napimoga MH, Clemente-Napimoga JT. Peripheral soluble epoxide hydrolase inhibition reduces hypernociception and inflammation in albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. *Int Immunopharmacol.* 2020 Oct;87:106841.

Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001;108:15–23.

Turajane T, Wongbunnak R, Patcharatrakul T, Ratansumawong K, Poigampetch Y, Songpatanasilp T. Gastrointestinal and cardiovascular risk of non-selective NSAIDs and COX-2 inhibitors in elderly patients with knee osteoarthritis. *J Med Assoc Thai* 2009;92(Suppl. 6):S19–26.

Uthgenannt BA, Silva MJ. Use of the rat forelimb compression model to create discrete levels of bone damage in vivo *J Biomech.* 2007;40(2):317-24.

Von Stechow D, Zurakowski D, Pettit AR, Müller R, Gronowicz G, Chorev M, Otu H, Libermann T, Alexander JM. Differential transcriptional effects of PTH and estrogen during anabolic bone formation. *J Cell Biochem.* 2004 Oct 15;93(3):476-90.

Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem* 2007;282:22254–66.

Wang B, Zhao P, Zhou Y, Meng L, Zhu W, Jiang C, Wang L, Cai Y, Lu S, Hou W. Increased expression of Th17 cytokines and interleukin-22 correlates with disease activity in pristane-induced arthritis in rats. *PLoS One.* 2017 Nov 28;12(11):e0188199.

Wang XD, Kou XX, Mao JJ, Gan YH, Zhou YH. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. *J Dent Res* 2012 May;91:499-505.

Wang XD, Zhang JN, Gan YH, Zhou YH.J. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis., *Dent Res.* 2015 May;94(5):666-73.

Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(3):187-92.

Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med.* 2015 Nov-Dec;24(6):931-41.

Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. *Gen Comp Endocrinol.* 2010 May 1;166(3):520-8.

Xiao YP, Tian FM, Dai MW, Wang WY, Shao LT, Zhang L. Are estrogen-related drugs new alternatives for the management of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2016 Jun 28;18:151.

Xu L, Guo H, Li C, Xu J, Fang W, Long X. A time-dependent degeneration manner of condyle in rat CFA-induced inflamed TMJ. *Am J Transl Res.* 2016 Feb 15;8(2):556-67. eCollection 2016.

Yadav S, Yang Y, Dutra EH, Robinson JL, Wadhwa S. Temporomandibular Joint Disorders in the Elderly and Aging Population. *J Am Geriatr Soc.* 2018 Jul;66(6):1213-1217.

Yasuoka T, Nakashima M, Okuda T, Tatematsu N. Effect of estrogen replacement on temporomandibular joint remodeling in ovariectomized rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000 Feb;58(2):189-96; discussion 196-7.

Ye T, Sun D, Mu T, Chu Y, Miao H, Zhang M, Yang H, Liu Q, Lu L, Xing X, Yu S. Differential effects of high-physiological oestrogen on the degeneration of mandibular condylar cartilage and subchondral bone. *Bone.* 2018 Jun;111:9-22.

Yilmaz HH, Yildirim D, Ugan Y, Tunc SE, Yesildag A, Orhan H, Akdag C. Clinical and magnetic resonance imaging findings of the temporomandibular joint and masticatory muscles in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2012 May;32(5):1171-8.

Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y. Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclasto genesis. *Endocrinology.* 2004 May;145(5):2384-91

Zhang S, Teo KYW, Chuah SJ, Lai RC, Lim SK, Toh WS. MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis. *Biomaterials.* 2019 Apr;200:35-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.02.006.

Zhang S, Yap AU, Toh WS. Toh, Stem cells for temporomandibular joint repair and regeneration, *Stem Cell Rev Rep.* 2015 Oct;11(5):728-42.

## ANEXOS

## Anexo 1 – Comitê de Ética



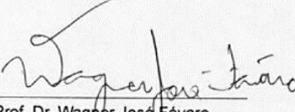
## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DO ÔMEGA 3 ATM DE RATAS OVARIETOMIZADAS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND E COLÁGENO TIPO II.", registrada com o nº 5455-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Sidney Figueroba Raimundo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 14/11/2019.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	06/01/2020 a 06/01/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 06/01/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 300.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 300.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 300.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 300.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

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

Campinas, 04 de dezembro de 2019.

  
 Prof. Dr. Wagner José Fávoro  
 Presidente

  
 Rosângela dos Santos  
 Secretária Executiva

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

## Anexo 2 – Relatório de Similaridade

ORIGINALITY REPORT			
23%	20%	11%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	repositorio.unicamp.br Internet Source		10%
2	Rosana Rodrigues Marana, Victor Augusto Benedicto dos Santos, Francisco C. Groppo, Luiz Eduardo N. Ferreira et al. "Omega 3 polyunsaturated fatty acids: Potential anti-inflammatory effect in a model of ovariectomy and temporomandibular joint arthritis induction in rats", Archives of Oral Biology, 2021 Publication		2%
3	teses.usp.br Internet Source		1%
4	repositorio.unesp.br Internet Source		1%
5	docplayer.com.br Internet Source		1%
6	pesquisa.bvsalud.org Internet Source		<1%
hdl.handle.net			