



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

FERNANDA ELISA FERREIRA ANANIAS

**“INFLUÊNCIA DO ÔMEGA 3 E DA DEXAMETASONA EM ARTRITE
INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND CFA - COLÁGENO
TIPO II NA ATM DE RATOS”**

PIRACICABA

2022

FERNANDA ELISA FERREIRA ANANIAS

**“INFLUÊNCIA DO ÔMEGA 3 E DA DEXAMETASONA EM ARTRITE INDUZIDA
POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND CFA - COLÁGENO TIPO II NA ATM
DE RATOS”**

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

Orientador: Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo

Coorientador: prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNA FERNANDA ELISA FERREIRA ANANIAS
E ORIENTADA PELO PROF. DR. SIDNEY
FIGUEROBA RAIMUNDO

PIRACICABA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

An14i Ananias, Fernanda Elisa Ferreira, 1990-
Influência do ômega 3 e da dexametasona em artrite induzida por adjuvante completo de freund CFA - colágeno tipo II na ATM de ratos / Fernanda Elisa Ferreira Ananias. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.

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. Inflamação. 5. Modelos animais. I. Figueroba Raimundo, Sidney, 1963-. II. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of omega 3 and dexamethasone on arthritis induced by complete freund's adjuvant CFA - collagen type II in the tmj of rats

Palavras-chave em inglês:

Temporomandibular joint

Omega-3 fatty acids

Cytokines

Inflammation

Models, animal

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Sidney Figueroba Raimundo [Orientador]

Juliana Cama Ramacciato

Rogério Heládio Lopes Motta

Data de defesa: 26-04-2022

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8090-6077>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0917738213411254>

FOLHA DE APROVAÇÃO



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 26 de abril de 2022, considerou a candidata FERNANDA ELISA FERREIRA ANANIAS aprovada.

PROF. DR. SIDNEY FIGUEROBA RAIMUNDO

PROF^a. DR^a. JULIANA CAMA RAMACCIATO

PROF. DR. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

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

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, por me guiar e iluminar para a finalização deste trabalho. Ao meu esposo, Alex Caires, por todo apoio, compreensão e incentivo sempre e aos meus pais e irmãs, por me ajudarem na realização desse sonho

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº nº400957/2016-7.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor, Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles.

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

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

Em especial ao Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo pela orientação deste trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento de osteoartrite (OA) leva a degeneração articular, e o da artrite reumatoide (AR) pode causar destruição da superfície articular. Alguns estudos demonstraram os efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω 3), no processo inflamatório da articulação temporomandibular (ATM). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ω 3 na ATM de ratos com OA e AR. A OA foi induzida com CFA+colágeno bovino tipo II (CII) injetados diretamente na ATM e a AR injetado diretamente na ATM e na base da cauda dos ratos. Foram tratados 36 ratos adultos por gavagem e divididos aleatoriamente em 6 grupos. Ensaio 1 - G1: Controle – Injeção de 50 μ L de NaCl 0,9% na base da cauda e em cada ATM, tratado com NaCl; G2: OA – Injeção de 50 μ L de CFA+CII em cada ATM, tratado com NaCl; G3: OA+AR – Injeção de 100 μ L de CFA+CII na base da cauda e de 50 μ L de CFA+CII em cada ATM, tratado com NaCl. Ensaio 2 - G4: OA+AR+dexa – Injeção de 100 μ L de CFA+CII na base da cauda e de 50 μ L de CFA+CII em cada ATM, tratado com dexametasona – controle positivo (0,3 mg/kg); G5: OA+AR – ω 150 – Injeção de 100 μ L de CFA+CII na base da cauda e de 50 μ L de CFA+CII em cada ATM, tratado com ω -3 (150 mg/kg); G6: OA+AR+ ω 300 – Injeção de 100 μ L de CFA+CII na base da cauda e de 50 μ L de CFA+CII em cada ATM, tratado com ω 3 (300 mg/kg), os tratamentos foram iniciados 15 dias após a indução da AR+OA, mantidos por 7 dias e eutanasiados. Uma das ATM foi submetida ao imunoenensaio (ELISA), para avaliação das citocinas (IL1- β , IL-6, IL-10 e TNF- α). A outra ATM foi preservada por fixação de paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), a 4°C, para processamento histológico e submetidas as colorações (Azul de Toluidina e Picrossirius Vermelho-Hematoxilina). Os resultados foram avaliados por ANOVA ou Kruskal-Wallis, na dependência da distribuição dos dados e da homocedasticidade das variâncias. Foi possível observar um aumento significativo de IL-6, IL-1 β e TNF- α nos G2: OA e G3: OA+AR ($p < 0,05$), em relação aos grupos G1, G4, G5 e G6. Em G5: OA+AR+ ω 150 e G6: OA+AR+ ω 300, observamos que as IL-6 e TNF- α não houve efeito adicional ($p > 0,05$) em relação a G1: controle. O nível das citocinas de IL-6, de IL-1 β , IL-10 e TNF- α , não mostraram diferenças em relação aos tratamentos ω 150 e ω 300 e dexa ($p > 0,05$). A espessura total da cartilagem foi menor em G3: AR+OA do que em G2: OA ($p < 0,0024$). O grupo ω 300 mostrou um aumento em relação aos grupos G2: OA ($p < 0,0006$) e G4: AR+OA+dexa ($p < 0,0033$). O ω 3 nas doses de 300mg/kg ou 150mg/kg, apresenta um bom potencial farmacológico nos tratamentos e controle da artrite reumatoide e osteoartrite.

Palavra-chave: Articulação Temporomandibular. Ácidos Graxos Ômega-3. Citocinas. Inflamação. Modelo animal.

ABSTRACT

The development of osteoarthritis (OA) leads to joint degeneration, and that of rheumatoid arthritis (RA) leads to destruction of the joint surface. Some studies have demonstrated the beneficial effects of omega 3 polyunsaturated fatty acids (ω 3) on the TMJ inflammatory process. The aim of this study was to evaluate the effect of ω 3 on the TMJ of rats with OA and RA. OA was induced with FCA and bovine collagen type II (CII) injected directly into the TMJ and RA injected directly into the TMJ and base of the tail. 36 adult rats were treated by gavage and randomly divided into 6 groups. Test 1- G1: Control – Injection of 50 μ L of 0.89% NaCl at the base of the tail and in each TMJ, treated with NaCl; G2: OA – Injection of 50 μ L of CFA + CII in each TMJ, treated with NaCl; G3: OA+RA – Injection of 100 μ L of CFA + CII at the base of the tail and 50 μ L of CFA+CII in each TMJ, treated with NaCl. Test 2 - G4: OA+RA+dexa – Injection of 100 μ L of CFA + CII at the base of the tail and 50 μ L of CFA+CII in each TMJ, treated with dexamethasone (0.3 mg/kg); G5: OA+RA – ω 150 – Injection of 100 μ L of CFA+CII at the base of the tail and 50 μ L of CFA+CII in each TMJ, treated with ω -3 (150 mg/kg); G6: OA+RA+ ω 300 – Injection of 100 μ L of CFA+CII at the base of the tail and 50 μ L of CFA + CII in each TMJ, treated with ω 3 (300 mg/kg), treatments were started 15 days later RA+OA induction, maintained for 7 days and dead. One of the ATMs was submitted to immunoassay (ELISA) for the evaluation of cytokines (IL1- β , IL-6, IL-10 and TNF- α). The other TMJ was preserved by fixing 10% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4), at 4°C, for histological processing and submitted to staining (Toluidine Blue and Picrosirius Red- Hematoxylin). The results were evaluated by ANOVA or Kruskal-Wallis, depending on the data distribution and the homoscedasticity of the variances. It was possible to observe a significant increase in IL-6, IL-1 β and TNF- α in G2: OA and G3: OA+RA ($p < 0.05$), compared to groups G1, G4, G5 and G6. In G5: OA+RA+ ω 150 and G6: OA+RA+ ω 300, we observed that IL-6 and TNF- α had no additional effect ($p > 0.05$) compared to G1 control. The level of IL-6, IL-1 β , IL-10 and TNF- α cytokines did not show differences in relation to treatments ω 150 and ω 300 and dexa, ($p > 0.05$). Total cartilage thickness was smaller in G3: RA+OA than in G2: OA ($p < 0.0024$) The G ω 300 group showed an increase compared to the G2: OA ($p < 0.0006$) and G4: RA+OA+dexa ($p < 0.0033$) groups ω 3 at doses of 300mg/kg or 150mg/kg has good pharmacological potential in the treatment and control of rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

Keyword: Temporomandibular Joint. Fatty Acids. Omega-3. Cytokines. Inflammation. Animal model.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Articulação Temporomandibular	14
2.2 Disfunção temporomandibular	14
2.3 Artrite reumatoide.....	15
2.4 Osteoartrite	16
2.5 Mediadores Inflamatórios	16
2.6 Indução da artrite	17
2.7 Tratamento farmacológico.....	18
2.7.1 Corticosteroides	18
2.7.2 Ácidos Graxos - Ômega 3 (ω 3).....	19
3 PROPOSIÇÃO	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Considerações éticas	22
4.2 Procedimentos experimentais	22
4.2.1 Fármacos	22
4.2.2 Estudo	22
4.2.3 Animais.....	22
4.2.4 Indução da artrite reumatoide (AR) sistêmica	23
4.2.5 Indução da osteoartrite (OA) na ATM.....	23
4.2.6 Tratamentos	24
4.2.7 Obtenção dos tecidos.....	25
4.2.8 Processamento histológico.....	25
4.2.8.1 Morfometria	25
4.2.9 Imunoensaio.....	26
4.2.10 Análises dos dados	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Níveis de citocinas	28
5.2 Análise histomorfométrica: espessura da cartilagem	30
5.3 Análise histomorfométrica: observações histológicas	33
6 DISCUSSÃO	39

7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS*	49
ANEXOS	61
ANEXO 1 – Certificado do CEUA-UNICAMP	61
ANEXO 2 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	62

1 INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial de união entre a mandíbula e a base do crânio, composta por três elementos ósseos principais: côndilo mandibular, fossa mandibular e tubérculo articular do osso temporal e apresenta também tecidos conjuntivos associados, incluindo o disco articular (Cruz Rizzolo, R.J. e Madeira, 2010).

Transtornos da ATM podem afetar a mandíbula e os músculos mastigatórios. Muitos fatores, como idade, sexo, fatores hormonais, traumas e estresse psicológico podem levar à uma adaptação fisiológica ou, caso contrário, à desorganização da ATM. Além disso, doenças sistêmicas de caráter inflamatório e degenerativas, como osteoartrite (OA) e artrite reumatoide (AR), podem ter impacto significativo nessa articulação (de Souza et al., 2012).

A artrite reumatoide é caracterizada como inflamação crônica, sistêmica, com características degenerativas. Dentre os fatores predisponentes, a artrite reumatoide é uma das formas mais comum de artrite inflamatória e afeta cerca de 1% da população mundial, sendo uma doença inflamatória progressiva que afeta as articulações e possui etiologia desconhecida (Del et al., 2018). Um percentual significativo de pacientes com artrite reumatoide tem sinais e sintomas com envolvimento da ATM (Bessa-Nogueira et al., 2008). Esse envolvimento ocorre mesmo antes do início dos sintomas clínicos e formação de auto anticorpos. Alterações sinoviais podem preceder o aparecimento clínico da doença. Na realidade, todos os pré-requisitos para diferenciação dos osteoclastos e erosão óssea são encontrados nesta fase preliminar subclínica e proporcionam um ambiente adequado para a geração de células de reabsorção óssea, causando o progresso da doença e uma fase mais debilitante e ativa (Schett, 2012).

Osteoartrite é uma forma de artrite, considerada uma doença degenerativa, inicialmente pela perda de cartilagem e remodelação óssea e causando inflamação sinovial (Napimoga et al., 2020). O desenvolvimento da OA é comum na articulação temporomandibular e pode causar dor e diminuição do espaço articular. Os sintomas da OA na ATM, podem não ser perceptíveis no estágio inicial (Kang et al., 2007). Alguns mediadores inflamatórios associados a remodelação óssea, como citocinas e interleucinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 têm sido considerados marcadores da OA na ATM (Vernal et al., 2008).

As citocinas estão predominantemente envolvidas nos processos metabólicos e degenerativos intra-articulares, sendo que concentrações elevadas de IL-1 β , TNF- α e IL-6 estão presentes no fluido sinovial de pacientes e são consideradas pró-inflamatórias. A IL-6 e IL-11 também estão associadas com a adaptação da articulação e a IL-10 é considerada anti-inflamatória (Kaneyama et al., 2004; Kristensen et al., 2014).

Analgésicos, relaxantes musculares, agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), e esteroidais (corticosteroides), têm sido usados para aliviar os principais sintomas (Dym e Israel, 2012; Gil-Martínez et al., 2018). Os AINES exercem sua função inibindo enzimas cicloxigenase (COX 1 e COX 2) e reduzindo a formação de prostaglandinas, reduzindo dor e inflamação, mas podendo causar efeitos colaterais gastrointestinais e cardiovasculares. Os agentes corticosteroides exercem uma potente ação anti-inflamatória (Del et al., 2018) principalmente pela inativação da fosfolipase A2, reduzindo a disponibilidade do ácido araquidônico, diminuindo substrato para a COX-2 e reduz então a síntese de substâncias inflamatórias, como a prostaglandinas (Sadra et al., 2014).

Ainda não há cura para a artrite reumatoide 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 glicocorticoides, tanto injetados intra-articularmente, quanto extra-articularmente, por via local ou sistêmica (Caporali et al., 2013), tornaram-se padrão-ouro para o tratamento da artrite reumatoide e são amplamente utilizados (Kirwan, 2011). Entretanto, a administração intra-articular causa reações erosivas no osso e cartilagem (Ghalayani et al., 2013) e produz efeitos adversos sistêmicos (Habib, 2009). A crescente preocupação com os efeitos colaterais dos glicocorticoides, quando utilizados por longos períodos, levaram à diminuição da utilização indiscriminada na artrite reumatoide (Mota et al., 2013).

Outras estratégias não farmacológicas, tais como fisioterapia, exercícios, ultrassom, terapia manual, acupuntura, laser e estratégias de comportamento cognitivo também foram propostos (Rashid et al., 2013; Figueroba et al., 2014b; Gil-Martínez et al., 2018).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), encontrados em óleos de peixes e vegetais (canola, linhaça e nozes) têm potencial para alterar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Navarini et al., 2017). São considerados anti-inflamatórios, antitrombóticos, antirreumáticos e reduzem os lipídeos sanguíneos, além de

apresentarem propriedades vasodilatadoras, efeito preventivo contra doenças cardíacas, hipertensão, diabetes tipo 2 e artrite reumatoide (Fornazzari et al., 2007).

Esses AGPI são classificados essencialmente em ômega-3 (ω -3), ômega-6 (ω -6), ômega-7 (ω -7) e ômega-9 (ω -9). Quando metabolizado, o ácido linoleico (ω -6) forma os ácidos araquidônico e EPA, e o α -linolênico (ω -3) forma o DHA. Estes ômegas (ω -6 e ω -3) são considerados ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados por mamíferos, os quais sintetizam apenas ω -7 e ω -9 (Layé et al., 2017).

A suplementação dietética com ω -3 mostrou impacto positivo na saúde de animais e seres humanos em diferentes doenças inflamatórias (Bueno-Jr, 2009; Levy, 2010; Serhan e Chiang, 2008;). Estudos com ω -3 demonstraram uma diminuição da inflamação, dor nas articulações e ingestão de AINES em pacientes com artrite reumatoide (Kristensen et al., 2018; Lee et al., 2012; Leslie et al., 2003).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial bicondilar por possuir uma articulação direita e esquerda. As articulações sinoviais possuem estruturas que as caracterizam, como cápsula e disco articular, membrana sinovial, ligamento, fluido e osso. Entretanto, a ATM por possuir fibrocartilagem e não cartilagem hialina, se torna uma articulação singular (Alomar et al., 2007).

A união entre a mandíbula e a base do crânio acontece pela correlação entre as estruturas presentes. Os elementos ósseos principais envolvidos são: o côndilo mandibular, presente no osso mandibular. A superfície articular do osso temporal, eminência articular, tubérculo articular e fossa mandibular, presentes no osso da base do crânio (Alomar et al., 2007).

O côndilo da mandíbula é recoberto por uma cartilagem formada por camadas celulares, nomeadas de camada fibrosa, camada proliferativa, camada maturada e camada hipertrófica (Figueroba et al., 2018).

O disco articular é uma estrutura importante e fundamental por possibilitar a ação de deslocamento entre os ossos mandibular e temporal, onde é localizado e é uma estrutura biconcava e fibrocartilaginosa. A cápsula articular é um fino tecido fibroso que envolve a articulação em um todo e está inserida da área articular da base do crânio até o colo da mandíbula. A membrana sinovial reveste a cápsula articular quase em toda totalidade, menos a fibrocartilagem, que recebe a pressão (Alomar et al., 2007).

A matriz extracelular da cartilagem articular, é constituída por colágeno tipo I na camada mais superficial e as camadas celulares mais profundas contem principalmente colágeno tipo II (Wang et al., 2012; Ghassemi Nejad et al., 2017).

2.2 DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

As desordens temporomandibulares (DTM) são um grupo de alterações que incluem transtornos da ATM, dos músculos mastigatórios e de estruturas associadas (Ouanounou et al., 2017). *Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders* (RDC/ TMD) é uma das classificações diagnósticas utilizadas e são classificadas da seguinte maneira: (i) dor nos músculos mastigatórios (dor miofascial com ou sem limitação de abertura); (ii) deslocamento de disco

(deslocamento com ou sem redução e com ou sem limitação de abertura); (iii) condições articulares (Artralgia, Artrite, Artrose) (Cairns, 2010).

A origem da DTM é multifatorial e é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas como: dor nos músculos da mastigação ou na articulação, função da mandíbula alterada em abertura e fechamento, limitação de abertura de boca (Chaves et al., 2008).

A cronificação da DTM está se tornando frequente na população em geral (Monaco, 2017). A incidência de DTM na população adulta nos Estados Unidos, por exemplo, pode chegar a 4%, sendo maior em idades entre 45 a 64 anos, de acordo com estudos recentes, principalmente de origem degenerativa. Sinais e sintomas prolongados de DTM, podem causar desequilíbrios nos pacientes incluindo psicológicos, comportamentais, físicos e psicossociais, além de limitações específicas como mastigação e fala. Comorbidades podem ser associadas a essa condição como dores de cabeça, nos olhos e doenças sistêmicas de articulação (Willassen et al., 2020).

A prevalência de DTM crônica é maior em mulheres do que em homens, podendo estar relacionada com a alteração de níveis hormonais sexuais endógenos (Yadav et al., 2018). A alteração de estrogênio pode influenciar também condições de dor, ou seja, quando o nível desse hormônio é mais baixo, o limiar de dor pode ser menor (Kang et al., 2007).

2.3 ARTRITE REUMATOIDE

Artrite reumatoide (AR) é uma inflamação crônica autoimune e sistêmica, degenerativa, que pode afetar diversos tecidos e órgãos, causando danos principalmente nas articulações (Schiffman et al., 2015). A ativação de células inflamatórias sinoviais, como macrófagos, infiltrados leucocitários, citocinas e quimiocinas induzem constantes reações degenerativas e inflamatórias e caracterizam a artrite reumatoide (Teixeira et al., 2020).

É uma condição que pode causar dor, inchaço, alterações ósseas e da cartilagem das articulações afetadas, rigidez e limitação das atividades diárias (Li et al., 2017; Napimoga et al., 2020).

A progressão ou evolução da doença pode ser multifatorial, como por exemplo, imunidade, genética ou fatores do ambiente e seu início geralmente é com a inflamação nas regiões periféricas, que podem preceder inclusive os sinais e

sintomas, com evolução para a destruição da cartilagem como um todo e causando perda de função (Morin et al., 2015).

A porcentagem de pacientes com artrite reumatoide que possuem envolvimento da ATM, pode variar de 67 a 92% (Lin et al., 2014). O diagnóstico pode ser difícil pela limitação de informações da histopatologia da ATM na AR, mas os sintomas são característicos como dor na ATM, em músculos mastigatórios, sons e limitação articular (Lin et al., 2014; Quinteiro et al., 2012; Ghassemi-Nejad et al., 2011).

2.4 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é caracterizada pela destruição da cartilagem articular, remodelação óssea e inflamação sinovial. Essa forma de artrite pode ocorrer em qualquer articulação, mais comumente em coluna, mãos e joelhos (Loef et al., 2019).

OA é considerada uma das formas mais comuns de artrite que envolve a articulação temporomandibular. Pode causar degradação e abrasão da articulação e também remodelação óssea, do osso subcondral (Tolba et al., 2020).

Um desequilíbrio entre a reparação da cartilagem articular, controlada pelos condrócitos e o processo de degradação, pode causar dano progressivo à cartilagem articular. Além disso, células inflamatórias com síntese de citocinas, como interleucinas 1β (IL- 1β), IL-6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) são observadas em tecidos articulares com OA (Lemos et al., 2016).

2.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A inflamação é uma resposta biológica de proteção aos tecidos quando existe uma ameaça causadora de lesões, mediada por várias células, como uma resposta imunológica. Expressivo aumento de mediadores envolvidos na cascata inflamatória é observado, como quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas, receptores e um dos grupos mediadores responsáveis por esse processo são as citocinas, que de acordo com o processo biológico, podem exercer funções pró ou anti-inflamatórias (Boshtam et al., 2017). Algumas das citocinas pró-inflamatórias, envolvidas na cascata da inflamação são as interleucinas IL- 1β e IL-6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) que são produzidas por macrófagos ativados e a interleucina anti-inflamatória IL-10 (Jun e Jianxiong, 2009).

A interleucina 1 β (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), são mediadores centrais na artrite reumatóide. A citocina TNF- α tem capacidade de induzir outras citocinas, como a IL-1 β e IL-6, causando aumento de leucócitos, ativando osteoclastos e conseqüentemente destruição articular e sensibilização de nociceptores (Brennan e McInnes, 2008). A IL-6 tem como fontes principais as células endoteliais, fibroblastos e monócitos. TNF- α , IL-1 β e IL-6, são citocinas capazes de desencadear a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, serotoninas, prostanóides ou aminas simpáticas que atuam diretamente nos nociceptores para causar hipernocicepção (Quinteiro et al., 2012). A dor crônica pode ser iniciada quando acontece a sensibilização dos neurônios sensoriais nociceptores (Boshtam et al., 2017; Napimoga et al., 2020).

A interleucina IL-10 é considerada anti-inflamatória pois possui a capacidade de inibir a produção das pró-inflamatórias e reduz os efeitos causados, a inflamação, destruição das articulações e o infiltrado de células. É uma citocina encontrada em grande quantidade em líquidos sinoviais de pacientes com AR e possui propriedades antinociceptivas (Teixeira et al., 2020).

A ATM, mesmo sendo diferenciada das demais articulações sinoviais pela presença da fibrocartilagem, está sujeita a alterações que podem afetar essas articulações (Hansson e Skiöldebrand, 2015). Em articulações não saudáveis ou com lesões inflamatórias, ocorre um desequilíbrio das citocinas presentes nos líquidos sinoviais, favorecendo o aumento do número de citocinas pró-inflamatórias (Kristensen et al., 2014)

Pacientes com alterações na ATM, como deslocamento de disco, osteoartrite e artrite reumatóide, o líquido sinovial apresenta níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6 e TNF- α , que podem causar a degradação da articulação, através da degradação da cartilagem e células ósseas, causando reabsorção e remodelação óssea e desencadeando doenças inflamatórias (Figueroba et al., 2014a).

2.6 INDUÇÃO DA ARTRITE

O estudo da artrite reumatóide é acessível hoje com modelos em animais, permitindo um estudo mais cauteloso do processo inflamatório. Os modelos podem ser realizados com várias espécies e utilizando mecanismos diferentes (Brand, 2005).

Já foram observadas mudanças estruturais e morfológicas no disco articular e no líquido sinovial de pacientes com AR (Wang et al., 2012).

A artrite induzida por colágeno em roedores é uma das mais utilizadas, principalmente na avaliação de drogas para controle da inflamação causada pela AR e degeneração pela OA. A associação do colágeno bovino tipo II (CII) com Adjuvante Completo De Freund (CFA), uma solução de antígeno emulsificado em óleo mineral e suspensão de microbactérias inativadas e secas (*Mycobacterium tuberculosis*), permite o desenvolvimento de inflamação e artrite com características muito próximas às observadas em humanos (Flake et al., 2005; Liu et al., 2015).

As induções também podem ser realizadas por colágeno tipo I, Artrite Induzida Por Proteoglicanos, Artrite Induzida Por Antígeno, Artrite Adjuvante e todas associadas ao CFA, possibilitando as pesquisas em ratos, camundongos e coelhos (Brand, 2005; Wang et al., 2017).

A indução da artrite pode ser realizada de maneira sistêmica ou local. De maneira sistêmica, a aplicação pode ser realizada intradérmica, na base da cauda, por exemplo (Morin et al., 2015), ou diretamente na ATM para desenvolver a inflamação na articulação desejada (Takeda et al., 2008; Wang et al., 2012).

2.7 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

2.7.1 Corticosteroides

O tratamento da AR e OA hoje consiste no controle da dor, inflamação e sinais e sintomas. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroidais, considerados padrão-ouro, são alguns dos fármacos utilizados para o controle da AR (Barbin et al., 2020).

Os glicocorticoides ou corticosteroides endógenos são hormônios produzidos e excretados do córtex das glândulas suprarrenais (Ramamoorthy e Cidlowski, 2016).

Os corticosteroides sintéticos são capazes de diminuir a atração de células inflamatórias diminuindo secreção de mediadores quimiotáticos. O mecanismo de ação é basicamente através da ligação do fármaco a um receptor citoplasmático, glicocorticoide (GR), após a difusão pela membrana celular e então regulação de transcrição de genes (Barnes, 2010).

A ação dos corticosteroides pode ser observada através da indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias, como a anexina-1, proteína inibidora do fator nuclear kB (IkB) e IL-10 (Adcock e Lane, 2003).

Além disso, os corticosteroides atuam através da repressão de genes inflamatórios, interagem com fatores de transcrição gênica, como por exemplo a proteína ativadora-1 e o fator nuclear kB e medeiam a expressão de mediadores inflamatórios considerados importantes na inflamação crônica, que poderiam ser ativados por estímulos inflamatórios, como interleucinas IL-1 β , IL-6 ou TNF- α (Adcock e Lane, 2003).

Dentre os corticosteroides sintéticos utilizados no tratamento da artrite reumatóide, como prednisolona, betametasona e dexametasona, o último é o mais selecionado, atuando no controle da síntese das proteínas e possui meia-vida considerada longa (36 a 72h) (El-Hakim et al., 2005; Sadra et al., 2014).

2.7.2 Ácidos Graxos - Ômega 3 (ω 3)

Os ácidos graxos essenciais, são caracterizados pelas ligações das moléculas. Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) tem duas ou mais ligações duplas presentes na molécula, diferente dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Os AGPI, podem ser divididos basicamente em 2 categorias: ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) e participam do processo de síntese de fosfolipídios essenciais para manter o desenvolvimento de neurônios, a performance do cérebro e sistema nervoso e a totalidade da saúde de membranas celulares (Maroon e Bost, 2006).

O ácido linoleico (ω -6) em excesso na dieta, pode gerar a produção de ácido araquidônico, causando a formação de prostaglandinas pró-inflamatórias, como a PGE₂ e lipoxinas (Maroon e Bost, 2006).

O ácido α -linolênico (ω -3) causa a produção de resolvinas e proteínas, importantes na resolução da inflamação. Resolvinas são mediadores lipídicos, que durante a fase de resolução da inflamação, são biossintetizados através do precursor de ácidos graxos poli-insaturados essenciais (ω -3), a série D denominada docosaenoicos (DHA) e a série E denominada ácidos eicosapentaenoicos (EPA), derivados da dieta, geralmente rica em peixes e vegetais (Freire e Van Dyke, 2013).

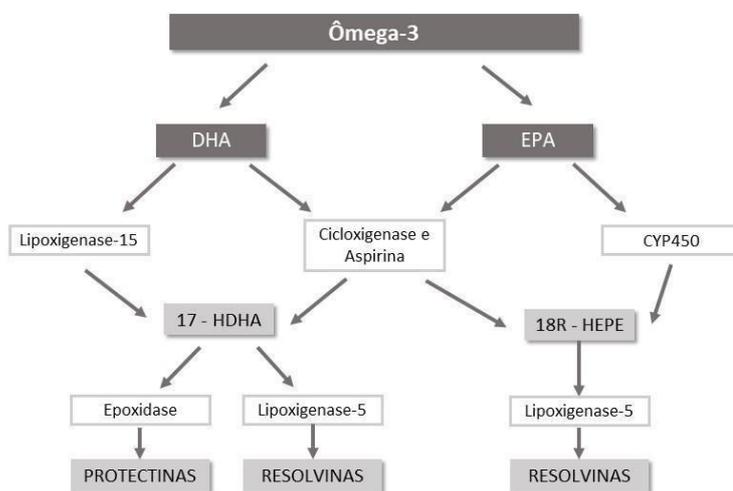
O ω -3, através da conversão do DHA por duas vias, pode gerar a produção de resolvinas e protectinas. A atividade da lipoxigenase-15 dos leucócitos, seu

consumo, gera 17S-hidroxi-DHA, que possui efeitos anti-inflamatórios e será metabolizado pela lipoxigenase-5 em resolvinas e pela epoxidase em protectinas. Por outra via, o metabólito 17S-hidroxi-DHA é formado através da acetilação da cicloxigenase-2 (COX-2) e após isso, metabolizado em resolvinas (Hersberger, 2010).

A via de produção de resolvinas através do EPA, pode acontecer pela acetilação da COX-2, atividade da lipoxigenase-5 e então formação de resolvinas ou através da conversão do EPA em metabólito 18 Hidroxi-eicosapentaenóico (18R-HEPE), causada pela CYP450. A lipoxigenase-5, então, metaboliza o 18R-HEPE, gerando resolvinas (Hersberger, 2010; Freire e Van Dyke, 2000).

Dentre os mecanismos que podem explicar os efeitos benéficos do ω -3 está a competição pelo substrato que previne a conversão de ácido araquidônico (AA) a eicosanóides pró-inflamatórios como as prostaglandinas (PTG), leucotrienos (LEU) e lipoxinas (LX), graças à cicloxigenase (COX) ou lipoxigenase (LOX). Desta forma, o ω -3 funciona como um substrato que resulta em compostos menos potentes do que as PTG e LEU (Harasymowicz et al., 2019; Hersberger, 2010; Seki et al., 2009; Veselinovic et al., 2017).

Figura 1. Transformação de ω -3 em resolvinas e protectinas



Fonte: Modificado de Hersberger et al., 2010; Veselinovic et al., 2017

O ω -3 também inibe a produção de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 ou TNF- α , provavelmente por diminuir a atividade do fator nuclear kappa B (Iverson et al., 2018).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos gerais deste estudo foram comparar dois modelos de indução inflamatória na articulação temporomandibular de ratos visando obter aspectos inflamatórios semelhantes à condição humana. Além disso, o estudo visou estabelecer parâmetros nos tratamentos de intervenção ou prevenção da artrite reumatoide.

Os objetivos específicos do estudo foram:

Ensaio 1: Comparar dois modelos de indução inflamatória com injeção de CFA + CII na base da cauda, ou seja, indução de artrite sistêmica, e na ATM (artrite reumatoide), e somente diretamente na ATM de ratos (osteoartrite);

Ensaio 2: Comparar o efeito dos tratamentos com ω 3 nas doses de 300mg/kg e 150mg/kg, ou dexametasona, na ATM de ratos submetidos à injeção de CFA+CII pelos dois modelos de indução (artrite reumatoide).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia/UNICAMP com protocolo no **5271-1/2019** (Anexo 1).

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 FÁRMACOS

Foram utilizados para anestesia a associação de cloridrato de quetamina (Dopalen injetável, laboratórios Vetbrands) e cloridrato de xilasina (Anasedan injetável, laboratórios Vetbrands). Outras substâncias utilizadas: CFA (suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* a 4mg/mL, Sigma®, 1:1 em solução salina), colágeno bovino tipo II (Becton Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA - 2 mg/mL dissolvido em ácido acético 0.05 M), solução salina estéril (NaCl a 0,9%), Dexametasona (4mg/mL, Aché®), ω -3 (OmegaPure 90%®, EPA 235mg + DHA 165mg, Biobalance Nutraceuticals, Porto Feliz, São Paulo, Brasil)

4.2.2 ESTUDO

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: $n = 1 + [2C \times (s/d)^2]$ $n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2236/0,5)^2]$ $n = 1 + [21,02 \times (0,4472)^2]$ $n = 1 + [21,02 \times 0,2]$ $n = 1 + 4,204$ $n = 5,204$. Ou seja, $n = 6$ animais.

4.2.3 Animais

Foram utilizados 36 ratos, adultos (*Rattus norvegicus* albinus, Winstar, SPF*)¹ com 10 a 12 semanas de vida, com ¹peso entre 350 a 400g.

¹ S.P.F. = Specific Pathogen Free – livre de 6 patógenos específicos

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e passaram por uma semana de adaptação ambiental após o transporte e 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.

4.2.4 Indução da artrite reumatoide (AR) sistêmica

Ensaio 1 – Efeito da injeção de CFA na base da cauda e na ATM de ratos

Para induzir artrite nos animais com injeção na base da cauda (Fig.2), os procedimentos foram modificados daqueles descritos previamente por Liu et al., 2015 e Araujo et al., 2015.

Figura 2. Indução Sistêmica da Artrite na cauda c/ CFA - AR



4.2.5 Indução da osteoartrite (OA) na ATM

A injeção diretamente na ATM foi feita sob anestesia intraperitoneal utilizando xilazina a 2% (10mg/kg) e quetamina a 10% (90mg/kg), o método adaptado daqueles descritos na literatura por Flake et al., 2005, Lemos et al., 2015 e Takeda et al., 2008 (Fig.3).

Foram utilizados 18 animais distribuídos nos seguintes grupos (n=6):

G1: Controle – Injeção de 50 μ L de NaCl 0,9% na base da cauda e diretamente em cada ATM;

G2: OA – Injeção de 50 μ L de CFA + CII diretamente em cada ATM (Harper et al., 2001);

G3: OA+AR – Injeção de 100 μ L de CFA + CII na base da cauda e de 50 μ L de CFA + CII diretamente em cada ATM (Liu et al., 2015).

Figura 3. Indução inflamatória na ATM c/ CFA +CII - OA



O colágeno bovino tipo II foi dissolvido em ácido acético 0,05 M para 2,0 mg/mL e completamente emulsificado com o CFA (1:1). Para imunizar os animais, essa suspensão foi injetada intradermicamente na base da cauda e diretamente na ATM (Grupos 2 e 3) dos animais. Após 5 dias, nova injeção da dose da mesma suspensão foi realizada, como já descrito.

Após 15 dias da indução, todos os animais foram submetidos à administração única, diária, de 1 mL de NaCl 0,9% por via intragástrica, durante 7 dias, visando sua utilização como controle no Ensaio 2.

A indução da Artrite reumatoide enquadra-se no protocolo G3, os animais tiveram acompanhamento diário em relação a dor e sofrimento utilizando a Escala de Grimace. Os animais também foram avaliados semanalmente com relação ao seu peso para a observar o consumo de água e comida. A eutanásia foi realizada adotando Endpoint (Sotocinal et al., 2011).

4.2.6 Tratamentos

Ensaio 2 - Efeito dos tratamentos com ω -3 ou dexametasona na ATM de ratos

Foram utilizados 18 animais, os quais foram submetidos à injeção de 100 μ L de CFA + CII na base da cauda e de 50 μ L de CFA + CII diretamente em cada ATM. Após 15 dias da indução, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=6):

G4: OA+AR+dexa – Administração intragástrica única, diária, de 0,3 mg/kg de dexametasona (Decadron, Achè), durante 7 dias (adaptado de Liu et al., 2015). Este grupo foi utilizado como controle positivo.

G5: OA+AR+ ω 150 – Administração intragástrica única, diária, de 150 mg/kg de ω -3, durante 7 dias;

G6: OA+AR+ ω 300 – Administração intragástrica única, diária, de 300 mg/kg de ω -3, durante 7 dias;

A dose de 300 mg/kg de ω -3 foi escolhida de acordo com a proposta de Diretrizes do Health Canada para obter uma dose equivalente à humana de ω -3 de 3,0g/dia (Park et al.,2013; Morin et al., 2015).

4.2.7 Obtenção dos tecidos

Decorridos 7 dias dos tratamentos para o Ensaio 2 ou da administração da solução salina no Ensaio 1, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia. As ATM foram expostas após incisão da pele na região pré-auricular e dissecadas para retirada em bloco. Esse processo cirúrgico foi efetuado em ambos os lados. A ATM direita ou esquerda, dependendo de sorteio prévio, foi fixada em solução de formol a 10% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), durante 24h a 4°C. Em seguida, foi descalcificado em solução de EDTA 7% e formol 5%, dissolvido no mesmo tampão. A ATM contralateral foi submetida à maceração e centrifugação em tampão de extração celular (tampão tris-HCL 50mM, pH 7,5). O sobrenadante foi submetido ao Imunoensaio (ELISA).

4.2.8 Processamento histológico

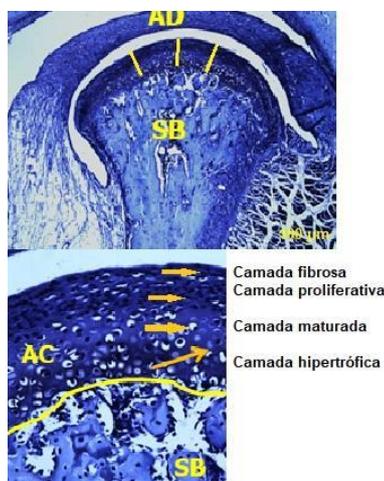
As ATM removidas foram descalcificadas e lavadas em água destilada, desidratadas em etanol 70%, 95% e 100%, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina a 65°C (paraplast). Após a inclusão foram feitos coronalmente, no sentido anteroposterior, no centro do côndilo nove cortes seriados de 6 μ m em micrótomo manual (LEICA, RM 2145), os quais foram colhidos em lâminas histológicas, desparafinizados, hidratados e corados por Azul de Toluidina para visualização dos proteoglicanos (PG) e Picrossirius Vermelho-Hematoxilina (polarização) para visualização de colágeno.

4.2.8.1 Morfometria

A região mais superior do côndilo foi selecionada para as medições. Para verificar a espessura total e de cada camada da cartilagem condilar (fibrosa, proliferativa, maturada e hipertrófica), foram realizadas três medidas em diferentes regiões e os resultados expressos em milímetros (Fig. 4) (Ceotto et al., 2022). Foram feitas fotos em micrografias dos cortes histológicos por meio de um fotomicroscópio

(Eclipse E800, Nikon) e sistema fotográfico Nikon (FDX-35), empregando-se objetivas de 5, 10, 20 vezes em iluminação convencional mensurados através do Image-Pro Software Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA). As imagens foram gravadas com uma câmera fotográfica (CoolSNAP-Pro Color - Roper Scientific Photometrics) adaptada ao microscópio, utilizando objetivas de 5X, 10X e 20X.

Figura 4. Corte coronal da ATM mostrando a região condilar – camadas (F=fibrosa; P=proliferativa; M=madura; e H=hipertrófica) da cartilagem articular medida em três diferentes regiões (coloração hematoxilina e eosina, ampliação x 20)



4.2.9 Imunoensaio

Os sobrenadantes foram analisados para quantificar as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e anti-inflamatória IL-10 na ATM, usando kits de ELISA (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). As placas foram revestidas com um anticorpo de captura para cada citocina, as amostras foram adicionadas aos anticorpos de captura e incubados em temperatura ambiente (TA) por 2 horas. Foi adicionado anticorpos biotinizados como anticorpo secundário e incubados em TA por 2 horas. Logo após, foi adicionado o complexo Avidina-HRP e incubados em TA por 30 minutos. O substrato ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico, Sigma®) foi adicionado e a placa mantida em TA para desenvolvimento de cor. A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405nm com correção de 650nm.

4.2.10 Análises dos dados

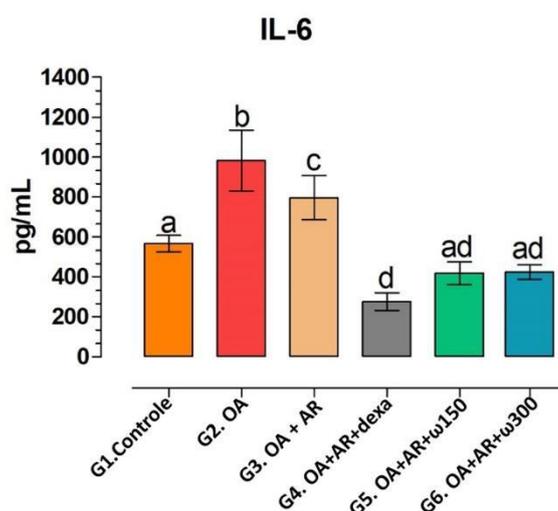
Os dados foram submetidos aos testes de D'Agostino & Pearson para verificar a sua normalidade e ao teste de Bartlett para observar a homocedasticidade. Os dados foram submetidos a análises paramétricas (ANOVA, post-hoc Tukey), e análises não paramétricas, como os testes de Kruskal-Wallis e de Dunn (post-hoc) usados para analisar as concentrações de citocinas com nível de significância estabelecido em 5% ($\alpha = 0,05$), e todas as análises foram realizados usando Biostat 5.0 e GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 NÍVEIS DE CITOCINAS

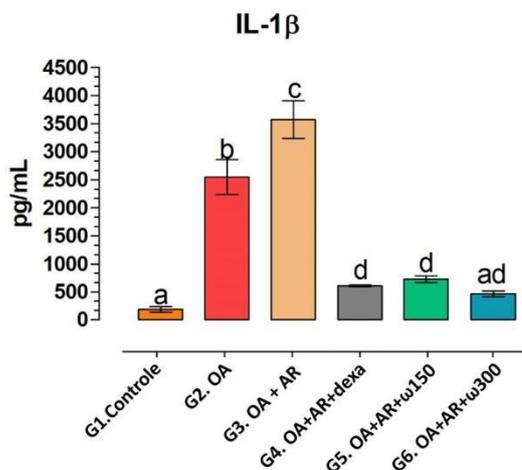
A Figura 5 mostra concentração da interleucina IL-6 nas ATM dos animais de acordo com os grupos em estudo. Foi possível observar um aumento significativo da concentração de IL-6 nos grupos G2: OA e G3: OA+AR ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos. Nos grupos G5: AR+OA+ ω 150 e G6: AR+OA+ ω 300, não houve efeito adicional ($p > 0,05$) em relação ao grupo G1-controle. O grupo G4: AR+OA+dexa apresentou uma diminuição estatisticamente significativa na concentração de IL-6 em relação aos demais grupos.

Figura 5. Média (\pm DP) da liberação de IL-6. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$ teste de ANOVA Tukey



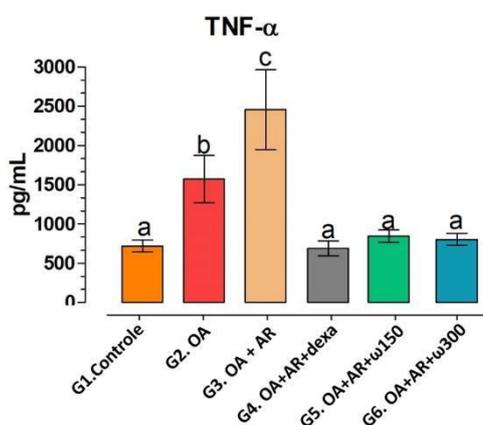
A Figura 6 mostra a concentração da interleucina IL-1 β nas ATM dos animais de acordo com os grupos em estudo. Foi possível observar um aumento significativo da concentração de IL-1 β nos grupos G2: OA e G3: AR+OA, em relação aos demais grupos. Nos grupos G4: AR+OA+dexa e G5: AR+OA+ ω 150, observamos um aumento da concentração de IL-1 β em relação ao grupo G1-controle e menor concentração em relação aos grupos G2: OA e G3: AR+OA ($p < 0,05$). O grupo G6: AR+OA+ ω 300 mostrou resultado semelhante ao grupo G1-controle sem efeito adicional ($p > 0,05$).

Figura 6. Média (\pm DP) da liberação de IL-1 β . Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$ testes de ANOVA Tukey



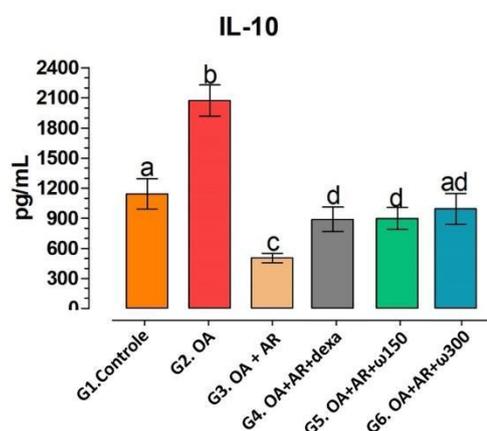
A Figura 7 mostra a concentração da citocina TNF- α nas ATM dos animais de acordo com os grupos em estudo. Foi possível observar um aumento significativo da concentração de TNF- α no grupo G3: AR+OA em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo G2: OA mostrou um nível de concentração de TNF- α aumentado em relação aos grupos G1-controle e os que receberam tratamentos G4: AR+OA+dexa, G5: AR+OA+ ω 150, G6: AR+OA+ ω 300 ($p < 0,05$), e um menor nível de concentração em comparação ao grupo G3: AR+OA ($p < 0,05$). Os grupos G1-controle, G4: AR+OA+dexa, G5: AR+OA+ ω 150 e G6: AR+OA+ ω 300, não mostraram diferença entre si ($p > 0,05$).

Figura 7. Média (\pm DP) da liberação de TNF- α . Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$ testes de ANOVA Tukey.



A Figura 8 mostra a concentração da interleucina IL-10 nas ATM dos animais de acordo com os grupos em estudo. Foi possível observar um aumento significativo da concentração de IL-10 no grupo G2: OA em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo G3: AR+OA mostrou menor nível de concentração de IL-10 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), os grupos G4: AR+OA+dexa, G5: AR+OA+ ω 150 e G6: AR+OA+ ω 300 não mostraram diferença entre si ($p > 0,05$), mas os grupos G4: AR+OA+dexa e G5: AR+OA+ ω 150 mostraram uma diminuição da concentração de IL-10 em relação ao grupo G1-controle e um aumento da concentração em relação ao grupo G3: AR+OA ($p < 0,05$). No grupo G6: AR+OA+ ω 300 o resultado foi semelhante ao grupo G1-controle, sem efeito adicional ($p > 0,05$).

Figura 8. Média (\pm DP) da liberação de IL-10. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$ teste de ANOVA Tukey

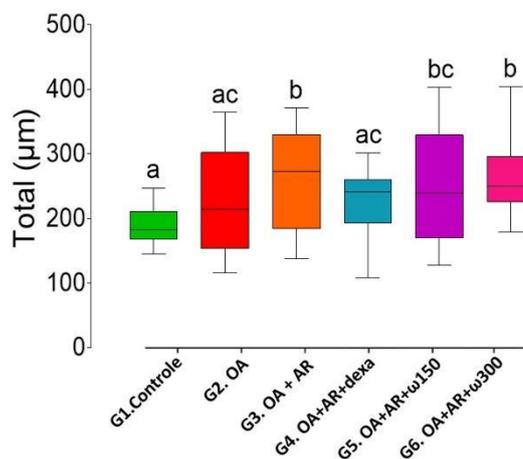


5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA: ESPESSURA DA CARTILAGEM

Os efeitos dos dois modelos de indução e dos tratamentos na espessura total das camadas da ATM são mostrados na figura 9. A espessura total da cartilagem foi menor no modelo de grupo G3: AR+OA em relação aos demais grupos ($p < 0,0001$). Em ambos os grupos tratados com ω 3 (G5: AR+OA+ ω 150 e G6: AR+OA+ ω 300), a espessura da cartilagem da ATM foi maior do que nos grupos G1-controle e G3: AR+OA ($p < 0,0001$). O grupo G6: AR+OA+ ω 300 mostrou um aumento em relação aos grupos G2: OA ($p < 0,0006$) e G4: AR+OA+dexa ($p < 0,0033$). Os animais tratados com ω 150 não mostraram diferença em relação aos grupos G2: OA ($p > 0,1244$) e G4: AR+OA+dexa ($p > 0,2748$). O grupo controle não mostrou diferença em relação aos grupos G2: AO ($p > 0,0547$) e G4: AR+OA+dexa ($p > 0,074$), mas foi diferente em relação ao grupo G3: AR+AO ($p < 0,0001$) apresentando menor espessura.

Figura- 9 - Efeito dos tratamentos sobre a espessura total da ATM dos animais.

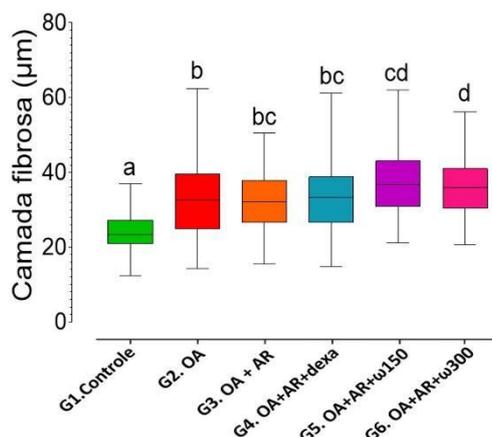
Linha central=mediana, caixa=1º e 3º quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos



O efeito dos tratamentos na espessura da camada fibrosa da ATM é mostrado na figura 10. Nos grupos de animais tratados G4: AR+OA+dexa, G5: AR+OA+ω150 e G6: AR+OA+ω300 ($p < 0,0001$), a espessura da cartilagem da ATM e do não tratado G2: OA ($p < 0,0001$) está aumentada em relação ao grupo G1: controle e G3: AR+OA. O grupo G6: AR+OA+ω300 mostrou um aumento na camada fibrosa em relação aos grupos G2: OA ($p < 0,0013$) e G4: AR+OA+dexa ($p < 0,0196$), mas não diferente do grupo G5: AR+OA+ω150 ($p > 0,9999$).

Figura- 10. Efeito dos tratamentos sobre a espessura de cada camada da ATM.

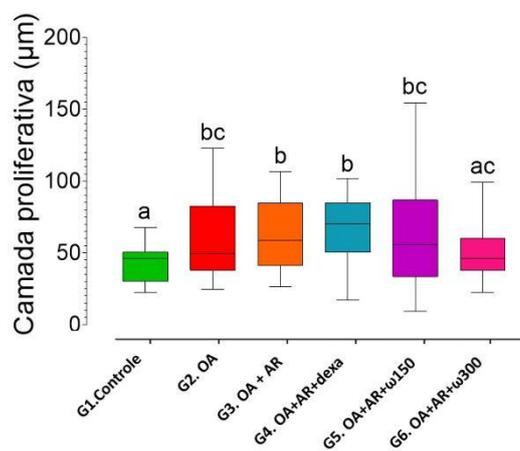
Linha central=mediana, caixa=1º e 3º quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos



Na camada proliferativa (figura 11) o grupo controle não é diferente do grupo G6: AR+OA+ ω 300 ($p>0,9999$), mas difere em relação aos demais grupos G2: OA ($p<0,0125$), G3: AR+OA ($p<<0,0001$), G4: AR+OA+dexa ($p<0,0001$) e G5: AR+OA+ ω 150 ($p<0,0231$). O grupo que recebeu tratamento G5: AR+OA+ ω 150 não difere dos grupos G4: AR+OA+dexa ($p>0,2235$) e G6: AR+OA+ ω 300 ($p>0,7481$). O grupo G3: AR+OA ($p<<0,0001$) é diferente de todos, tendo a menor espessura.

Figura- 11. Efeito dos tratamentos sobre a espessura de cada camada da ATM.

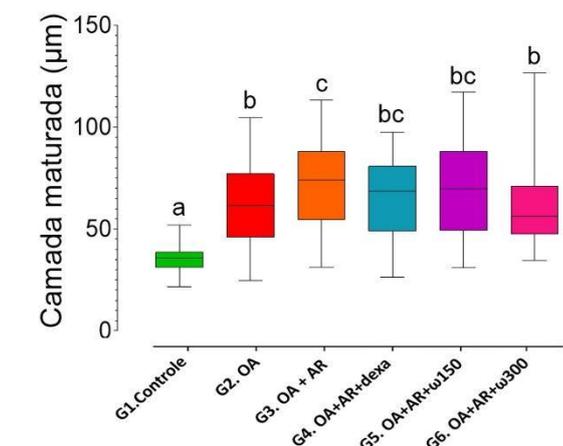
Linha central=mediana, caixa=1^o e 3^o quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos



A camada maturada é representada na figura 12 e o grupo G2: OA e os tratados G4: AR+OA+dexa, G5: AR+OA+ ω 150 e G6: AR+OA+ ω 300 tiveram um aumento nessa camada em relação ao G1: controle e G3: AR+OA ($p<0,0001$). O grupo G2: OA não mostrou diferença em relação aos grupos G4: AR+OA+dexa ($p>0,0928$) e G5: AR+OA+ ω 150 ($p>0,9999$). Os grupos G1: controle e G3: AR+OA não apresentaram diferença entre si ($p>0,9999$).

Figura- 12. Efeito dos tratamentos sobre a espessura de cada camada da ATM.

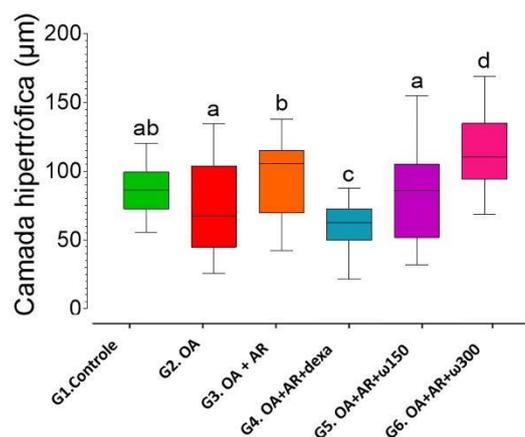
Linha central=mediana, caixa=1^o e 3^o quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.



Em relação a camada hipertrófica, na figura 13, o grupo G6: AR+OA+ω300 apresentou um maior aumento em comparação aos demais grupos ($p < 0,0001$). Os grupos G3: AR+OA e G4: AR+OA+dexa apresentaram menor espessura dessa camada em comparação com os demais grupos ($p < 0,0001$), mas não diferem entre si ($p > 0,9999$), e os grupos G1: controle, G2: OA e G5: AR+OA+ω150 ($p > 0,9999$) não diferem entre si.

Figura- 13. Efeito dos tratamentos sobre a espessura de cada camada da ATM.

Linha central=mediana, caixa=1º e 3º quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos

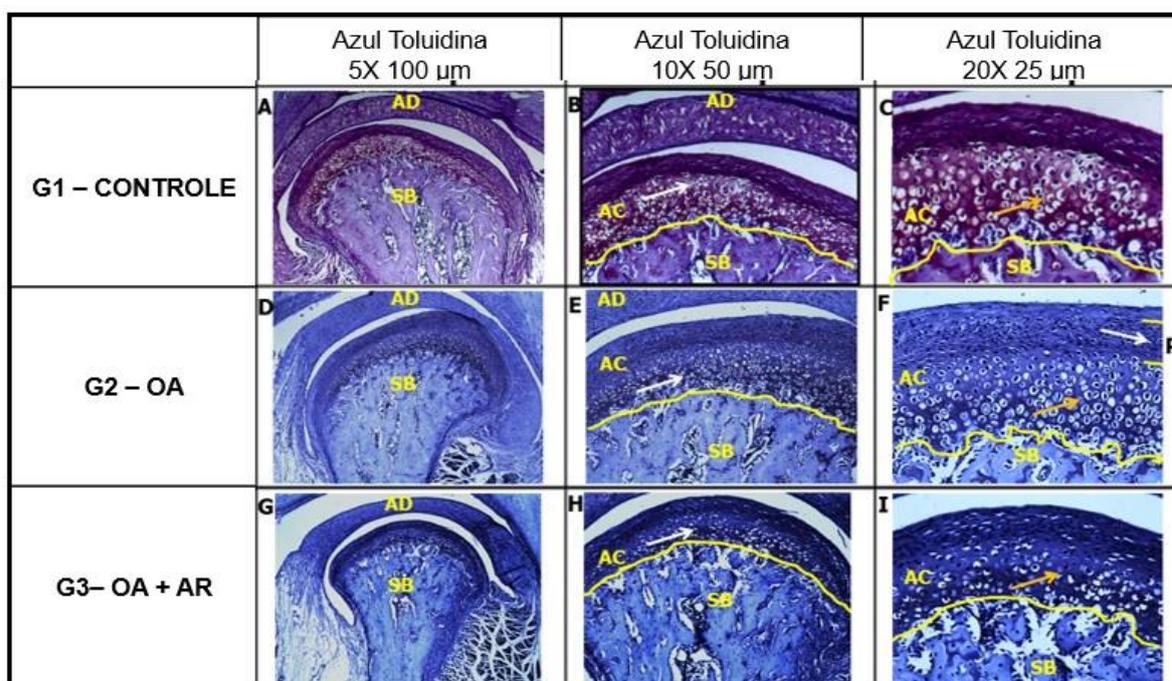


5.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA: OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS

A morfologia da cartilagem da ATM (camadas fibrosas, proliferativas, maturadas e hipertróficas) é mostrada nas figuras 14, 15, 16 e 17. A cartilagem e o osso subcondral do grupo G1-controle em coloração azul de toluidina são demonstrados na figura 14 A, B e C. A seta branca na figura B mostra normalidade de

proteoglicanos pela intensidade de luz, e a seta amarela na figura 14 C mostra organização celular de condrócitos, usadas para estabelecer um ponto de referência para a análise histológica. A seta branca mostra ruptura celular, condrócitos amorfos planos e uma diminuição na densidade de proteoglicanos (diminuição da intensidade do tom azul), que foram observados apenas no grupo G2: OA e G3: AR+OA (Fig. 14E – 14H). Desarranjo celular e aumento da espessura da camada proliferativa são indicados pela seta branca (P) e um aumento no número de condrócitos amorfos é observado no grupo G2: OA, na figura 14F.

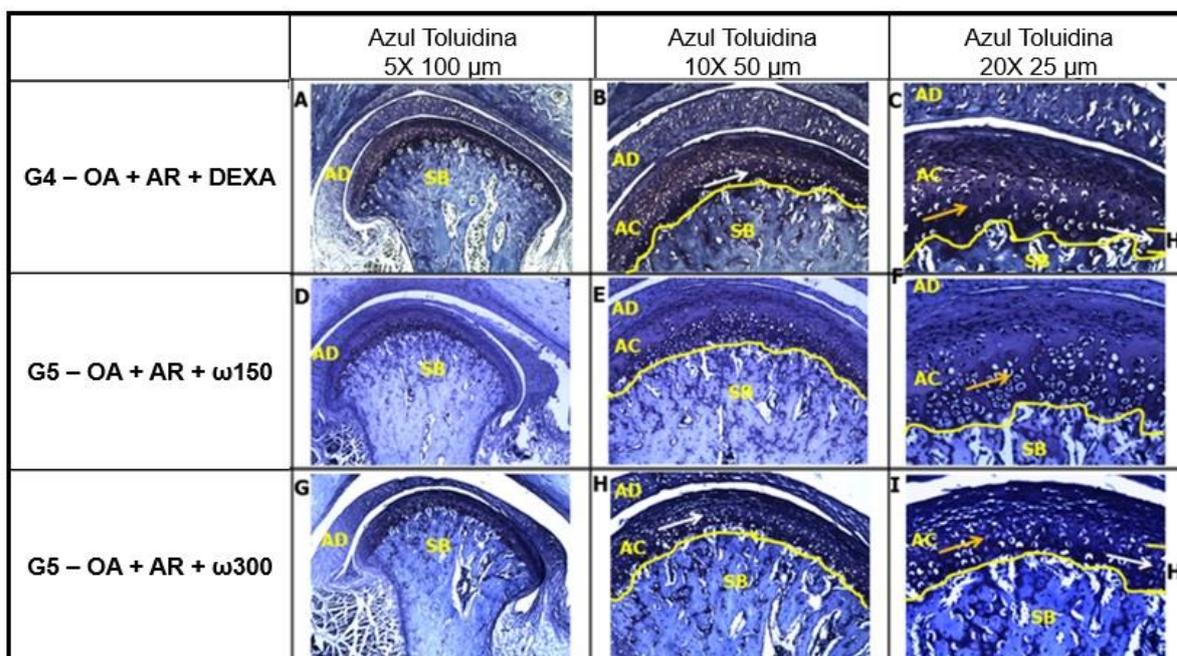
Figura – 14 – Imagens representativas da morfologia da articulação temporomandibular submetidas a indução de osteoartrite (OA) e artrite reumatoide (AR+OA) (n = 6 por grupo). A– I: coloração azul de toluidina aumento de 5 X amplificação, escala Bar de 100µm. 10 X amplificação, escala Bar de 50µm. 20 X amplificação, escala Bar de 25µm. As regiões do cômulo são as seguintes: AD, disco articular; AC, cartilagem articular; SB, osso subcondral. As linhas amarelas dividem a cartilagem (condrócitos e proteoglicanos) e o osso subcondral. B – C: As setas brancas e amarelas mostram a densidade de proteoglicanos dentro da normalidade e uma organização celular de condrócitos. F: seta branca (imagem P) indica mudanças morfológicas na camada proliferativa. E– H: Diminuição na densidade de proteoglicanos (diminuição da intensidade do tom azul). F – I: Ruptura celular, condrócitos amorfos achatados.



A morfologia da cartilagem da ATM é mostrada na figura 15 para os grupos que receberam tratamento com dexametasona e ω 3 nas doses de 150 e 300mg/kg. Dos animais do grupo G4: AR+OA+dexa tratados com dexametasona, na figura 15 B,

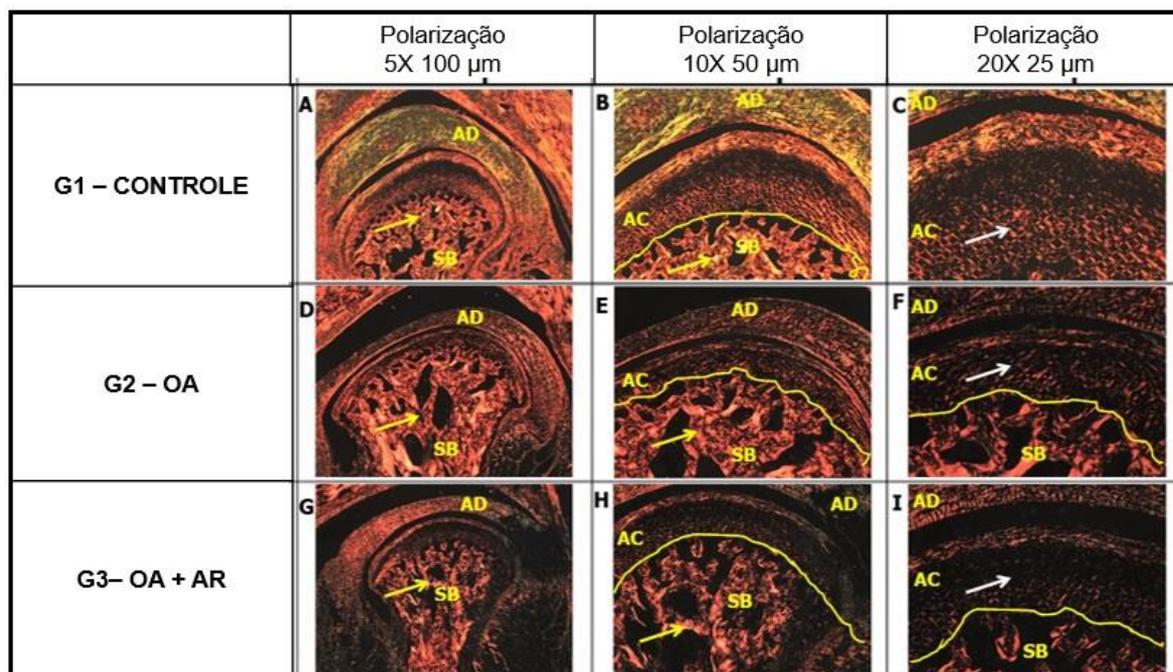
a seta branca indica um aumento na densidade de proteoglicanos (aumento da intensidade do tom azul) e uma reorganização da morfologia celular perto do aspecto normal, uma diminuição do número de condrócitos, indicado pela seta laranja, e também diminuição da espessura da camada hipertrófica, indicado pela seta branca H (Fig. 15B). Nos animais do grupo G5: AR+OA+ ω 150, a seta laranja na figura 15 F, mostra-se uma pequena reorganização de condrócitos e na intensidade de proteoglicanos (intensidade do tom azul). No grupo G4: AR+OA+ ω 300, a seta branca (Fig. 15H) indica um aumento na densidade de proteoglicanos (aumento da intensidade do tom azul) em comparação com os grupos G2: OA e G3: AR+OA (Fig. 14E – H) e similar ao grupo G1: controle na figura 14B. O tratamento com ω 3 nesse grupo mostrou uma organização das células semelhante ao grupo controle, indicada pela seta laranja (Fig. 15I), com um aumento na espessura da camada hipertrófica na seta branca em H (Fig.15I)

Figura – 15 – Imagens representativas da morfologia da articulação temporomandibular submetidas a diferentes tratamentos (n = 6 por grupo). A– I: coloração azul de toluidina aumento de 5 X amplificação, escala Bar de 100 μ m. 10 X amplificação, escala Bar de 50 μ m. 20 X amplificação, escala Bar de 25 μ m. As regiões do côndilo são as seguintes: AD, disco articular; AC, cartilagem articular; SB, osso subcondral. As linhas amarelas dividem a cartilagem (condrócitos e proteoglicanos) e o osso subcondral. B – C: No grupo G4: AR+OA+dexa as setas branca e laranja mostram a densidade de proteoglicanos próximo da normalidade e uma reorganização celular de condrócitos. C: seta branca (imagem H) indica mudanças morfológicas e diminuição na camada hipertrófica. F: No grupo G4: AR + OA + ω 150 a seta laranja indica uma melhora na reorganização celular. H – I: No grupo G4: AR+OA+ ω 300, seta laranja mostra uma reorganização celular e morfologia normal restabelecidas (Fig. 15I) e um aumento na densidade de proteoglicanos (aumento da intensidade do tom azul) é observado pela seta branca (Fig. 15H). I: seta branca (imagem H) indica mudanças morfológicas e aumento da camada hipertrófica.



A morfologia da cartilagem condilar da ATM e osso subcondral é mostrada nas figuras 16 – 17 (A – I) na coloração picosirius vermelho-hematoxilina (polarização). A organização das fibras de colágeno foi observada na cartilagem condilar, indicada pela seta branca (Fig. 16C) e no osso subcondral pela seta amarela (Fig. 16A – B) no grupo G1-controle, usadas para estabelecer um ponto de referência para a análise histológica. Nos grupos G2: OA e G3: AR+OA, a seta amarela indica uma degradação e desarranjo de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 16D – E e 16G – H) e pela seta branca na cartilagem condilar (Fig. 16F e 16I).

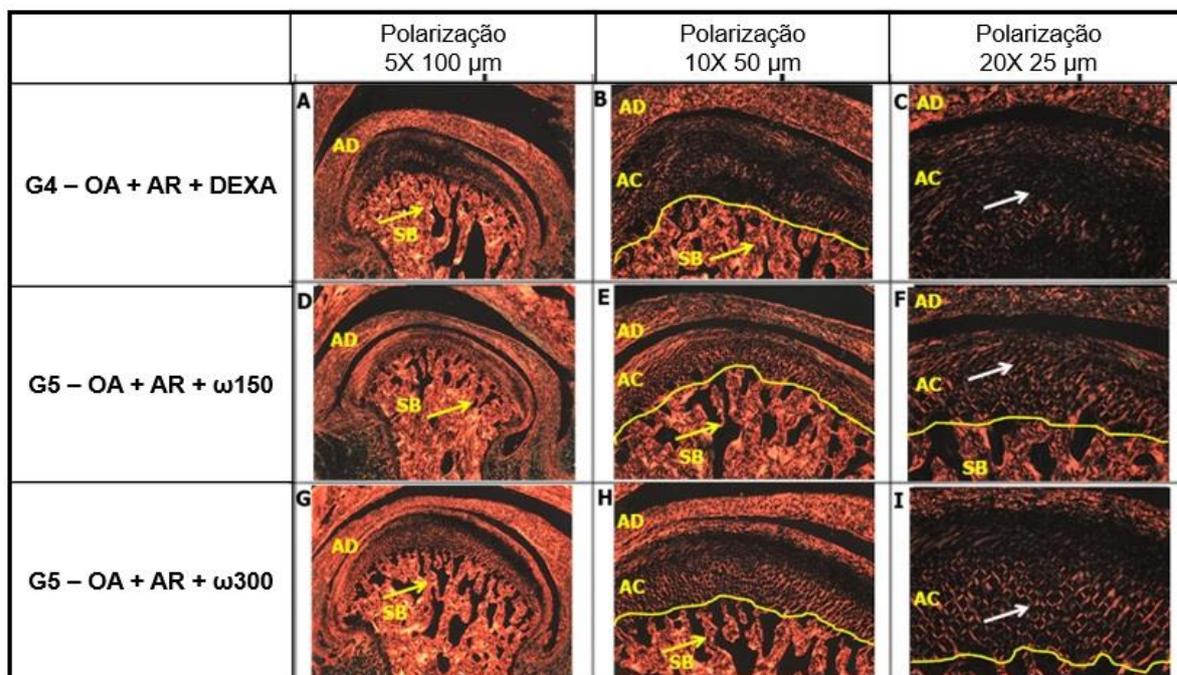
Figura – 16 – Imagens representativas da morfologia da articulação temporomandibular submetidas a indução de osteoartrite (OA) e artrite reumatoide (AR+OA) (n = 6 por grupo). A – I: coloração picosirius vermelho-hematoxilina (polarização), aumento de 5 X amplificação, escala Bar de 100 μ m. 10 X amplificação, escala Bar de 50 μ m. 20 X amplificação, escala Bar de 25 μ m. A linha em amarelo divide a cartilagem condilar e o osso subcondral. A – C: A seta amarela indica uma organização de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 16A – B), a seta branca indica essa mesma organização de fibras de colágeno na cartilagem condilar (Fig. 16C). D – E e G – H: a seta amarela indica uma degradação e desarranjo de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 16D – E e 16G – H). F – I: a seta branca indica uma degradação e desarranjo de fibras de colágeno na cartilagem condilar (Fig. 16F – I).



A morfologia da cartilagem condilar da ATM e osso subcondral dos grupos que receberam tratamento com dexametasona e $\omega 3$ nas doses de 150 e 300mg/kg, é mostrada na figura 17 (A – I), na coloração picrossirius vermelho-hematoxilina (polarização). No grupo G4: AR+OA+dexa, a seta amarela indica uma reorganização de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 17B – C), e a seta branca indica uma reorganização de fibras de colágenos da cartilagem condilar (Fig. 17C). Ambos semelhantes ao grupo G1: controle. No grupo G5: AR+OA+ $\omega 150$, a seta amarela indica uma reorganização de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 17D – E), semelhante ao grupo G1: controle e a seta branca indica uma pequena reorganização de fibras colágenas (Fig. 17F) inferior aos grupos G1: controle, G4: AR+OA+dexa e G6: AR+OA+ $\omega 300$. No grupo G6: AR+OA+ $\omega 300$ a seta amarela indica uma reorganização nas fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 17G – H), e a seta branca indica uma reorganização de fibras de colágenos da cartilagem condilar (Fig. 17I), ambos semelhantes ao grupo G1: controle e G4: AR+OA+dexa.

Figura – 17 – Imagens representativas da morfologia da articulação temporomandibular submetidas a diferentes tratamentos (n = 6 por grupo). A – I: coloração picrossirius vermelho-hematoxilina (polarização), aumento de 5 X amplificação, escala Bar de 100 μm . 10 X amplificação, escala Bar de 50 μm . 20 X amplificação, escala Bar de 25 μm . A linha em amarelo divide a cartilagem condilar e o osso subcondral. A – C: No grupo G4: AR+OA+dexa a seta amarela indica uma reorganização de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 17A – B), a seta branca indica essa mesma reorganização de fibras de colágeno na cartilagem condilar (Fig. 17C). D – F: No grupo G5: AR+OA+ $\omega 150$ a seta amarela indica uma reorganização de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 17D – E), a seta branca indica uma pequena

reorganização de fibras de colágeno na cartilagem condilar (Fig. 17F). No grupo G6: G – I: AR+OA+ ω 300 a seta amarela indica uma reorganização de fibras de colágeno no osso subcondral (Fig. 17G – H), a seta branca indica uma reorganização de fibras de colágeno na cartilagem condilar (Fig. 17I).



6 DISCUSSÃO

O modelo experimental em animais é muito utilizado em estudo para induzir artrite reumatoide e suas características patológicas, inchaço das extremidades, hiperplasia sinovial, proliferação de tecido sinovial, destruição da cartilagem e inflamação excessiva. Existem inúmeros métodos disponíveis para indução, alguns estudos usaram a associação de adjuvante completo de Freund (CFA) e colágeno bovino tipo II CII (injeção na cauda) (Araujo et al., 2015; Liu et al., 2015; Morin et al., 2015; Olson et al., 2013). Ratos machos foram escolhidos para evitar variações fisiológicas relacionadas ao ciclo estral nas fêmeas (Severino et al., 2004). A indução da AR em ratos com CII tem muitas semelhanças com humanos e as fêmeas são mais suscetíveis. O início da artrite é rápido, geralmente desenvolvendo 10-13 dias após a imunização, atingindo o pico após 20 dias e depois declinando gradualmente (Hegen et al., 2008). O modelo de injeção intra-articular de CFA pode ser usado para examinar mudanças agudas precoces na artrite inflamatória da ATM e osteoartrite e permitir uma exploração das alterações na cartilagem articular da ATM durante o estágio inicial da doença (Morel et al., 2019).

Ghassemi-Nejad et al., 2017 estudou o envolvimento da ATM em um modelo sistêmicos de AR induzida por proteoglicano e o estudo realizado por Barbin et al., 2020 foi o primeiro a avaliar o efeito sistêmico da associação de CFA+CII na ATM e a atividade antiartrítica dos ácidos graxos ω -3 e da dexametasona.

No presente trabalho, a indução sistêmica de artrite reumatoide (OA+AR) com CFA+CII ou diretamente na ATM (OA), mostrou um aumento no nível de IL-1 β nos tecidos da ATM em relação ao grupo controle e aos grupos que receberam tratamentos com ω 3 e dexametasona. Resultado semelhante no nível de IL-1 β foi observado na indução sistêmica de artrite reumatoide em Barbin et al., 2020, em AR induzida por proteoglicano em Ghassemi-Nejad et al., 2017 e com injeção intra-articular na ATM osteoartrite em ratos em Kerins et al., 2005. Nível de concentração de TNF- α também mostrou um aumento em relação ao grupo controle e entre os grupos com artrite induzida sistêmica, o mesmo foi observado no estudo realizado por Barbin et al., 2020 e Ceotto et al., 2022, e diretamente na ATM. No grupo controle a TNF- α foi expressa com nível de concentração menor do que os grupos com artrite. A citocina TNF- α é detectada no tecido sinovial da ATM em indivíduos saudáveis (Figueroba et al., 2018).

Apesar de aumentado o nível de ambas citocinas, IL-1 β e TNF- α , nos grupos com indução de artrite, o grupo G3: OA+AR apresentou nível aumentado em relação ao G2: OA, portanto, a patogênese da artrite induzida diretamente na ATM por CFA em animais é mais semelhante a OA do que a RA. O desenvolvimento de osteoartrite é impulsionado por processos inflamatórios, que podem levar a degeneração articular. Nos estágios iniciais da doença. Há um aumento na proliferação celular de condrócitos e na síntese da matriz extracelular. Esse aumento da atividade proliferativa dos condrócitos pode ser destrutivo e levar a um aumento da apoptose celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Morel et al., 2019). Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , interferon- γ , IL-1 β , 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).

Desarranjo celular, aumento da espessura da camada proliferativa e aumento no número de condrócitos amorfos é observado no grupo G2: AO, como pode-se observar na figura 14F, e esses dados vêm corroborar com os estudos de Morel et al., 2019. No grupo G3: OA+AR observamos um aumento das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α sendo que estas citocinas junto com a IL-6 estão envolvidas na metástase de células tumorais e na patologia da artrite reumatóide (Patil et al., 2019).

AR é uma doença autoimune que irá levar o sistema imunológico do corpo a atacar seus próprios tecidos (Wang et al., 2017). A IL-6 é um marcador inflamatório para doenças inflamatórias autoimunes. Sendo identificado níveis elevados tanto no soro quanto nos tecidos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide (Rincon, 2012). Níveis aumentados de IL-6 foram encontrados nos grupos G2: OA e G3: OA+AR, em relação ao grupo controle e os que receberam tratamentos. Diferente das citocinas TNF- α e IL-1 β , onde o nível de concentração é baixo no grupo controle saudável, a IL-6 é expressa com nível de concentração superior ao grupo tratado com dexametasona G4: OA+AR+dexa. IL-6 é considerada uma citocina imune inata porque é abundantemente produzida pela maioria das células imunes inatas (por exemplo, macrófagos e células dendríticas). As células imunes inatas são uma fonte clara de IL-6, que representa uma ponte estratégica de conexão entre os sistemas imunológicos inatos e adaptativos (Nakahara et al., 2003).

O maior nível da IL-6 foi encontrado no grupo G2: OA com osteoartrite e não no grupo G3: OA+AR com artrite reumatoide, sendo a osteoartrite o estágio inicial do processo inflamatório, a IL-6 revela ter efeito anti-inflamatório. Por meio de diferentes mecanismos de ação, pode estimular a síntese de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (Boshtam et al.2017). Esse dado pode ser confirmado com o aumento acentuado do nível de concentração de IL-10 nesses mesmos grupos em relação aos demais grupos.

Diferente desse aumento de IL-10 encontrado no grupo com osteoartrite, o grupo G3, com artrite reumatoide OA+AR, mostrou uma diminuição no nível de concentração em relação a todos os grupos do estudo, esse resultado pode indicar resposta inflamatória grave em ratos com artrite reumatoide, uma vez que a IL-10 atenua a liberação de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos e neutrófilos (Liu et al., 2011). Esse mesmo resultado foi encontrado em animais com artrite reumatoide nos estudos de Barbin et al., 2020 e Ceotto et al., 2022. IL-10, como a citocina anti-inflamatória mais importante, pode reprimir as respostas pró-inflamatórias e limitar os danos causados ao tecido pela inflamação e exerce papel anti-inflamatório principalmente inibindo as citocinas pró-inflamatórias (Boshtam et al.2017). O presente estudo mostrou que a ATM foi afetada tanto pela injeção intra-articular com CFA+CII, ocasionando um quadro de osteoartrite no grupo OA, quanto pela indução sistêmica na cauda mais injeção intra-articular, ocasionado a artrite reumatoide no grupo RA+OA.

No tratamento da osteoartrite e artrite reumatoide, várias abordagens são utilizadas na tentativa de prevenir e desacelerar a progressão da doença. Nutrição adequada, controle de peso corporal, exercício físico, fisioterapia, anti-inflamatório e analgésico (Roush et al., 2010). Os corticosteroides, especialmente dexametasona, são usados para tratar a dor e a inflamação causadas por distúrbios da ATM (Liu e Steinkeler, 2013). A administração de doses altas a longo prazo de corticosteroides está ligada a efeitos adversos graves, incluindo osteoporose, fraturas, úlcera péptica, infecções e doenças cardiovasculares (Lin et al., 2014). Numerosos estudos demonstraram que a cadeia longa de ácidos graxos poli-insaturados ω 3 (PUFA) têm propriedades anti-inflamatórias, sugerindo que elas podem ser benéficas como terapias em distúrbios causados por artrite reumatoide (James et al., 2010).

Nos animais com artrite reumatoide induzida e que receberam os tratamentos, o grupo G4: OA+AR+dexa, tratados com dexametasona mostraram uma diminuição no nível de citocinas IL-1 β e TNF- α na ATM em relação aos grupos com osteoartrite e artrite reumatoide, e não apresentou diferença com os grupos tratados com ω 3 nas doses (150 e 300mg/kg). Resultado semelhante em animais foi obtido por Barbin et al., 2020, com o uso da dexametasona em artrite reumatoide induzida.

Os sintomas da artrite reumatoide estão fortemente relacionados ao nível elevado de citocinas pró-inflamatórias no soro (Kavanaugh e Wells, 2014). A dexametasona reduziu fortemente o nível das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no soro de ratos com artrite reumatoide induzida (Jia et al., 2018). Esse resultado pode ser explicado pela capacidade dos corticoides de aumentar a transcrição de citocinas anti-inflamatórias, como IL-1Ra (IL-1 antagonista do receptor) e IL-10 e inibir a transcrição de outras citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Huebner et al., 2014).

Os animais do grupo G4: OA+AR+dexa, tratados com dexametasona mostraram uma diminuição no nível de concentração de IL-6 nos tecidos da ATM em relação ao grupo controle. A dexametasona mostrou ser mais efetiva na diminuição do nível de concentração em relação a IL-6 do que com as citocinas TNF- α e IL-1 β . Os efeitos farmacodinâmicos da dexametasona em ratos com artrite induzida por colágeno, mostrou que IL-6 é mais sensível sob ação da dexametasona em seu processo de diminuição de concentração até a sua inibição, sendo que doses baixas de corticosteroides podem ser suficientes para suprimir os efeitos mais relevante dessa citocina à erosão óssea (Earp et al., 2008).

O uso terapêutico da dexametasona em animais com artrite induzida por injeção intra-articular de mono-iodoacetato (MIA) após inflamação severa, mostrou uma diminuição significativa na expressão de IL-6 (Kim et al., 2019). A concentração do nível de IL-10 na ATM dos animais do grupo G4: OA+AR+dexa tratados com dexametasona aumentou em relação aos animais do grupo G3: OA+AR sem tratamento e semelhante aos animais tratados com ω 3, nos grupos G5 e G6. Esse mesmo resultado foi obtido no estudo de Barbin et al., 2020, e por Kim et al., 2019 em relação aos animais com artrite induzida. A ação dos corticosteroides pode ser observada através da indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias, como a anexina-1, proteína inibidora do fator nuclear kB (I κ B) e IL-10 (Adcock e Lane, 2003). A terapia com dexametasona aumenta a expressão de L-10, protege a imunidade do

hospedeiro e atenua o dano mediado pela artrite induzida (Kawalkowska et al., 2016). Em relação a dose de dexametasona aplicada em ratos em modelos de artrite induzida, existe diferença, de acordo com os estudos de Del et al., 2018 e Dym e Israel, 2012. A dose mais usual de dexametasona são as mesmas usadas no presente estudo, ou seja, 0,1 mg/kg e essa dose tem se mostrado eficaz na redução no comportamento de dor e inflamação sinovial no modelo de artrite induzida (Ashraf et al., 2011; Wong et al., 2019). Além disso, a duração do tratamento também varia, por exemplo, 24 dias (Ashraf et al., 2011), 5, 14 ou 21 dias (Cuzzocrea et al., 2005) e a mais usual de 1 a 7 dias (Wong et al., 2019).

O ω 3 promoveu alterações no nível de concentração das citocinas pró-inflamatória IL-1 β , TNF- α e IL-6 e anti-inflamatória IL-10 no presente estudo. Há evidências de estudos in-vitro que confirmaram que tanto EPA quanto DHA podem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 em vários tipos de células (Miles e Calde, 2012). No presente estudo, os níveis mais baixos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram encontrados nos tecidos da ATM de ratos com artrite reumatoide tratados com ω 3, G5: OA+AR+ ω 150 e G6: OA+AR+ ω 300. Isso confirma que o efeito analgésico e anti-inflamatório de ω 3 pode estar associado a mediadores de lipídios endógenos, por exemplo, lipoxinas e resolvinas, que são derivadas de ácidos graxos ω 3 (Sommer e Birklein, 2010).

Esse resultado também corrobora com o estudo realizado por Barbin et al, 2020, que mostra níveis mais baixos de concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β tratados com ω 3. Alguns estudos também relatam que EPA e DHA aumentam a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 (Calder, 2017). O nível de concentração de IL-10 teve um aumento similar ao controle nos animais tratados com ω 3 nas doses de 150 e 300 mg/kg, resultado similar foi obtido por Barbin et al, 2020. A dose oral de 300 mg/kg utilizada no presente estudo foi escolhida de acordo com as diretrizes preliminares da Canada Health, para obter uma dose equivalente humana de 3,0 g/dia (Morin et al., 2015). Outros estudos têm sugerido que o benefício sintomático é uma ingestão diária de ω 3 maior que 2,7 g/dia, necessária para atingir o efeito anti-inflamatório (Lee et al., 2012). Alguns estudos em animais usando a dose diária de 85 mg/kg de ω 3 apresentou algum efeito benéfico sobre o nível de citocinas, mas inferior aos animais controle saudável (Abd-Elghafour et al., 2017; Ceotto et al., 2022) e no presente estudo a dose de 150 e 300mg/kg apresentaram resultados similares.

O presente estudo mostrou que a ATM foi afetada tanto pela injeção intra-articular com CFA+CII, ocasionando um quadro de osteoartrite no grupo G2: OA quanto pela indução sistêmica na cauda mais injeção intra-articular ocasionado a artrite reumatoide no grupo G3: OA+AR. A patogênese da artrite na ATM induzida por injeção intra-articular com CFA+CII em modelo animal é mais semelhante à osteoartrite do que à artrite reumatoide. O desenvolvimento de osteoartrite é impulsionado por processos inflamatórios e, finalmente, leva a degeneração articular. A artrite reumatoide é uma doença autoimune que irá levar o sistema imunológico do corpo a atacar seus próprios tecidos (Wang et al., 2017).

Espessamento da camada fibrosa e uma desorganização anormal da cartilagem articular nas camadas proliferativa e hipertrófica, são observados nos animais com osteoartrite no grupo G2: OA. Essas mesmas alterações morfológicas foram observadas no estudo de Tolba et al., 2020. Um aumento da espessura total da condilar foi observado em comparação ao grupo G1: controle de animais saudáveis. Isso pode ser devido a um aumento na zona superficial camada fibrosa, zona polimórfica proliferativa e zonas de condrócitos da camada maturada (Morel et al., 2019). A osteoartrite também induziu uma diminuição da quantidade de proteoglicanos, da presença de condroblastos maduro e com alterações morfológicas, essa quantidade diminuída pode ser atribuída a uma redução da atividade secretora dos condrócitos. Além disso, grandes áreas de basófilos (Lemos et al., 2018). Além dessas alterações, observamos uma aglomeração de condrócitos na camada maturada e hipertrófica, o que pode ser um sinal da progressão da doença. Estudos por indução intra-articular por CFA+CII na ATM de ratos, mostrou diminuição da espessura da cartilagem articular e diminuição na quantidade de proteoglicanos (Xu et al., 2016). A camada fibrosa que reveste o côndilo articular da ATM ao contrário de outras camadas, está aumentada e exibe uma grande deformidade morfológica. A redução de proteoglicanos que estão incorporados na rede da matriz de colágeno reduz a resistência à compressão, e exibe alta deformidade (Lu et al., 2009). Observamos também com base histológica e em luz polarizada, um desarranjo das fibras colágenas principalmente no trabeculado ósseo e na cartilagem condilar nos animais com osteoartrite, que é constituído de colágeno tipo I. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos como em Lemos et al., 2018; Xu et al., 2016 e Tolba et al., 2020.

A indução sistêmica da artrite reumatoide CFA+CII em camundongos promove mais inflamação sinovial, erosão óssea, dano em cartilagem e infiltração de leucócitos em articulações do joelho e as patas traseiras (Oh et al., 2017). A estrutura da cartilagem condilar da ATM é macroscopicamente semelhante a cartilagem articular de outras articulações sinoviais, e também a alterações patológicas, a artrite da TMJ se assemelha a artrite de joelho e quadril (Barbin et al., 2020; de Bont et al., 1993). A indução da artrite reumatoide no grupo G3: AR+OA causou alterações na fibrocartilagem condilar, induzindo um aumento na espessura da camada fibrosa em comparação ao G1: controle saudável. Esses resultados estão de acordo com estudos de artrite reumatoide na ATM induzida por CFA e colágeno tipo I (Wang et al., 2017). Na figura 14I do grupo G3: AR+OA, mostra uma redução da densidade de proteoglicanos observada na coloração azul de toluidina e fibrocondrócitos maduros e amorfos reduzidos. Perda de proteoglicanos também tem sido observada na ATM em outros estudos com artrite reumatoide induzida (Barbin et al., 2020; Ceotto et al., 2022; Griffin et al., 2014). A perda de proteoglicanos reduz a capacidade adaptativa a resistência, compressão e tensão, predispondo a articulação a deformidades. Além disso, o número reduzido de células fibrocartilaginosas pode comprometer a capacidade de auto reparação (Tanaka et al., 2005).

Em base histológica e com luz polarizada, observou-se a quebra, desorganização e degradação de fibras de colágeno, redução do osso subcondral e aumento dos espaços trabeculares. Essa degradação e desorganização também foi constatada em outros estudos em animais com artrite reumatoide sistêmica induzida por CFA+CII (Barbin et al., 2020; Ceotto et al., 2022). A artrite reumatóide em estágio avançado geralmente mostra fissuras profundas, aglomerados de condrócitos e ocorrem quebras no osso subcondral, resultando na abertura de espaços medulares (Batschkus et al., 2017). Na figura 14I pode ser observado na camada madura e hipertrófica, condrócitos aglomerados de forma desorganizada. O aumento da produção de metaloproteinases, enzima responsável pela degradação do colágeno e que induz a supressão de colágeno tipo II, proteoglicanos e indução de mediadores pró-inflamatórios causando degradação da cartilagem articular, característica de doenças artríticas (Hansson e Skiöldebrand, 2015).

No presente estudo, os animais do grupo G4: AR+OA+dexa que receberam tratamento com dexametasona tiveram um aumento na espessura da cartilagem fibrosa, proliferativa e maturada, em comparação aos ratos saudáveis do grupo G1:

controle. Pela análise histológica observamos um aumento na proliferação de condrócitos e pela coloração de azul de toluidina podemos observar, através da densidade de cor, um aumento da síntese de proteoglicanos (Fig. 15C) na cartilagem articular da ATM. Evidências anteriores demonstraram que a dexametasona pode aumentar a proliferação e diferenciação de condrócitos e também a síntese de proteoglicanos (Huebner et al., 2014). Além disso, efeito anabólico no metabolismo do tecido cartilaginoso, o tratamento com glicocorticoides também pode aumentar a retenção de água entre as células. Em um modelo experimental similar ao presente estudo realizado por Barbin et al., 2020, mostrou um aumento nas mesmas camadas da cartilagem condilar, na proliferação e diferenciação de condrócitos e síntese de proteoglicanos pela dexametasona. Também observamos que em animais tratados com dexametasona, o fármaco induziu mudanças positivas no trabeculado ósseo da região subcondral e mudanças acentuadas na rede de colágeno, com espessamento e uma reorientação das fibras colágenas da região subcondral e da cartilagem condilar (Fig 17G – I) próximo do grupo G1: controle e superior ao grupo G3: AR+OA. A terapia com dexametasona em animais com artrite induzida por antígeno (AIA) induziu um aumento não só no número trabecular, mas também na largura trabecular (Oelzner et al., 2010). Em outro estudo com indução sistêmica na cauda com CFA+CII, induziu a uma nova reorientação das fibras de colágeno da cartilagem condilar e menor espaçamento do trabeculado ósseo (Barbin et al., 2020). Os corticosteroides, como a dexametasona, desempenham um papel importante na terapia da artrite reumatoide pelo potente efeito anti-inflamatório e consequente ação rápida de alívio dos sintomas (Li et al., 2017). No entanto, os efeitos colaterais decorrentes do uso prolongado limitam sua utilização a longo prazo.

Na literatura existem somente dois estudos relacionado a artrite reumatoide com ω 3 e articulação temporomandibular (Barbin et al., 2020; Ceotto et al., 2022). Outros estudos relatam o uso ácidos graxos de ω 3 no tratamento e prevenção da osteoartrite e artrite reumatoide (Knott et al., 2011; Olson et al., 2013). No presente estudo, nos animais que receberam tratamento com ω 3, o grupo G6: OA+AR+ IR+ ω 300 na dose de 300mg/kg/dia, a espessura da cartilagem articular aumentou em relação ao grupo com artrite reumatoide G3: AR+OA e G1: controle.

Estudos recentes em animais relatam que o ω 3 alivia o dano e inibe a degradação da matriz da cartilagem articular de joelhos (Sakata et al., 2015; Yu et al., 2015). Barbin et al., 2020 e Ceotto et al., 2022 mostram que o ω 3 aumenta a

espessura da cartilagem condilar e pode proteger cartilagem durante o desenvolvimento da artrite reumatoide. Na dose de 150mg/kg/dia houve um aumento em relação ao grupo G3: AR+OA, mas não ao G1: controle e semelhante ao grupo tratado com dexametasona. Ambas as doses restabeleceram os parâmetros de normalidade aumentando a síntese proteoglicanos, proliferação de condrócitos, espessamento e reorientação das fibras colágenas próximo ao do grupo controle. Ceotto et al., 2022 relataram que o ω 3 induziu maior espessura na cartilagem condilar, melhora na síntese de proteoglicanos, proliferação de condrócitos e reorientação das fibras de colágeno em ratos com artrite reumatoide induzida. Alguns estudos relatam que a EPA é capaz de inibir o estresse oxidativo induzido pela apoptose e perda de matriz de condrócitos (Sakata et al., 2015) e pode estar associado a uma maior síntese de colágeno e diminuição de prostaglandina E2, mediadora inflamatória (Hankenson et al., 2000). Estudos em animais relatam que o ω 3 pode ser benéfico no uso terapêutico da artrite reumatoide (Barbin et al., 2020; Ceotto et al., 2022).

Os tratamentos com dexametasona e ω 3 nas doses de 150mg/kg/dia e 300mg/kg/dia, apresentaram melhora em relação aos animais com osteoartrite e artrite reumatoide. O ω 3 na dose de 300mg/kg/dia teve um melhor desempenho nos padrões de normalidade referente a morfologia da cartilagem condilar e do osso subcondral, em comparação ao ω 3 na dose de 150mg/kg/dia e a dexametasona.

7 CONCLUSÃO

Os dois métodos de indução inflamatória (osteoartrite e artrite reumatoide) causaram danos na articulação temporomandibular e podem ser usados como modelo para indução da osteoartrite e da artrite reumatoide. O ω 3 minimizou os danos na articulação temporomandibular de ratos com modelos induzidos de artrite reumatoide. Nas doses de 300mg/kg ou 150mg/kg, ambas apresentaram um bom potencial farmacológico e podem ser uma alternativa promissora em relação aos glicocorticoides, em atenuar a inflamação e modular a resposta autoimune, auxiliando como condroprotetor articular.

REFERÊNCIAS*

1. Abd-Elghafour BA, El-Sayed NM, Ahmed AA, Zaitone SA, Moustafa YM. Aspirin and (or) omega-3 polyunsaturated fatty acids protect against corti-cohippocampal neurodegeneration and downregulate lipoxin A4 production and formyl peptide receptor-like 1 expression in pentylene-tetrazole-kindled rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2017 Apr;95(4):340-348.
2. Adcock IM, Lane SJ. Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. *J Endocrinol.* 2003 Sep;178(3):347-55.
3. Alomar X, Medrano J, Cabratosa J, Clavero JA, Lorente M, Serra I, et al. Anatomy of the Temporomandibular Joint. *Semin Ultrasound, CT MRI.* 2007 28(3):170–83.
4. Araujo GR, Vaz ER, Fujimura PT, Fonseca JE, de Lima LM, Canhão H, Venturini G, Cardozo KH, Carvalho VM, Napimoga MH, Goulart LR, Gonçalves J, Ueira-Vieira C. Improved serological detection of rheumatoid arthritis: highly antigenic mimotope of carbonic anhydrase III selected in a murine model by phage display. *Arthritis Res Ther.* 2015 Jun 23;17(1):168.
5. Ashraf S, Mapp PI, Walsh DA. Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 Sep;63(9):2700-10.
6. Barbin T, Groppo FC, Toledo FC, Costa YM, Clemente-Napimoga JT, Figueroba SR. The effect of omega-3 in temporomandibular joint synovial tissues of rats with induced arthritis: pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2020 49(10):1319–25.
7. Barnes PJ. Inhaled corticosteroids. *Pharmaceuticals.* 2010 3(3):514–40.
8. Batschkus S, Atanassov I, Lenz C, Meyer-Marcotty P, Cingöz G, Kirschneck C, Urlaub H, Miosge N. Mapping the secretome of human chondrogenic progenitor cells with mass spectrometry. *Ann. Anat.* 2017 July;212:4–10.
9. Bessa-Nogueira RV, Vasconcelos BC, Duarte AP, Góes PS, Bezerra TP. Targeted assessment of the temporomandibular joint in patients with rheumatoid arthritis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Sep;66(9):1804-11.

* 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

10. Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation*. 2017 40(1):340–9.
11. Brand DD. Rodent models of rheumatoid arthritis. *Comp Med*. 2005;55(2):114–22.
12. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3537-45.
13. Bueno-Jr CRB. Relevância e tratamento das lesões características da insuficiência cardíaca na musculatura esquelética. *Medicina Ribeirão Preto*. 2009; 42: 437-450.
14. Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain - basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil*. 2010 37(6):391–410
15. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans*. 2017 Oct 15;45(5):1105-1115.
16. Caporali R, Todoerti M, Sakellariou G, Montecucco C. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2013 73:31–43.
17. 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*. 2022 Jan;239:151812.
18. Chaves TC, Oliveira AS De, Grossi DB. Principais instrumentos para avaliação da disfunção temporomandibular , Parte II : critérios diagnósticos ; uma contribuição para a prática clínica e de pesquisa Main instruments for assessing temporomandibular disorders, part II : diagnostic criteria ; *Fisioter e Pesqui*. 2008 15(1):101–6.
19. Cruz Rizzolo, R.J.; Madeira, M.C. Anatomia facial com fundamentos de anatomia geral. 3ª ed– São Paulo: SARVIER,2010.
20. Cuzzocrea S, Mazzon E, Paola RD, Genovese T, Muia C, Caputi AP, Salvemini D. Effects of combination M40403 and dexamethasone therapy on joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005 Jun;52(6):1929-40.
21. de Bont LG, van der Kuijl B, Stegenga B, Vencken LM, Boering G. Computed tomography in differential diagnosis of temporomandibular joint disorders. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1993 Aug;22(4):200-209.

22. de Souza RF, Lovato da Silva CH, Nasser M, Fedorowicz Z, Al-Muharraqi MA. Interventions for the management of temporomandibular joint osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Apr 18;2012(4):CD007261.
23. Del M, Moura G, Lopes LC, Silva, MT, Barberato-Filho S, Motta R, Bergamaschi C. Use of steroid and nonsteroidal anti-inflammatories in the treatment of rheumatoid arthritis. *Medicine*. 2018 97:41.
24. Dym H, Israel H. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *Dent Clin North Am*. 2012 Jan;56(1):149-61.
25. Earp JC, Dubois DC, Molano DS, Pyszczynski NA, Almon RR, Jusko WJ. Modeling Corticosteroid Effects in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis II: Mechanistic Pharmacodynamic Model for Dexamethasone Effects in Lewis Rats with Collagen-Induced Arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Aug;326(2):546-54.
26. El-Hakim IE, Abdel-Hamid IS, Bader A. Tempromandibular joint (TMJ) response to intra-articular dexamethasone injection following mechanical arthropathy: a histological study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 May;34(3):305-10.
27. 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*. 2014a Nov;59(11):1164-71
28. Figueroba SR, Desjardins MP, Nani BD, Ferreira LE, Rossi AC, Santos FA, Venâncio PC, Aguiar FH, Groppo FC. Effect of diazepam on temporomandibular joints in rats with increased occlusal vertical. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014b May;52(5):438-44.
29. Figueroba S.R, M. F. Groppo, D. Faibish, F. C. Groppo: 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.
30. Flake NM, Bonebreak DB, Gold MS: Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J Neurophysiol*. 2005 93:1585–1597.
31. 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 53:696–703.
32. Fornazzari, Iris M. et al. Fatty acid Omega 3 and the health human being. V *Semana de Tecnologia em Alimentos* 2007 v.02,n.01.Ponta Grossa.

33. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013 Oct;63(1):149-64.
34. Ghalayani P, Razavi SM, Babadi F, Sardari F. Histological assessment of intra-articular versus intra-peritoneal betamethasone L.A on tempromandibular joint arthritis in rat. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013 10:518–522.
35. Ghassemi-Nejad S, Kobezda T, Rauch TA, Matesz C, Glant TT, Mikecz K. Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular joints in mice with autoimmune inflammatory arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Apr;19(4):458-65.
36. Ghassemi Nejad SG, Kobezda T, Tar I, Szekaneecz Z. Development of temporomandibular joint arthritis: the use of animal models. *Joint Bone Spine*. 2017 Mar;84(2):145-15.
37. Gil-Martínez A, Paris-Aleman A, López-de-Uralde-Villanueva I, La Touche R. Management of pain in patients with temporomandibular disorder (TMD): challenges and solutions. *Journal of Pain Research*. 2018; (11): 571–587.
38. Griffin DJ, Vicari J, Buckley MR, Silverberg JL, Cohen I, Bonassar LJ. Effects of enzymatic treatments on the depth-dependent viscoelastic shearproperties of articular cartilage. *J Orthop Res*. 2014Dec;32(12):1652-7.
39. Habib GS. Systemic effects of intra-articular corticosteroids. *Clin Rheumatol*. 2009 28:749–756.
40. Hankenson KD, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KG, Turek JJ: Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000 Jan;223(1):88-95.
41. Hansson E, Skiöldebrand E. Coupled cell networks are target cells of inflammation, which can spread between different body organs and develop into systemic chronic inflammation. *J Inflamm (United Kingdom)*. 2015 12(1):1–11.
42. Harasymowicz NS, Dicks A, Wu CL, Guilak F. Physiologic and pathologic effects of dietary free fatty acids on cells of the joint. *Ann N Y Acad Sci*. 2019 Mar;1440(1):36-53.
43. Harper RP, Kerins CA, McIntosh JE, Spears R, Bellinger LL. Modulation of the inflammatory response in the rat TMJ with increasing doses of complete Freund's adjuvant. *Osteoarthritis Cartilage* 2001Oct;9(7):619-24.

44. 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.
45. Hersberger M. Potential role of the lipoxygenase derived lipid mediators in atherosclerosis: leukotrienes, lipoxins and resolvins. *Clin Chem Lab Med*. 2010 48:1063-1073.
46. Huebner KD, Shrive NG, Frank CB. Dexamethasone inhibits inflammation and cartilage damage in a new model of post-traumatic osteoarthritis. *J Orthop Res* 2014 32:566–72.
47. Iverson C, Bacong A, Liu S, Baumgartner S, Lundström T, Oscarsson J, Miner JN. Omega-3-carboxylic acids provide efficacious anti-inflammatory activity in models of crystal-mediated inflammation. *Sci Rep*. 2018 Jan 19;8(1):1217.
48. James M, Proudman S, Cleland L. Fish oil and rheumatoid arthritis: past, present and future. *Proc Nutr Soc*. 2010 Aug;69(3):316-23.
49. Jia M, Deng C, Luo J, Zhang P, Sun X, Zhang Z, Gong T. A novel dexamethasone-loaded liposome alleviates rheumatoid arthritis in rats. *Int J Pharm*. 2018 Apr 5;540(1-2):57-64.
50. Jun MZ, Jianxiong AN. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesth Clin*. 2009 69(2):482–9.
51. Kaneyama K, Segami N, Sato J, Nishimura M, Yoshimura H. Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Jun;42(3):246-50.
52. Kang SC, Lee DG, Choi JH, Kim ST, Kim YK, Ahn HJ. Association between estrogen receptor polymorphism and pain susceptibility in female temporomandibular joint osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007 May;36(5):391-4.
53. Kavanaugh A., Wells A.F., 2014. Benefits and risks of low-dose glucocorticoid treatment in the patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Oct;53(10):1742-51.
54. Kawalkowska JZ, Hemmerle T, Pretto F, Matasci M, Neri D, Williams RO. Targeted IL-4 therapy synergizes with dexamethasone to induce a state of tolerance by promoting Treg cells and macrophages in mice with arthritis. *Eur J Immunol*. 2016 May;46(5):1246-57.

55. Kerins CA, Carlson DS, Hinton RJ, Hutchins B, Grogan DM, Marr K, Kramer PR, Spears RD, Bellinger LL. Specificity of meal pattern analysis as an animal model of determining temporomandibular joint inflammation/pain. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jun;34(4):425-31..
56. Kim EY, Moudgil KD. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. *Cytokine.* 2017 Oct;98:87-96.
57. Kim H, Yang G, Park J, Choi J, Kang E, Lee BK. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord in rabbit temporomandibular joint model of osteoarthritis. *Sci Rep.* 2019 Sep 25;9(1):13854.
58. Kirwan JR. Combination therapy including glucocorticoids: The new gold standard for early treatment in rheumatoid arthritis? *Ann Intern Med.* 2012 156:390–391.
59. 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.
60. Kristensen KD, Alstergren P, Stoustrup P, Küseler A, Herlin T, Pedersen TK. Cytokines in healthy temporomandibular joint synovial fluid. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2014 41(4), 250–256.
61. Kristensen S, Schmidt EB, Schlemmer A, Rasmussen C, Johansen MB, Christensen JH. Beneficial effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on inflammation and analgesic use in psoriatic arthritis: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Scandinavian Journal of Rheumatology.* 2018 47(1), 27–36.
62. Layé S, Nadjar A, Joffre C, & Bazinet RP. Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology. *Pharmacological Reviews.* 2017 70(1), 12–38.
63. Lee YH, Bae SC, Song GG. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Meta-analysis. *Archives of Medical Research.* 2012 43(5), 356–362.
64. Lemos GA, da Silva PLP, Batista AUD, Palomari ET. Experimental model of temporomandibular joint arthritis: Evaluation of contralateral joint and masticatory muscles. *Arch Oral Biol.* 2018 Nov;95:79-88.
65. Lemos GA, Rissi R, de Souza Pires IL, de Oliveira LP, de Aro AA, Pimentel ER, Palomari ET. Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the

- temporomandibular joint. *Lasers Med Sci.* 2016 Aug;31(6):1051-9.
66. Lemos GA, Rissi R, Pimentel ER, Palomari ET. Effects of high molecular weight hyaluronic acid on induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. *Acta Histochem.* 2015 Jul;117(6):566-75.
67. Leslie G. Cleland, Michael J. James and Susanna M. Proudman. The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs.* 2003 63(9),845–853.
68. Levy BD. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010 82:327-332.
69. Li X, DuBois DC, Song D, Almon RR, Jusko WJ, Chen X. Modeling Combined Immunosuppressive and Anti-inflammatory Effects of Dexamethasone and Naproxen in Rats Predicts the Steroid-Sparing Potential of Naproxen. *Drug Metab Dispos.* 2017 Jul;45(7):834-845.
70. Lin S, Huang J, Zheng L, Liu Y, Liu G, Li N, Wang K, Zou L, Wu T, Qin L, Cui L, Li G. Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing rats. *Calcif Tissue Int.* 2014 Oct;95(4):362-73.
71. Liu F, Steinkeler A. Epidemiology, diagnosis, and treatment of temporomandibular disorders. *Dent Clin North Am.* 2013 Jul;57(3):465-79.
72. Liu M, Mao W, Guan H, Li L, Wei B, Li P: Effects of taurochenodeoxycholic acid on adjuvant arthritis in rats. *Int Immunopharmacol.* 2011 Dec;11(12):2150-8.
73. Liu Q, Zhu XZ, Feng RB, Liu Z, Wang GY, Guan XF, et al. Crude triterpenoid saponins from *Anemone flaccida (Di Wu)* exert ant arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats. *Chin Med.* 2015 Jul;25:10-20.
74. Loef M, Schoones JW, Kloppenburg M, Ioan-Facsinay A. Fatty acids and osteoarthritis: different types, different effects. *Joint Bone Spine.* 2019 Jul;86(4):451-458.
75. Lu XL, Mow VC and Guo XE. Proteoglycans and mechanical behavior of condylar cartilage. *J Dent Res.* 2009 Mar;88(3):244-248.
76. Maroon JC, Bost JW. Omega-3 fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatory: an alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. *Surg Neurol.* 2006 Apr;65(4):326-331
77. 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.

78. Monaco A, Cattaneo R, Marci MC, Pietropaoli D, Ortu E. Central Sensitization-Based Classification for Temporomandibular Disorders: A Pathogenetic Hypothesis. *Pain Res Manag.* 2017;2017:5957076.
79. Morel M, Ruscitto A, Pylawka S, Reeve G, Embree MC. Extracellular matrix turnover and inflammation in chemically-induced TMJ arthritis mouse models. *PLoS One.* 2019 Oct 11;14(10):e0223244.
80. Morin C, Blier PU, Fortin S. Eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid monoglycerides are more potent than docosahexaenoic acid monoglyceride to resolve inflammation in a rheumatoid arthritis model. *Arthritis Res Ther.* 2015 may29;17:142.
81. Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, et al. Guidelines for the drug treatment of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol.* 2013 53:158–183.
82. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Jun;48(6):1521-9. doi:10.1002/art.
83. Napimoga MH, Dantas Formiga WD, Abdalla HB, Trindade-da-Silva CA, Venturin CM, Martinez EF, Rossaneis AC, Verri WA Jr, Clemente-Napimoga JT. Secreted Osteoclastogenic Factor of Activated T Cells (SOFAT) Is Associated With Rheumatoid Arthritis and Joint Pain: Initial Evidences of a New Pathway. *Front Immunol.* 2020 Jul 28;11:1442.
84. Navarini L, Afeltra A, Gallo Afflitto G, Margiotta DPE. Polyunsaturated fatty acids: Any role in rheumatoid arthritis? *Lipids in Health and Disease.* 2017 16(1),1–15.
85. Oelzner P, Fleissner-Richter S, Bräuer R, Hein G, Wolf G, Neumann T. Combination therapy with dexamethasone and osteoprotegerin protects against arthritis-induced bone alterations in antigen-induced arthritis of the rat. *Inflamm Res.* 2010 Sep;59(9):731-41.
86. Oh BR, Suh DH, Bae D, Ha N, Choi YI, Yoo HJ, Park JK, Lee EY, Lee EB, Song YW. Therapeutic effect of a novel histone deacetylase 6 inhibitor, CKD-L, on collagen induced arthritis in vivo and regulatory T cells in rheumatoid arthritis in vitro. *Arthritis Res Ther.* 2017 Jul 3;19(1):154.
87. 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.
88. Ouanounou A, Goldberg M, Haas DA. Pharmacotherapy in Temporomandibular Disorders: A Review. *J Can Dent Assoc*. 2017 Jul;83:h7.
89. Park Y, Lee A, Shim SC, Lee JH, Choe JY, Ahn H, Choi CB, Sung YK, Bae SC. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a 16-week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-design multicenter study in Korea. *J Nutr Biochem*. 2013 Jul;24(7):1367-72.
90. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, Ojha S, Patil CR. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 5;20(18):4367.
91. Quinteiro MS, Napimoga MH, Mesquita KP, Clemente-Napimoga JT. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ2 on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. *Eur J Pain*. 2012 Sep;16(8):1106-15
92. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016 Feb;42(1):15-31.
93. Rashid A, Matthews NS, Cowgill H. Physiotherapy in the management of disorders of the temporomandibular joint-perceived effectiveness and access to services: a national United Kingdom survey. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Jan;51(1):52-7.
94. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol*. 2012 Nov;33(11):571-7.
95. Roush JK, Dodd CE, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Schoenherr WD, Richardson DC, Leventhal PS, Hahn KA. Multicenter veterinary practice assessment of the effects of omega-3 fatty acids on osteoarthritis in dogs, *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Jan 1;236(1):59-66.
96. Sadra V, Khabbazi A, Kolahi S, Hajjaliloo M, Ghojazadeh M. Randomized double-blind study of the effect of dexamethasone and methylprednisolone pulse in the control of rheumatoid arthritis flare-up: A preliminary study. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2014;17(4), 389–393.
97. Sakata S, Hayashi S, Fujishiro T, Kawakita K, Kanzaki N, Hashimoto S, Iwasa K, Chinzei N, Kihara S, Haneda M, Ueha T, Nishiyama T, Kuroda R, Kurosaka M.

- Oxidative stress-induced apoptosis and matrix loss of chondrocytes is inhibited by eicosapentaenoic acid. *J Orthop Res.* 2015 Mar;33(3):359-65.
98. Schett G. Synovitis. An inflammation of joints destroying the bone. *Swiss Med Wkly.* 2012 Oct 15;142:13692.
99. Schiffman E, Ohrbach R, Truelove E, Look J, Anderson G, Goulet JP, List T, Svensson P, Gonzalez Y, Lobbezoo F, Michelotti A, Brooks SL, Ceusters W, Drangsholt M, Ettlin D, Gaul C, Goldberg LJ, Haythornthwaite JA, Hollender L, Jensen R, John MT, De Laat A, de Leeuw R, Maixner W, van der Meulen M, Murray GM, Nixdorf DR, Palla S, Petersson A, Pionchon P, Smith B, Visscher CM, Zakrzewska J, Dworkin SF; International RDC/TMD Consortium Network, International association for Dental Research; Orofacial Pain Special Interest Group, International Association for the Study of Pain. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network* and Orofacial Pain Special Interest Group†. *J Oral Facial Pain Headache.* 2014;Winter;28(1):6-27.
100. Seki H, Tani Y, Arita M. Omega3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolving E1. *Prostaglandins other lipid mediat.* 2009 89:126-130.
101. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol.* 2008 153:200-215.
102. Severino G.S., Fossati I.A., Padoin M.J., Gomes C.M., Trevizan L., Sanvitto G.L., Franci C.R., Anselmo-Franci J.A., Lucion A.B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol. Behav.* 2004 May;81(3):489-98.
103. Sommer C, Birklein F. Fighting off pain with resolvins. *Nat Med.* 2010 May;16(5):518-20.
104. 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.
105. Takeda M, Tanimoto T, Nasu M, Matsumoto S: Temporomandibular joint inflammation decreases the voltage-gated K⁺ channel subtype 1.4-immunoreactivity of trigeminal ganglion neurons in rats. *Eur J Pain.* 2008; 12:189–195.

106. Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, Tanne K. Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. *Histochem Cell Biol.* 2005 Mar;123(3):275-81.
107. 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.
108. Tolba YM, Omar SS, Nagui DA, Nawwar MA. Effect of high molecular weight hyaluronic acid in treatment of osteoarthritic temporomandibular joints of rats. *Arch Oral Biol.* 2020 Feb;110:104618.
109. Vernal R, Velásquez E, Gamonal J, Garcia-Sanz JA, Silva A, Sanz M. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2008 Oct;53(10):910-5.
110. Veselinovic M, Vasiljevic D, Vucic V, Arsic A, Petrovic S, Tomic-Lucic A, Savic M, Zivanovic S, Stojic V, Jakovljevic V. Clinical benefits of n-3 PUFA and α -linolenic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrients.* 2017 Mar 25;9(4):325.
111. Wang DH, Yang MC, Hsu WE, Hsu ML, Yu LM. Response of the temporomandibular joint tissue of rats to rheumatoid arthritis induction methods. *J Dent Sci.* 2017 12(1):83–90.
112. 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.
113. Willassen L, Johansson AA, Kvinnsland S, Staniszewski K, Berge T, Rosén A. Catastrophizing Has a Better Prediction for TMD Than Other Psychometric and Experimental Pain Variables. *Pain Res Manag.* 2020 Nov 12;2020:7893023.
114. Wong H, Liu L, Ouyang W, Deng Y, Wright MR, Hop C. Exposure-effect relationships in established rat adjuvant-induced and collagen-induced arthritis: a translational pharmacokinetic–pharmacodynamic analysis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019 Jun;369(3):406-418.
115. 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.
116. Yadav S, Yang Y, Dutra EH, Robinson JL, Wadhwa S. Temporomandibular Joint Disorders in Older Adults. *J Am Geriatr Soc.* 2018 Jul;66(6):1213-1217.
117. Yu H, Li Y, Ma L, Meng H, Bai X, Fan Z, Yu F, Guo A. A low ratio of n-6/n-

3 polyunsaturated fatty acids suppresses matrix metalloproteinase 13 expression and reduces adjuvant-induced arthritis in rats. *Nutr Res.* 2015 Dec;35(12):1113-21

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado do CEUA-UNICAMP



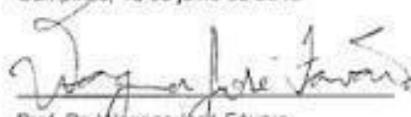
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada INFLUÊNCIA DO ÔMEGA 3 E DA DEXAMETASONA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR CFA NA ATM DE RATOS, registrada com o nº 5271-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Fernanda Elisa Ferreira Ananias, 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 13/06/2019.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	02/07/2019 a 02/04/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	13/06/2019 a 02/04/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	42
Idade/Peso:	03 meses / 300 g
Sexo:	42 machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

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

Campinas, 12 de julho de 2019.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

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

ANEXO 2 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

tese			
ORIGINALITY REPORT			
9%	%	9%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	T. Barbin, F.C. Groppo, F.C. Toledo, Y.M. Costa, J.T. Clemente-Napimoga, S.R. Figueroba. "The effect of omega-3 in temporomandibular joint synovial tissues of rats with induced arthritis: pilot study", International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2020 Publication		3%
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		1%
3	Sandra M. Barbalho, Marcelo D. Bechara, Karina R. Quesada, Ricardo A. Goulart. "Papel dos ácidos graxos ômega 3 na resolução dos processos inflamatórios", Medicina (Ribeirao Preto. Online), 2011		1%