



PATRICIA DO SOCORRO QUEIROZ FEIO

Cirurgiã-dentista

**ESTUDO DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR EM CAMUNDONGOS
DEFICIENTES DE FATOR VIII**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia, área de Estomatologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Corrêa

PIRACICABA

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

F327e Feio, Patricia do Socorro Queiroz.
Estudo da articulação temporomandibular em camundongos deficientes de Fator VIII. / Patricia do Socorro Queiroz Feio. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Maria Elvira Pizzigatti Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Hemofilia. 2. Membrana sinovial. 3. Hemartrose. 4. Sinovite.
I. Corrêa, Maria Elvira Pizzigatti. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

Título em Inglês: Study of temporomandibular joint in mice deficient of factor VIII

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Hemophilia. 2. Synovial membrane. 3. Hemarthrosis. 4. Synovitis

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Maria Elvira Pizzigatti Corrêa, Danyel Elias da Cruz Perez, Erich Vinicius de Paula

Data da Defesa: 19-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



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 19 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata PATRÍCIA DO SOCORRO QUEIROZ FEIO aprovada.



Prof. Dra. MARIA ELVIRA PIZZIGATTI CORRÊA



Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ



Prof. Dr. ERICH VINÍCIUS DE PAULA

A **Deus** por permitir a realização de mais um objetivo.

Aos meus pais, **Lourdes e Rui Feio**, por todo amor, pela dedicação e pelos sacrifícios feitos para apoiar minhas escolhas.

À minha melhor amiga, minha irmã, **Cristiane Feio**, por todo amor compartilhado e pela grande cumplicidade durante minha vida.

À minha querida avó, **Aracy Feio** (*in memoriam*), por todo apoio e pelo enorme carinho, principalmente, no início da minha etapa profissional.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído e realizado com apoio de muitas pessoas dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao coordenador geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos **Profs. Drs. Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustin Vargas e Ricardo Della Coletta**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES** pela concessão de bolsa de estudos.

Ao **Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza**, Professor do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e Coordenador do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da Unicamp, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho.

À **Prof. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi**, Professora do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e chefe do Laboratório de Hemostasia do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da Unicamp, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

À **Prof. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Corrêa**, por permitir a realização deste trabalho, pela amizade e por proporcionar o convívio com pacientes tão especiais.

Ao **Prof. Dr. Fabricio Tuji** e ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva** da Universidade Federal do Pará (UFPA). Obrigada pelas oportunidades concedidas durante minha graduação e por serem, até hoje, exemplos importantes para mim.

Ao amigo **Daniel Berretta**, pelo crescimento profissional conjunto dos últimos 4 anos e, principalmente, pela amizade e pelo apoio tão fundamental nos momentos longe de casa.

À amiga **Lays Sobral**, a primeira amizade conquistada em Piracicaba. Obrigada por dividir as alegrias, as angústias e seus momentos em família comigo.

Às amigas **Camila Beder e Michele Kellerman**, pelos momentos de aprendizado e pelas risadas compartilhadas nas idas ao Hemocentro.

À amiga **Débora Bastos**, pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos na manipulação dos animais e outras informações fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao amigo **Victor Toral-Rizo** pela ajuda na captação das fotos necessárias para a finalização deste trabalho.

Aos amigos: **Adriele Gouvêa, Andréia Bufalino, Bruno Andrade, Daniel Berretta, Camila Beder, Katya Pulido, Lays Sobral, Marisol Martinez, Renato Hopp, Rose Ortega, Victor Toral-Rizo, Wilfredo Gonzalez**. Obrigada pelos conhecimentos trocados, pelas conversas agradáveis e, principalmente, pelos muitos momentos descontraídos que passamos juntos. Com certeza tudo fica melhor e mais fácil quando se tem amigos para compartilhar os diversos momentos da vida.

Aos demais amigos do programa de pós-graduação em Estomatopatologia: **Alan Silva, Ana Carolina Ribeiro, Ana Terezinha Mesquita, Carolina Bitu, Fabiana Seguin, Fernanda Basso, Fernanda Mariano, Jorge Esquiche, Lilia Rocha, Livia Paranaíba, Manoela Pereira, Marco Antonio Carvalho, Marco Aurélio de Andrade, Mário Romañach, Michelle Agostini, Tânia Soares, Rogério Gondak, Sibebe de Aquino.**

Aos colegas do Laboratório de Hemostasia do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), em especial a **Deva**, pela ajuda no início deste trabalho.

Aos amigos paraenses que fiz em Piracicaba, **Camila Andrade, Lucas Moura e Miki Saito**, pelo companheirismo e por dividirem a saudade de nossa cidade.

Aos estagiários do ambulatório do Hemocentro: **Camila Boer, César Noce, Fernanda Basso, Flávia Gambarelli, Paulo Moraes, Patricia Zago, Vanessa Schaira.**

Aos grandes amigos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo - UFPA, principalmente ao **Cléber**, companheiros das primeiras experiências da vida em laboratório. Obrigada pela amizade e incentivo de sempre.

Aos amigos de infância, **Bruna, Bruno, Catarina, Clívia, Liany e Victor**, que cresceram junto comigo e ainda participam de cada passo alcançado, dando apoio mesmo distantes.

À **Natasha**, companheira da graduação, que sempre torceu por mim.

Aos meus familiares, e em especial, à prima **Cecília Feio**, pelos momentos de convívio em família em São Paulo e à prima, **Carolina Feio**, pela grande amizade e apoio de sempre.

À funcionária **Ana Cristina Godoy** e ao **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, pelos preciosos conhecimentos técnicos para realização deste trabalho.

Aos **funcionários do Laboratório de Patologia** e aos **funcionários do Orocentro** pela colaboração e generosidade quando necessárias.

Aos **pacientes do Hemocentro**, pelo exemplo de que a vida é o nosso dom mais precioso.

“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e, que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional”.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossomo X, decorrente da ausência ou da baixa quantidade no plasma dos fatores de coagulação Fator VIII (hemofilia A) ou do Fator IX (hemofilia B). Clinicamente, a hemofilia se caracteriza por episódios recorrentes de sangramentos profundos, que podem ocorrer espontaneamente ou em decorrência de traumatismos. O sistema músculo-esquelético é freqüentemente afetado pelos eventos hemorrágicos nos pacientes portadores de hemofilia. Dentro desse sistema, as articulações são alvos de episódios recorrentes de sangramentos, resultando em hemartroses. Estes episódios estimulam a hiperplasia da membrana sinovial articular, caracterizando o quadro das sinovites hemofílicas. O ciclo vicioso típico de hemartrose-sinovite-hemartrose quando estabelecido, tem como conseqüência a cronificação das alterações agudas articulares. Histologicamente, na sinovite é observada a proliferação de fibroblastos sinoviais e a presença de um infiltrado de células inflamatórias. Apesar da articulação temporomandibular (ATM) ser uma articulação do tipo sinovial são poucos os relatos sobre o seu envolvimento na sinovite hemofílica. Portanto, o objetivo deste estudo foi o de avaliar as características morfológicas da ATM de camundongos deficientes de fator VIII. Além disso, avaliar a indução de sinovite por hiper-extensão bucal. Para isso, as ATM de 30 camundongos deficientes de Fator VIII foram avaliadas. Cinco desses animais fizeram parte do grupo controle. E os outros 25 fizeram parte do grupo experimental para indução de sinovite pelo método de hiper-extensão bucal. Os animais do grupo controle foram sacrificados e as ATMs foram preparadas para avaliação histológica através da microscopia óptica. Os animais do grupo de estudo foram sacrificados após 2 e 5 dias e 2,4 e 6 semanas do procedimento. A seguir, as ATM foram preparadas para análise em microscopia e a membrana sinovial anterior inferior foi avaliada segundo os critérios descritos por Muto *et al* (1998b). Como resultado, as ATMs do grupo controle não apresentaram nenhuma

alteração anatômica e a membrana sinovial anterior inferior apresentou entre 2-5 camadas de células sinoviais. No grupo de estudo o número de camadas de células sinoviais foram semelhantes ao grupo controle. Não foi observada dilatação capilar, adesão sinovial nem a presença de sangue na cavidade articular. Portanto, nossos resultados caracterizaram histologicamente a membrana sinovial anterior inferior de camundongos deficientes de Fator VIII e a metodologia empregada de hiper-extensão bucal não foi capaz de provocar sinovite na membrana sinovial avaliada.

Palavras-chaves: hemofilia; membrana sinovial; hemartrose; sinovite

ABSTRACT

Hemophilia is a hereditary hemorrhagic disease linked to chromosome X due to the deficiency of the activity of coagulation Factor VIII in hemophilia A, or Factor IX in hemophilia B. Clinically, hemophilia is characterized by recurrent severe bleedings, mostly in the musculoskeletal system. When the hemorrhage occurs inside the joint, it is called hemarthrosis. Hemarthrosis can stimulate the synovial membrane which results in synovial hyperplasia that can characterize the hemophilic synovitis. The typical vicious cycle haemarthrosis–synovitis–haemarthrosis when established produces as a consequence, the chronification of joint acute changes. Histologically, synovitis is characterized by proliferation of the sinovial cells surrounded by an inflammatory infiltrate. Despite the fact that temporomandibular joint (TMJ) is a synovial joint there are few clinical reports in the literature regarding its involvement in hemophilic synovitis. Therefore, the goal of this study was to evaluate the morphological characteristics of TMJ in Factor VIII deficient mice. In addition, the second goal was to induce a TMJ synovitis using a forced jaw opening model. For this purpose, 30 Factor VIII deficient mice were enrolled in this study. Five of these animals were included in the control group and their TMJ was evaluated using light microscopy to establish the regular morphology of this joint. The other 25 were submitted to a forced jaw opening, for 5 minutes per day, during 10 days. These animals were sacrificed after 2 and 5 days and 2, 4 and 6 weeks of the procedure. TMJ was prepared for optical microscopy analysis and the anterior inferior synovial membrane was studied using Muto *et al* (1998) criteria. As a result, the anatomic characteristic of the TMJ was similar with other mice and the anterior inferior synovial membrane of this group presented 2-5 cell layers. In the study group, no anatomic changes were observed. No difference was observed regarding the thickness of sinovial cell layer of the studied group and the control group. Capillaries dilatation, synovial adhesion and blood in the joint chambers were not observed. Therefore, our results have histologically

characterized the anterior inferior synovial membrane of TMJ in Factor VIII deficient mice. The methodology used for inducing sinovites was not capable of inducing sinovites in the TMJ of Factor VIII deficient mice.

Key words: hemophilia; synovial membrane; hemarthrosis; synovitis

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1- Hemofilia..... | 3 |
| 2.1.1- Artropatias Hemofílicas | 6 |
| 2.1.2- Experimentos em animais no estudo das artropatias hemofílicas..... | 8 |
| 2.1.3- Articulação temporomandibular e Hemofilia..... | 10 |
| 2.2- Articulação Temporomandibular..... | 11 |
| 2.2.1- Anatomia e histologia da ATM..... | 11 |
| 2.2.2- Membrana Sinovial | 15 |
| 2.2.3- Estudos experimentais em ATM | 16 |
| 3.PROPOSIÇÃO | 18 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 4.1. Modelo animal para estudo | 19 |
| 4.2- Padronização Anestésica | 19 |
| 4.3- Caracterização da Articulação Temporomandibular (ATM) | 20 |
| 4.4. Trauma articular para indução de sinovite | 21 |
| 4.5. Análise histológica | 23 |
| 4.5.1- Critérios para análise | 23 |

| | |
|--|--------|
| 5. RESULTADOS | 26 |
| 5.1- Análise Histológica | 26 |
| 5.1.1- Caracterização morfológica da articulação temporomandibular (ATM) de camundongos deficientes de Fator VIII (FVIII) | 26 |
| 5.1.2- Avaliação do Grupo de Estudo para a Indução de Sinovite | 28 |
| 5.1.2.1- Análise histológica do grupo sacrificado após 2 dias do trauma por hiper-extensão | 29 |
| 5.1.2.2.- Análise histológica do grupo sacrificado após 5 dias do trauma por hiper-extensão | 30 |
| 5.1.2.3 - Análise histológica do grupo sacrificado após 2 semanas do trauma por hiper-extensão | 30 |
| 5.1.2.4 - Análise histológica do grupo sacrificado após 4 semanas do trauma por hiper-extensão | 32 |
| 5.1.2.5- Análise histológica do grupo sacrificado após 6 semanas do trauma por hiper-extensão | 33 |
| 6. DISCUSSÃO | 38 |
| 7. CONCLUSÕES | 43 |
| REFERÊNCIAS | 44 |
| ANEXO - Certificado de aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP | 51 |

1- INTRODUÇÃO

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossomo X, decorrente da ausência ou da baixa quantidade no plasma dos fatores de coagulação Fator VIII (hemofilia A) ou do Fator IX (hemofilia B). Clinicamente, a hemofilia se caracteriza por episódios recorrentes de sangramentos profundos, que podem ocorrer espontaneamente ou em decorrência de traumatismos. (Villaça, 2001).

O sistema músculo-esquelético é freqüentemente afetado pelos eventos hemorrágicos nos pacientes com hemofilia. Dentro desse sistema, as articulações são alvos de episódios recorrentes de sangramentos. Esses episódios são chamados de hemartroses e podem ocorrer entre 30-35 vezes ao ano em crianças com hemofilia grave. (Valentino *et al*, 2004; Stephensen *et al*, 2009).

Os episódios recorrentes de hemartroses estimulam a hiperplasia da membrana sinovial, o que caracteriza o quadro das sinovites hemofílicas. A presença do sangue intra-articular estimula a hiperplasia desta membrana, que é ricamente vascularizada, por isso tende a sangrar novamente. O ciclo vicioso típico hemartrose-sinovite-hemartrose, quando estabelecido, tem como conseqüência a cronificação das alterações agudas articulares (Rodriguez-Merchan, 2007).

A sinovite crônica produz destruição da cartilagem através da produção de enzimas e citocinas inflamatórias que infiltram a membrana sinovial. Além disso, a destruição é favorecida pela distensão mecânica da cápsula articular e pelo aumento da pressão intrarticular. Esse aumento causado pela presença de sangue é responsável pela indução da apoptose dos condrócitos e pela inibição da síntese de proteoglicanos (Lafeber *et al*, 2008).

Os estudos de fisiopatologia da artropatia hemofílica em modelos animais foram realizados focalizando o joelho, por ser essa a articulação mais afetada nos pacientes com hemofilia (Valentino *et al*, 2004; Hakobyan *et al*, 2005). Pouco se sabe sobre o envolvimento da articulação temporomandibular nas artropatias hemofílicas (Birch, 1937; Kaneda *et al*, 1979).

Portanto o objetivo deste trabalho foi o de estudar a articulação temporomandibular de camundongos deficientes de fator VIII e avaliar as características desta articulação após trauma por hiper-extensão bucal.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Hemofilia

A hemofilia A (hemofilia clássica) e a hemofilia B (doença de Christmas) são doenças hemorrágicas hereditárias ligadas ao cromossomo X decorrentes da deficiência quantitativa no plasma dos fatores de coagulação Fator VIII (FVIII) e Fator IX (FIX), respectivamente. Entre elas, a hemofilia A corresponde a 80% dos casos, sendo, portanto a mais freqüente (Villaça *et al*, 2001).

Esta patologia é a mais comum das doenças de deficiência hereditária dos fatores da coagulação (Hoffbrand *et al*, 2001). A prevalência é estimada em 1:10000 homens para hemofilia A e 1:40000 homens para hemofilia B (Antunes, 2002).

A hemofilia A e B são clinicamente indistinguíveis, por isso o diagnóstico deve ser realizado por testes específicos dos fatores de coagulação. A gravidade das manifestações clínicas na hemofilia está, geralmente, relacionada com as concentrações plasmáticas do FVIII e FIX (Villaça, 2001; Bolton-Maggs & Pasi, 2003). De modo geral, as hemofilias são classificadas em leves, moderadas e graves, correspondendo a níveis plasmáticos do FVIII ou do FIX entre 5% e 30%, 1% e 5% e, inferiores a 1% respectivamente (Villaça, 2001).

O Fator VIII é uma proteína da coagulação que circula no plasma na forma de uma cadeia polipeptídica de 2351 aminoácidos (Kaufman, 2000; Franco, 2001; Bolton-Maggs & Pasi, 2003) que é sintetizada primariamente pelos hepatócitos. Porém pequenas quantidades de FVIII também podem ser sintetizadas pelos rins, células endoteliais sinusóides e tecidos linfáticos. Esta proteína é uma das maiores e menos estáveis dos fatores de coagulação, circulando no plasma como um complexo não-covalente com o fator de *von*

Willebrand (FvW). O FVIII possui uma meia-vida de 12 horas em adultos e um tempo menor em crianças (Kaufman, 2000; Bolton-Maggs & Pasi, 2003).

O FIX é uma protease serina de 415 aminoácidos sintetizada no fígado, sendo a maior proteína dependente de vitamina K. A concentração plasmática do FIX é 50 vezes maior que a do FVIII e possui uma meia-vida em torno de 24 horas (Bolton-Maggs & Pasi, 2003).

O papel do fator de coagulação FVIII e do fator de coagulação FIX é reconhecido pela literatura. O modelo de hemostasia baseado em células ressaltou a importância dos fatores FVIII e FIX durante o processo de coagulação sanguínea e da geração de fibrina (Bolton-Maggs & Pasi, 2003). Na fase de iniciação, a coagulação é iniciada pelo "*TF-bearing cell*" (recrutamento do Fator Tecidual celular) que produz os primeiros fatores ativados. Como resultado da injúria vascular, os fatores de coagulação que em condições normais são mantidos dentro do vaso, são liberados. As plaquetas, assim como o fator de coagulação FVIII (FVIII) e o Fator de von Willebrand (FvW), constituem os elementos mais importantes desse processo. Após liberados, esses componentes entram em contato com a trombina gerada durante a fase de iniciação (Hoffman & Monroe, 2000; Romney & Glick, 2009; Smith, 2009).

Após essa fase inicial, as plaquetas compõem o tampão hemostático no sítio do trauma e são ativadas pela trombina. A trombina gerada também é responsável pela ativação dos fatores de coagulação, completando a ativação do Fator de coagulação FV (FV) o qual é liberado das plaquetas ativadas e é responsável pela quebra e subsequente ativação do complexo dos fatores de coagulação FVIII/FvW. Durante a propagação, o fator de coagulação FIX ativado (FIXa) se une ao seu co-fator, FVIIIa, na superfície das plaquetas ativadas. Uma vez formado, o complexo FVIIIa/FIXa ativa o fator de coagulação FX a FXa, o qual imediatamente combina com seu co-fator. O complexo FXa/FVa então converte uma grande quantidade de protrombina a trombina, resultando na quebra do

nas costas e nas pernas da criança com esta doença (Toledo & Bezerra, 1996; Hoffbrand *et al*, 2001).

Alguns episódios de manifestações hemorrágicas surgem com a erupção dos dentes decíduos e quando a criança começa a engatinhar. Esses episódios são comuns nessa faixa etária pela freqüência com que as crianças mordem os lábios e a língua, tendendo a ter sangramentos intermitentes e persistentes em função da hemofilia (Villaça *et al*, 2001).

O sistema músculo-esquelético é freqüentemente afetado pelos eventos hemorrágicos nos pacientes com hemofilia. Dentro desse sistema, as articulações são alvos de episódios recorrentes de sangramentos, resultando em hemartroses. Esses episódios podem ocorrer entre 30-35 vezes ao ano em crianças com hemofilia grave (Valentino *et al*, 2004; Hoots, 2007; Stephensen *et al*, 2009).

Segundo Aledort *et al* (2004), a morbidade dessas hemorragias é significativa, pois por volta dos 25 anos, cerca de 90% dos pacientes com hemofilia que apresentam hemorragias graves terão mudanças crônicas degenerativas em 1 a 6 articulações. As articulações freqüentemente atingidas são: joelhos, cotovelos e tornozelos. Stephensen *et al* (2009) em estudo realizado com 100 pacientes registrados em Centros do Reino Unido, constataram que a freqüência dos sangramentos nos joelhos atualmente é menor que a dos tornozelos e ombros.

2.1.1.- Artropatias Hemofílicas

Os repetidos episódios de hemartroses podem causar um dano articular irreversível às articulações caracterizando as artropatias hemofílicas. Após um sangramento intra-articular, há um curto período com muita dor, perda de força muscular da articulação afetada, além de alterações de volume do local, em decorrência da presença do sangue na área (Goddard & Mann, 2007).

Após 3 ou 4 semanas, o sangue poderá ser degradado e o fluido reabsorvido pela membrana sinovial. Com os cuidados de fisioterapia e exercícios supervisionados, a articulação poderá recuperar a movimentação, força muscular e a aparência normal. Porém repetidos episódios de sangramento, ocorrendo na mesma articulação, tornam esta incapaz de retornar ao que era antes do sangramento. Logo, a frequência de sangramento nessa articulação poderá aumentar de forma espontânea mesmo após todo cuidado de proteção e reabilitação (Mulder & Llinás, 2004).

Desta forma, a articulação atingida passa a ser chamada de articulação alvo e neste estágio pode apresentar um quadro denominado de sinovite crônica (Mulder & Llinás, 2004). A presença do sangue intra-articular estimula a hipertrofia da membrana sinovial que é ricamente vascularizada, por isso tende a sangrar novamente. O ciclo vicioso típico hemartrose-sinovite-hemartrose, quando estabelecido, tem como consequência a cronificação das alterações agudas articulares (Rodriguez-Merchan, 2007).

A sinovite hemofílica é caracterizada histologicamente pela proliferação do tecido sinovial. Vários episódios de extravasamento sanguíneo dentro das articulações provocam distensão da cápsula articular, seguida de uma reação inflamatória aguda do tecido sinovial com infiltração de polimorfonucleares e posteriormente de macrófagos e linfócitos (Mulder & Llinás, 2004; Valentino *et al*, 2007; Lafeber, *et al*, 2008).

A destruição da cartilagem articular é resultante da produção de enzimas e citocinas inflamatórias que infiltraram a membrana sinovial. Além disso, a destruição é favorecida pela distensão mecânica da cápsula articular e pelo aumento da pressão intra-articular causada pela presença do sangue, responsável pela indução da apoptose dos condrócitos e da inibição da síntese de proteoglicanos. A articulação se torna incapaz de restaurar a síntese de matriz

cartilaginosa podendo se desenvolver no local, a artrite destrutiva (Lafeber *et al*, 2008).

Hooiveld *et al* (2004) levantaram a hipótese de que a sinovite, seguida pela destruição da cartilagem e do osso que ocorre após os processos de hemartroses, são causados pela deposição do ferro derivado da hemoglobina. O papel do ferro na etiopatogenia das sinovites hemofílicas foi confirmado pelo trabalho de Roosendal (1998). O autor demonstrou haver depósitos de ferro na membrana sinovial de joelhos de pacientes com hemofilia submetidos à cirurgia ortopédica. Os achados ainda mostraram infiltração linfocítica difusa e neovascularização das camadas subsinoviais.

Wen *et al* (2002) em trabalho *in vitro* exploraram a hipótese do ferro (provenientes da degradação de hemoglobina) atuar induzindo genes envolvidos na proliferação de células sinoviais e na síntese de citocinas inflamatórias. A participação dessas citocinas nas sinovites hemofílicas foi demonstrado por Øvlisen *et al* (2009). Os autores em estudo experimental demonstraram a presença de níveis elevados de IL-1 β , IL-6, de quimiocina derivada de queratinócitos e da proteína quimiotática de monócitos no líquido sinovial de camundongos hemofílicos submetidos à indução de hemartroses. Estes resultados demonstraram pela primeira vez *in vivo* a presença de citocinas em animais como resultado de um episódio de sangramento articular. Este trabalho ainda confirmou a presença de um componente inflamatório na patogênese das sinovites hemofílicas e estabeleceu o envolvimento de citocinas na progressão da morbidade articular.

2.1.2- Experimentos em animais no estudo das artropatias hemofílicas

A patogênese das artropatias hemofílicas envolve uma complicada interação dos sistemas de coagulação e sistema imune, portanto apesar de tudo que pode ser aprendido sobre os sangramentos induzidos na hemofilia utilizando sistemas *in vitro*, os animais vivos são a soma de tudo que é avaliado

individualmente. Desta forma, a habilidade de substituição do uso de animais na pesquisa da hemofilia é um processo limitado (Monahan, 2008).

O primeiro modelo animal bem caracterizado de hemofilia foram os cachorros, pois nestes ocorrem mutações naturais similares as das hemofilias A e B em humanos. Estes modelos são extremamente úteis pela similaridade com humanos (Hoffman, 2008). Entretanto, apesar da muitas vantagens no uso de modelos caninos para hemofilia, este é um modelo muito dispendioso e trabalhoso, principalmente na manutenção das colônias grandes desses animais. Atualmente, a maioria das pesquisas em hemofilia em modelos *in vivo* tem sido conduzida em modelos animais de pequeno porte (Hoffman, 2008).

Bi *et al* (1995) foram os primeiros pesquisadores a desenvolver um modelo de camundongo para hemofilia através de modificação genética no gene do Fator VIII. Estes camundongos deficientes de fator de coagulação FVIII apresentaram sangramento significativo após uma biópsia da cauda, desta forma representam um fenótipo semelhante aos dos humanos com a hemofilia grave.

As colônias de camundongos são mais facilmente produzidas e menos dispendiosas para manutenção do que animais maiores. No entanto deve ser lembrado que como qualquer outro modelo animal, os camundongos não representam necessariamente todos os aspectos da hemostasia em humanos. Esses animais não possuem sangramentos espontâneos em articulações e tecidos moles característicos da hemofilia em humanos. Portanto a literatura mostra a dificuldade em produzir sangramento de maneira reproduzível e quantificável nestes animais (Hoffman, 2008).

Segundo Hoffman (2008), os modelos animais disponíveis para hemofilia foram primeiramente utilizados para estudo da eficácia hemostática nas terapias de reposição e “*bypassing*” e ainda são pouco explorados para estudos das outras conseqüências das tendências hemorrágicas da hemofilia.

Como já relatado, anteriormente, os sangramentos intra-articulares são de grande interesse clínico. Porém, tem sido difícil desenvolver modelos que reproduzam as complicações ortopédicas da hemofilia. Valentino *et al* (2004) conseguiram desenvolver um modelo de hemartrose utilizando uma espécie de mola posicionada nos joelhos de camundongos deficientes de FVIII, provocando assim, trauma local.

Em 2005, Hakobyan *et al*, conseguiram demonstrar em joelhos destes camundongos deficientes de FVIII, as mudanças histopatológicas que ocorriam após os processos de hemartroses nos joelhos. Essas mudanças incluem infiltrado inflamatório por macrófagos e neutrófilos na camada sub-sinovial, aumento das células sinoviais com formação de vilosidades e hiperplasia dos vasos sanguíneos.

Valentino & Hakobyan (2006) estabeleceram uma gradação histológica das sinovites em joelhos de camundongos deficientes FVIII que posteriormente pôde facilitar uma correlação com as mudanças moleculares e bioquímicas que as ocasionam.

Os estudos anteriores permitiram a Mejia-Carvajal *et al* (2008) avaliarem o impacto das hemartroses e sinovites na habilidade física e funcional de joelhos de camundongos deficientes de Fator VIII. Os autores colocaram os camundongos em um dispositivo rotatório para andar e neles foi induzido hemartroses três vezes com intervalos semanais. Os animais que desenvolveram sinovite apresentaram uma habilidade física articular menor quando comparados com aqueles que não desenvolveram sinovite.

2.1.3- Articulação temporomandibular e hemofilia

Apesar do grande comprometimento de diversas articulações nos pacientes com hemofilia, há poucos relatos na literatura que mostrem comprometimento da articulação temporomandibular na artropatia hemofílica.

Birch (1937) foi, possivelmente, o primeiro a relatar hemartrose em ATM de pacientes hemofílicos. No entanto este autor não forneceu detalhes clínicos ou mesmo imaginológicos do caso. Kaneda *et al* (1979) descreveram o caso de uma criança com hemofilia B que se queixava de dor moderada na ATM direita e de dor grave ao movimento mandibular. No exame físico observaram que a pele ao redor da ATM direita não se apresentava vermelha, nem quente, no entanto havia um aumento de volume difuso na área e sensibilidade na aurícula posterior à articulação. Diante do quadro clínico, classificaram o evento como uma hemartrose em decorrência da hemofilia.

Em 20 anos de experiência no ambulatório de hemofilia no Hemocentro da Unicamp, foi observado somente um caso de paciente com hemofilia que se apresentou com dor e edema na região peri-auricular após trauma no local. Porém, não se obteve maiores detalhes imaginológicos da área que pudessem comprovar a tratar-se de uma hemartrose hemofílica.

2.2- Articulação Temporomandibular (ATM)

2.2.1- Anatomia e histologia da ATM

A articulação temporomandibular é classificada como uma articulação sinovial gínglimo-artrodial, por apresentar movimento de dobradiça em um plano, fazendo movimentos de deslizamentos ao mesmo tempo. Além disso, é considerada como uma articulação composta, ou seja, uma articulação com a presença de três ossos, pois funcionalmente o disco articular representaria um osso não calcificado (Gardner, 1998; Okeson, 2000).

A ATM se insere no crânio através da parte inferior do osso temporal, onde está incluído o tubérculo articular e a fossa mandibular. Este tubérculo articular apresenta-se como uma borda lisa e arredondada, situando-se anteriormente à fossa mandibular, descrita como uma depressão no osso temporal (Sharawy, 1989; Fehrenbach & Herring, 1998).

A articulação com o osso temporal é feita pela mandíbula, um osso único, mas que se liga bilateralmente ao crânio, através das duas cabeças mandibulares localizadas nos processos condilares (Okeson *et al*, 2000). Essas cabeças mandibulares são recobertas por uma cápsula articular fibrosa, que também circunda o tubérculo articular e a fossa mandibular superiormente. (Fehrenbach & Herring, 1998).

A ATM ainda possui um importante componente, denominado de disco articular que se localiza entre o osso temporal e a cabeça da mandíbula, sendo que em um corte sagital esta estrutura aparece sobrepondo à cabeça da mandíbula (Okeson *et al*, 2000).

Interpondo-se entre o côndilo e a fossa articular o disco permite uma movimentação suave destas estruturas, pois regulariza a discrepância existente entre elas, bem como absorve choques (Leandro & Nunes, 2000). A ATM é dividida em dois compartimentos separados pelo disco articular, dividindo esta articulação em cavidade articular superior e inferior (Gardner, 1988; Fehrenbach & Herring, 1998; Okeson, 2000).

A ATM apresenta uma série de peculiaridades, pois é uma articulação dupla, mas que mobiliza apenas um osso (a mandíbula) e como dupla articulação apresenta uma grande quantidade de proprioceptores responsáveis por envios de informações ao sistema nervoso a partir de dois pontos simétricos do corpo e de modo simultâneo (Leandro & Nunes, 2000).

Ao contrário da maior parte das articulações móveis, a ATM não suporta maiores pressões ou forças aplicadas sobre as superfícies articulares, pois há uma “subtração” pressórica, diante da tendência da mandíbula em sair de seu ponto articular pela força da gravidade, desenvolvendo certo grau de tração articular (Leandro & Nunes, 2000).

Esta complexa articulação é unida e mecanicamente sustentada por outro importante segmento ósseo, a coluna cervical, sendo razoável aceitar que este complexo seja chamado de craniocervicomandibular. (Maciel & Turell, 2000).

Este complexo possui flexibilidade significativa, é funcional e anatomicamente adaptável, e sua mecânica tem a característica de apresentar um ponto de fechamento rígido, que são os dentes e o periodonto (Maciel & Turell, 2000). Deste modo uma interdependência, tanto na formação, como na estabilidade estática e funcional é estabelecida entre os dentes, as articulações e a coluna cervical (Maciel & Turell, 2000; Okeson, 2000).

Diferentemente das outras articulações sinoviais, em que as superfícies articulares estão cobertas por cartilagem hialina, a articulação temporomandibular é recoberta por uma camada de tecido fibroso (Cate, 2001).

Quatro camadas distintas têm sido descritas recobrando a cabeça óssea do côndilo. A mais superficial que forma a superfície articular é composta por tecido fibroso, a maioria das fibras é colágena, estando arranjadas paralelas à superfície. Fibroblastos e fibrócitos estão esparsamente distribuídos dentro da camada superficial (Sharawy, 1989; Berkovitz *et al*, 2004).

Abaixo da camada superficial está localizada uma zona mais celular na qual ocorre a proliferação, fornecendo uma fonte de células para repopular as camadas adjacentes. Inferiormente, está outra camada fibrosa que pode apresentar aparência variável, com células semelhantes à cartilagem, sendo, portanto, denominada de camada fibrocartilaginosa. (Berkovitz *et al*, 2004).

Imediatamente recobrando o osso, está uma zona delgada de cartilagem calcificada, distinta do osso por suas propriedades de pigmentação diferentes. Esta cartilagem calcificada é um remanescente da cartilagem condilar secundária (Sharawy, 1989; Berkovitz *et al*, 2004).

O disco interarticular da ATM consiste de tecido fibroso colágeno denso, cuja configuração acomoda a convexidade do côndilo, a eminência e a concavidade da fossa mandibular quando a mandíbula assume várias posições. O disco não é igualmente espesso, tendo uma porção central bem delgada e as porções anteriores e posteriores mais espessas (Ash & Schmidseder, 2007).

Na região central mais delgada do disco, as fibras colágenas correm principalmente na direção anteroposterior. Nas porções anteriores e nas posteriores mais espessas, feixes de fibras proeminentes também correm transversalmente com uma orientação médio-lateral, dando as fibras uma aparência muito mais enrolada. Na periferia do disco, os feixes de fibras colágenas estão arranjos circunferencialmente (Cate, 2000).

As células no disco intra-articular são mais numerosas no momento do nascimento e se tornam mais esparsamente distribuídas no adulto. Apesar da forma precisa das células só poder ser determinada pela reconstrução tridimensional, estas células mostram um perfil entre achatado e arredondado, muitas apresentando uma aparência arredondada (Berkovitz *et al*, 2004).

A maior parte do disco intra-articular é avascular e isso determina que a nutrição seja por difusão a partir do líquido sinovial. Vasos sanguíneos estão localizados na periferia do disco. No entanto, posteriormente, na zona bilaminar na região da cavidade superior existem numerosos espaços vasculares sanguíneos (Cate, 2000; Berkovitz *et al*, 2004).

A cápsula fibrosa que reveste a ATM é inserida nas bordas das superfícies articulares da fossa glenóide, na eminência do osso temporal e no colo da mandíbula. Ela é importante para que os movimentos mandibulares ocorram, pois ela se funde com fibras do músculo pterigóideo lateral e se fortalece ao se unir ao ligamento temporomandibular (Leandro & Nunes, 2000).

A cápsula da articulação temporomandibular pode se descrita como uma membrana fibrosa não-elástica que circunda a articulação, inserida acima, posteriormente à fissura escamotimpânica, lateralmente às margens da fossa glenóide e anteriormente à eminência articular (Cate, 2001).

A cápsula consiste de uma camada sinovial interna e outra externa fibrosa, que contêm veias, nervos e fibras colágenas. As projeções sinoviais semelhantes a dígitos ou vilos estão presentes nas superfícies anteriores e posteriores internas das cavidades articulares superior e inferior (Ash & Schmidseder, 2007).

2.2.2- Membrana sinovial

A membrana sinovial é responsável pela produção de líquido sinovial, caracterizado por propriedades bem definidas de viscosidade, elasticidade e plasticidade. O líquido sinovial contém uma pequena população de tipos variáveis de células, tais como monócitos, linfócitos, células sinoviais livres e ocasionalmente, leucócitos polimorfonucleares Sua função é fornecer líquido ambiente às superfícies articulares e promover a lubrificação para aumentar a eficiência e reduzir erosão (Cate, 2001).

A membrana sinovial reveste a superfície interna da cápsula fibrosa da articulação temporomandibular e as margens do disco articular, portanto não recobre as superfícies articulares (Cate, 2001; Berkovitz *et al*, 2004).

Essencialmente, qualquer membrana sinovial consiste em duas camadas, uma íntima celular repousada em uma subíntima vascular, que se une com tecido fibroso da cápsula. A subíntima é formada por um tecido conjuntivo frouxo que contém elementos vasculares junto com fibroblastos dispersos, macrófagos, mastócitos, células adiposas e algumas fibras elásticas (Cate, 2001).

A íntima varia em estrutura, tendo de uma a quatro camadas de células sinoviais embebidas em uma matriz intercelular amorfa livre de fibras.

Freqüentemente, existem deficiências celulares, de modo, que o tecido conjuntivo subíntimo margeia diretamente a cavidade articular. (Cate, 2001).

2.2.3- Estudos experimentais em ATM

As evidências dos achados artroscópicos das cavidades da ATM e de tecidos de discos excisados indicam que tanto deslocamento de disco anterior e doenças degenerativas da ATM são acompanhados de sinovite (Merril, *et al*,1990 Dijkgraaf *et al*,1997 e Gynther *et al*,1998).

Desde a observação destes achados, a sinovite na articulação temporomandibular tem sido estudada em modelos murinos (Muto *et al*,1998a ; Muto *et al*,1998b; Ozaki *et al*, 2008), pois esses roedores apresentam tamanho pequeno e movimentos condilares de translação semelhantes aos dos seres humanos (Weijs, 1977).

Os estudos de Muto *et al* (1998a;1998b), avaliaram as mudanças histológicas da membrana sinovial da ATM de ratos Wistar causadas por trauma através de hiper-extensão de abertura bucal. Nestes estudos os autores encontraram sinovite e a classificaram pela associação de proliferação celular na superfície sinovial, hiperemia capilar, depósitos de fibrina e adesão entre as membranas sinoviais opostas da cavidade articular.

Ozaki, *et al* (2008) publicaram estudo avaliando a influência da ressecção do músculo masseter no desenvolvimento de sinovite nas articulações temporomandibulares de ratos. Os autores utilizaram 4 grupos de ratos: o grupo 1 não sofreu nenhuma intervenção, no grupo 2 foi forçada abertura da boca, no grupo 3 o músculo masseter foi removido e no grupo 4 , os ratos tiveram o masseter removido, além de abertura bucal forçada. Os resultados deste estudo foram avaliados através de análise histológica das ATMs. Os autores concluíram que as mudanças inflamatórias da região sinovial induzidas por abertura bucal

forçada foram mais significativas nos ratos que tiveram o músculo masseter removido.

Além dos estudos citados anteriormente, Lekkas (1994) também utilizou modelos murinos na indução de trauma na cartilagem articular e de pequenos defeitos de disco na ATM. Esse autor comprovou, através de análise clínica, radiográfica e histológica, que o disco é importante componente na degeneração da ATM.

Em estudo recente realizado por Allons *et al* (2009), foi desenvolvido um modelo animal para estudo de dano articular através de hemartrose induzida na ATM de ratos Wistar. Os autores desenvolveram hemartrose nessa articulação após a injeção de sangue diretamente na cavidade articular de todos os animais. Porém conseguiram observar poucos sinais de inflamação ou de degeneração da cartilagem.

3 – PROPOSIÇÃO

Objetivos Gerais:

- 1- Caracterizar morfológicamente a articulação temporomandibular (ATM) em camundongos deficientes de Fator VIII.

Objetivo específico:

- 1- Estudo da membrana sinovial anterior inferior da articulação temporomandibular em camundongos deficientes de Fator VIII mediante trauma induzido por hiper-extensão bucal.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo animal para estudo

Neste estudo foram utilizados 30 camundongos knockout hemofílicos A (linhagem C57/BL6, deficientes do Fator VIII da coagulação), machos e fêmeas, com 3 meses de idade, provenientes do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração comercial Labina[®] (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. As gaiolas ficaram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 horas.

Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo controle, que foi utilizado para a caracterização da ATM desses camundongos e um segundo grupo, grupo de estudo, onde trauma de hiper-extensão foi realizado com objetivo de induzir sinovite.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (nº1642-1, CEEA-IB-UNICAMP, anexo I).

4.2- Padronização Anestésica

A padronização deste experimento aconteceu com algumas dificuldades na anestesia dos animais. Primeiramente, um grupo de camundongos foi submetido à anestesia via intraperitoneal, método amplamente utilizado nos estudos em modelos murinos pela rapidez da absorção do fármaco. Porém, 3 animais morreram num grupo de 5 animais. Por este motivo mudou-se a anestesia para via subcutânea e a resposta dos animais foi melhor. No entanto, a maioria dos animais apresentaram necroses cutâneas e 2 animais morreram em decorrência de hemorragias graves provenientes destes ferimentos (Figura 2).

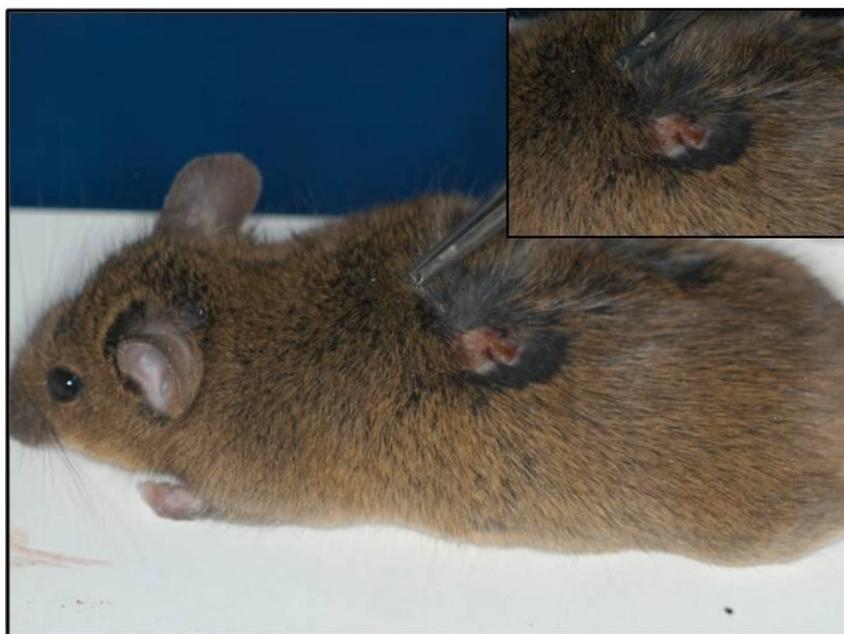


Figura 2 – Camundongo hemofílico A com necrose cutânea na região dorsal após sucessivos procedimentos de anestesia via subcutânea.

4.3 – Caracterização da Articulação Temporomandibular (ATM)

Foram estudadas as ATM de 5 camundongos. Para tanto, os animais foram sacrificados e as cabeças foram dissecadas, seccionadas ao meio e a seguir colocadas em formol tamponado a 10 %, no mínimo por 24 horas.

Após a fixação, iniciou-se o processo de descalcificação em EDTA 8%, por um período aproximado de 7 dias, a seguir os blocos de ATM foram isolados. Posteriormente, estes foram recolocados no EDTA para continuidade do processo de descalcificação por período aproximado de mais 15 dias, até que o tecido ósseo não oferecesse mais resistência à perfuração. Posteriormente, as ATMs direitas e esquerdas foram incluídas separadamente em blocos de parafina.

Foram realizados cortes seriados com espessura de 4 μ m e as lâminas foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para observação em microscopia óptica.

Na análise das ATMs foram consideradas as estruturas anatômicas, como côndilo, fossa mandibular e disco articular, além dos músculos adjacentes. Especial atenção foi dada a membrana sinovial anterior inferior para posterior comparação com o grupo de estudo.

4.4- Trauma articular para indução de sinovite

Para indução de sinovite, foi utilizada a metodologia anteriormente descrita por Muto *et al* (1998a). Cinco grupos com 5 animais cada grupo foram anestesiados com injeções subcutâneas de ketamina (Dopalen[®], Vetebrands 100mg/Kg) e xilazina (Rompum[®], Bayer 10mg/kg), previamente a cada procedimento. Os camundongos foram colocados em posição supina em um aparelho desenhado para esta função (Figura 3). A seguir foi forçada a hiperextensão da boca com um pinça “dente de rato” posicionada nos dentes incisivos superiores e inferiores, numa abertura de 14mm, durante 5 minutos (Figura 4). Este procedimento foi repetido durante 10 dias consecutivos, 1 vez ao dia. Posteriormente, os animais foram sacrificados seguindo um intervalo de 2 e 5 dias e 2, 4 e 6 semanas após a realização do trauma. O material obtido seguiu os mesmos parâmetros de descalcificação e preparo para avaliação histológica, descritos previamente para o estudo do grupo de caracterização das ATMs dos camundongos.

Durante o período de trauma articular, os animais foram pesados todos os dias para avaliação de possível perda de peso em função de má-alimentação ou em decorrência de sangramento articular proveniente da indução do trauma.



Figura 3 – Camundongo hemofílico A em posição supina para a realização da hiper-extensão bucal.



Figura 4- Hiper-extensão bucal utilizando pinça dente de rato e a abertura bucal máxima forçada de 14 mm em camundongo hemofílico A.

4.5. Análise histológica

4.5.1- Critérios para análise

Na análise histológica foi considerada a membrana sinovial da região anterior da cavidade inferior (SAI) da articulação temporomandibular (ATM). Os critérios utilizados para essa avaliação foram adaptados dos descritos por Muto *et al* (1998b) (tabela 1). Esses critérios foram descritos para descrição histológica da membrana sinovial anterior superior (SAS) de ratos Wistar e assumidos neste trabalho, como parâmetro avaliatório para a SAI, já que não foi encontrado critério para a análise dessa região na literatura.

As lâminas foram analisadas em aumento de 20X e 40X e foram consideradas: a espessura da camada sinovial, a dilatação capilar e a adesão sinovial presentes na área. Sinovite foi considerada em graus ≥ 1 para os critérios descritos, sendo que quanto maior o grau mais acentuado o quadro.

Para o critério de sangramento articular, foram também avaliadas a presença ou ausência de sangue (eritrócitos) na região de estudo, segundo os critérios utilizados por Valentino *et al* (2006) (tabela 2).

Tabela 1- Critérios histológicos para avaliação da membrana sinovial

| Característica | Gradações | Descrição |
|--|--------------------------------|--|
| Espessura da camada de células sinoviais | 0 | 1-3 camadas de células |
| | 1 | 4-6 camadas de células |
| | 2 | 7 ou mais camadas |
| Dilatação capilar | 0 | Ausente |
| | 1 | Envolvimento de menos de 1/3 do comprimento da membrana sinovial |
| | 2 | Envolvimento de 1/3 a 2/3 da membrana sinovial |
| | 3 | Envolvimento de 2/3 do comprimento da membrana sinovial |
| Adesão sinovial | Semelhante à dilatação capilar | Semelhante à dilatação capilar |

Adaptado de: Muto *et al.* Development and histologic characteristics of synovitis induced by trauma in the rat temporomandibular joint Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 1998; 27: 470-475.

Os critérios acima foram adotados por fazerem parte dos principais aspectos que caracterizam os episódios de sinovites e hemartroses em articulações.

Tabela 2- Avaliação de sangramento

| Características | Pontuações | Descrição |
|--------------------|------------|-----------|
| Presença de sangue | 0 | Ausente |
| | 1 | Presente |

Adaptado de: Valentino LA, Hakobyan N. Histological changes in murine haemophilic synovitis: a quantitative grading system to assess blood-induced synovitis. *Haemophilia* 2006; 12:654-662.

As lâminas foram analisadas às cegas por 2 observadores previamente calibrados. Nos casos de discordância, o diagnóstico final foi feito por consenso.

5- RESULTADOS

5.1- Análise Histológica

5.1.1- Caracterização morfológica da articulação temporomandibular (ATM) de camundongos deficientes de Fator VIII (FVIII)

Neste grupo a articulação temporomandibular (ATM) apresentou uma fossa articular e côndilo mandibular convexos, onde não foi observado uma eminência articular notória. Recobrando a superfície articular, notou-se um tecido conjuntivo avascular, composto principalmente por colágeno. Assim como na ATM humana, observou-se um disco que divide a cavidade articular em duas, a cavidade superior e a cavidade inferior (Figura 5).

Este disco apresentou-se bastante celularizado (figura 6). A porção anterior do disco estava ligada às fibras do músculo pterigóideo lateral e tornou-se mais espessa na porção anterior e porção posterior. Na porção intermediária, observou-se que esta estrutura ficou mais delgada e posteriormente, o disco voltou a crescer em espessura e se inseriu no tecido gorduroso retrodiscal.

A região da membrana sinovial da porção anterior da cavidade superior (SAS) não foi observada integralmente. No entanto, pôde-se observá-la melhor na porção posterior da cavidade superior e na porção anterior da cavidade inferior. A membrana sinovial da porção posterior apresentou-se como projeções pregueadas para dentro da cavidade articular. Na porção anterior inferior, as células apresentaram-se distribuídas em camadas que variaram entre 3 e 5 células (Figura 7).

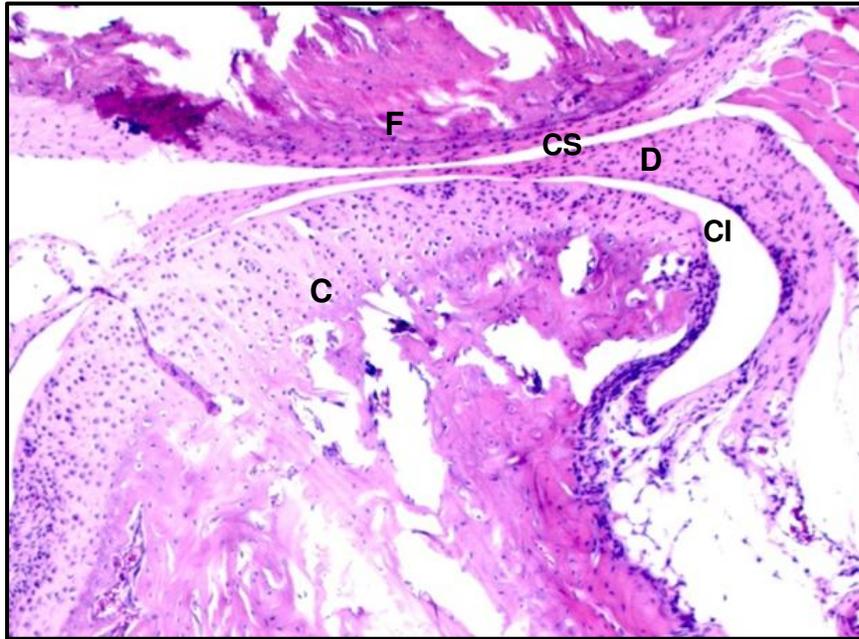


Figura 5- ATM direita de camundongo hemofílico demonstrando os principais componentes anatômicos. F: fossa, C: côndilo, D: disco; CS: Cavidade superior CI: cavidade inferior (HE, aumento original 2,5X).

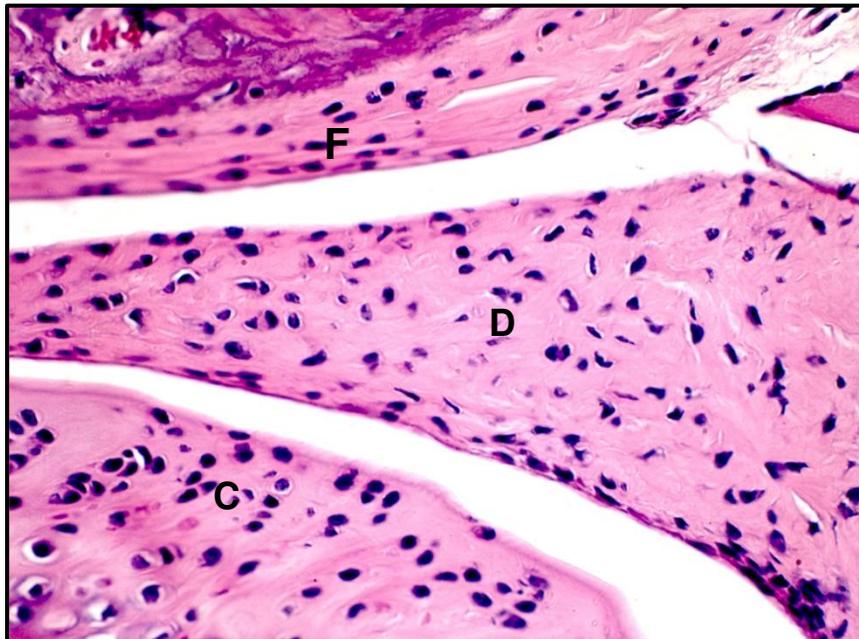


Figura 6- Disco articular bastante celularizado em camundongo hemofílico. F:fossa, C:côndilo, D:disco (HE,aumento original 40X).

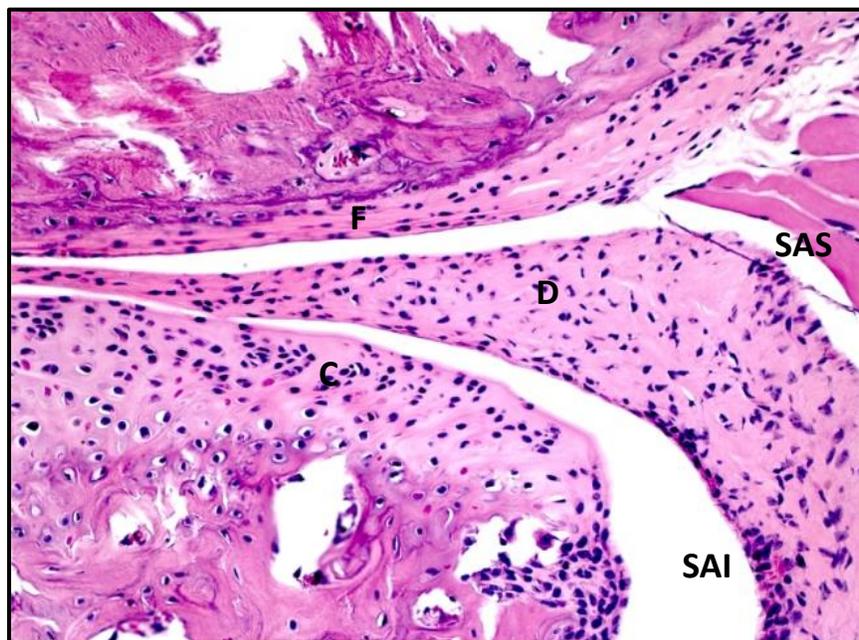


Figura 7- ATM direita de camundongo hemofílico. F: fossa; C: côndilo; D: disco; SAS: membrana sinovial anterior superior; SAI: membrana sinovial anterior inferior (HE, aumento original 2,5X).

5.1.2- Avaliação do Grupo de Estudo para a Indução de Sinovite

Não foram observadas alterações clínicas nesses camundongos relacionadas à perda de peso ou mesmo a sinais inflamatórios, como aumento de volume e vermelhidão da área.

A avaliação da membrana sinovial anterior superior (SAS) foi dificultada por motivos técnicos, principalmente relacionados aos cortes das amostras. Na grande maioria das lâminas, essa região foi parcialmente ou totalmente perdida, o que inviabilizou a avaliação. Por essa razão, somente a membrana sinovial anterior inferior (SAI) foi avaliada, utilizando como já descrito, os mesmos parâmetros histológicos para SAS (Figura 8). Os resultados obtidos dessa avaliação foram descritos abaixo e demonstrados na tabela 3.

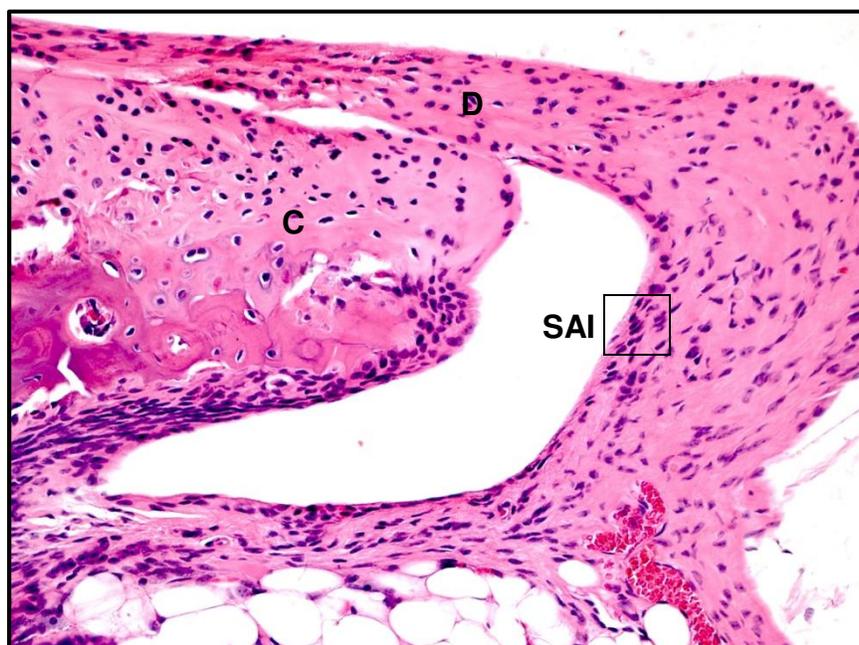


Figura 8- Em destaque, a membrana sinovial da cavidade anterior inferior (SAI) apresentando 5 camadas de células sinoviais. C: côndilo; D: disco (HE 20X).

5.1.2.1- Análise histológica do grupo sacrificado após 2 dias do trauma por hiper-extensão

Este grupo foi composto por 5 camundongos deficientes de FVIII. Devido a perdas técnicas foi avaliado somente um lado de 4 articulações. Nas lâminas analisadas foi encontrado uma membrana sinovial anterior inferior (SAI) composta por 4 camadas celulares em todas as articulações. Seguindo a metodologia de análise, todas estas articulações receberam a graduação 1 de Muto *et al*, o que indicaria um pequeno grau de proliferação destas células.

A presença de capilares só foi observada em 2 articulações, porém estes não apresentaram dilatação. Não foi observada presença de sangue e não houve a presença de adesão sinovial em nenhuma das articulações. Logo todas as articulações receberam graduação 0 para os critérios anteriormente citados.

5.1.2.2.- Análise histológica do grupo sacrificado após 5 dias do trauma por hiper-extensão

Neste grupo, um total de 9 articulações (5 animais) foram analisadas 5 dias após a indução da hiper-extensão bucal (figura 9). Um número diferente de camadas celulares foi encontrada no camundongo de número 1, a articulação direita apresentou uma SAI com 4 camadas celulares, mas a articulação esquerda apresentou apenas 3 camadas de células. No camundongo de número 2, ambas as articulações apresentaram 3 camadas de células sinoviais na SAI (figura 10). No camundongo de número 3, foi observado que ambas as articulações apresentaram 4 camadas celulares na SAI. No camundongo de número 4, o lado direito articular apresentou 5 camadas celulares e o lado esquerdo apenas 3. No camundongo de número 5 somente o lado direito pôde ser analisado e apresentou 4 camadas celulares na SAI. Neste último, observou-se a presença de um capilar, porém sem dilatação. Em todas as outras lâminas não foi observada dilatação capilar. Além disso, também não foi observada adesão das células da membrana sinovial e nem a presença de sangue, tanto na cavidade articular superior como na inferior. Todas as articulações receberam uma graduação 0 de Muto para os critérios estudados.

Neste grupo, de acordo com a quantidade de camadas de células da SAI, 5 (55,6%) das articulações apresentaram uma graduação 1 de Muto, o que representaria um pequeno grau de proliferação sinovial, mas sem demais sinais evidentes de sinovite ou hemartrose.

5.1.2.3- Análise histológica do grupo sacrificado após 2 semanas do trauma por hiper-extensão

Neste grupo foram utilizados 5 camundongos e 9 articulações puderam ser avaliadas. No camundongo de número 1, o lado direito apresentou 3 camadas de células na membrana sinovial anterior inferior (SAI) e o lado esquerdo apresentou 4 camadas. O camundongo de número 2 apresentou ambos os lados

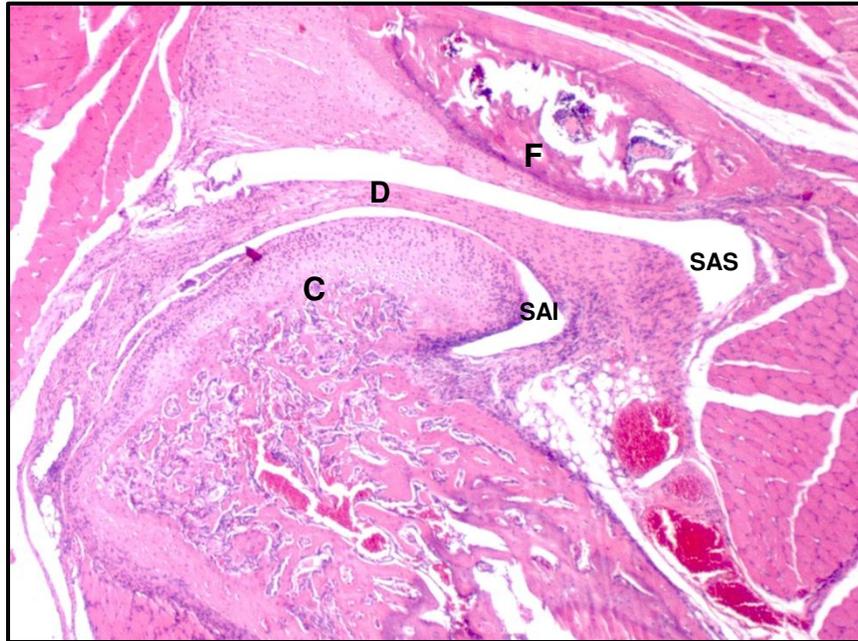


Figura 9 – ATM de camundongo hemofílico 5 dias após a hiper-extensão sem alterações siginificativas. F: fossa; C:côndilo; D: disco; SAS: membrana sinovial anterior superior; SAI: membrana sinovial anterior inferior (HE, aumento original 2,5X).

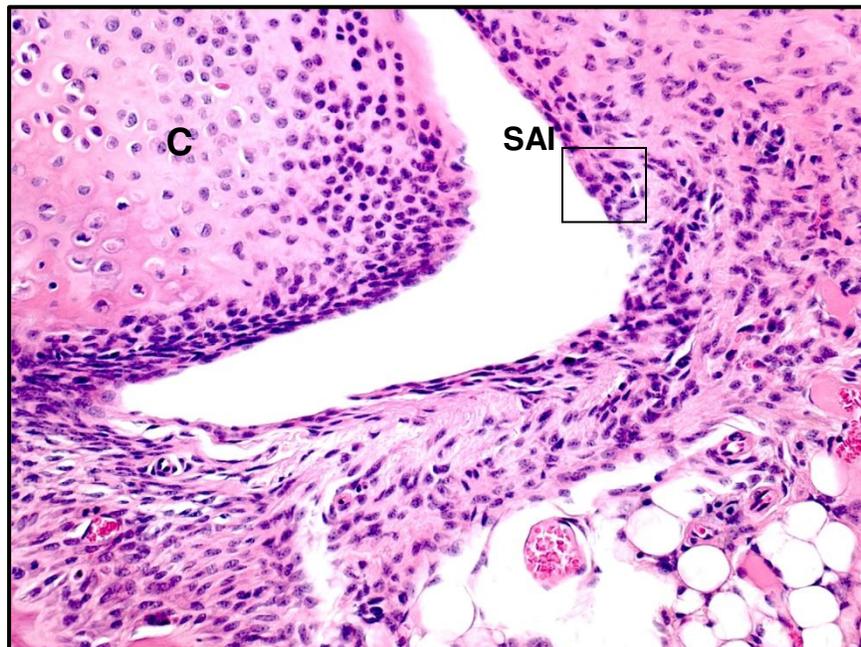


Figura 10- Membrana sinovial anterior inferior (SAI) com 3 camadas celulares 5 dias após hiper-extensão da ATM. C:côndilo (HE, aumento original 20X).

da articulação com uma SAI composta por 3 camadas celulares. Observou-se a presença de capilares nesta amostra, porém estes não apresentaram dilatação. As lâminas avaliadas do camundongo de número 3 apresentaram uma SAI com 4 camadas de células. Somente o lado direito da ATM do camundongo número 4 foi analisado, tendo sido observada 3 camadas celulares na SAI. No camundongo de número 5, ambas as articulações apresentaram 3 camadas de células sinoviais.

Portanto, 6 articulações (66,7%) deste grupo apresentaram uma graduação 0 de Muto para as camadas sinoviais, apresentando assim um padrão de normalidade. As outras 3 (33,3%) apresentaram graduação 1 de Muto, indicando um padrão de proliferação destas células.

Não foram observados capilares dilatados, presença de sangue ou adesão das células sinoviais. Logo todas as articulações receberam graduação 0 de Muto para estes aspectos.

5.1.2.4- Análise histológica do grupo sacrificado após 4 semanas do trauma por hiper-extensão

Neste grupo foram utilizados 5 camundongos e 9 articulações puderam ser avaliadas histologicamente. O lado direito do camundongo de número 1 apresentou membrana sinovial anterior inferior composta por 4 camadas celulares e a esquerda por 3 camadas. Ambos os lados desta articulação apresentaram a presença de pelo menos 1 capilar, porém sem nenhum aspecto de dilatação. No camundongo de número 2, o lado direito da articulação apresentou 3 camadas de células na SAI, no entanto o lado esquerdo apresentou 5 camadas celulares. No camundongo de número 3, foi analisado somente o lado esquerdo da articulação, onde se observou a presença de 3 camadas celulares e um capilar presente sem sinais de dilatação. A análise das lâminas do camundongo de número 4 demonstrou a presença de uma SAI com 3 camadas de células nos dois lados desta articulação. No camundongo de número 5, observou-se uma SAI composta por 2 camadas no lado direito desta articulação e 3 camadas no lado esquerdo.

Observou-se, então, que 7 (77,8%) das articulações neste grupo receberam uma graduação 0 de Muto para as camadas de células sinoviais, demonstrando um padrão de normalidade. Nas 2 articulações (22, 2%) restantes, as SAI receberam graduação 1, indicando um grau inicial de proliferação destas células.

Não se observou em nenhuma articulação deste grupo a presença de capilares dilatados, sangue na cavidade ou adesão sinovial. Todas as articulações receberam graduação 0 para os critérios mencionados.

5.1.2.5- Análise histológica do grupo sacrificado após 6 semanas do trauma por hiper-extensão

Neste grupo foram utilizados 5 camundongos, 9 articulações foram avaliadas (figura 11). O camundongo de número 1 apresentou uma membrana sinovial anterior inferior (SAI) formada por 3 camadas celulares em ambos os lados das articulações. No camundongo de número 2, somente o lado direito foi avaliado e mostrou uma SAI com 3 camadas também. Ambos os lados da articulação do camundongo 3 apresentaram 3 camadas de células sinoviais. À análise da articulação temporomandibular do camundongo de número 4, mostrou uma SAI composta por 4 camadas celulares no lado direito e 3 camadas no lado esquerdo (figura 12). A presença de um capilar foi observada, porém sem dilatação aparente. Também foi notada nesta articulação uma proliferação fibrocartilaginosa com aspecto de reparação tecidual (figura 13). No camundongo de número 5 os dois lados da articulação apresentaram-se com 3 camadas de células na SAI. Seguindo a classificação aplicada as camadas sinoviais, 8 (89,9%) articulações deste grupo apresentaram uma graduação 0 de Muto. Logo a maioria apresentou um padrão considerado normal, somente 1 articulação (11,1%) apresentou pontuação 1 de Muto, dando o aspecto de proliferação celular.

Em nenhuma das articulações foram observados capilares dilatados, presença de sangue ou adesão das células sinoviais. Logo todas estas receberam uma pontuação 0 para os critérios mencionados anteriormente.

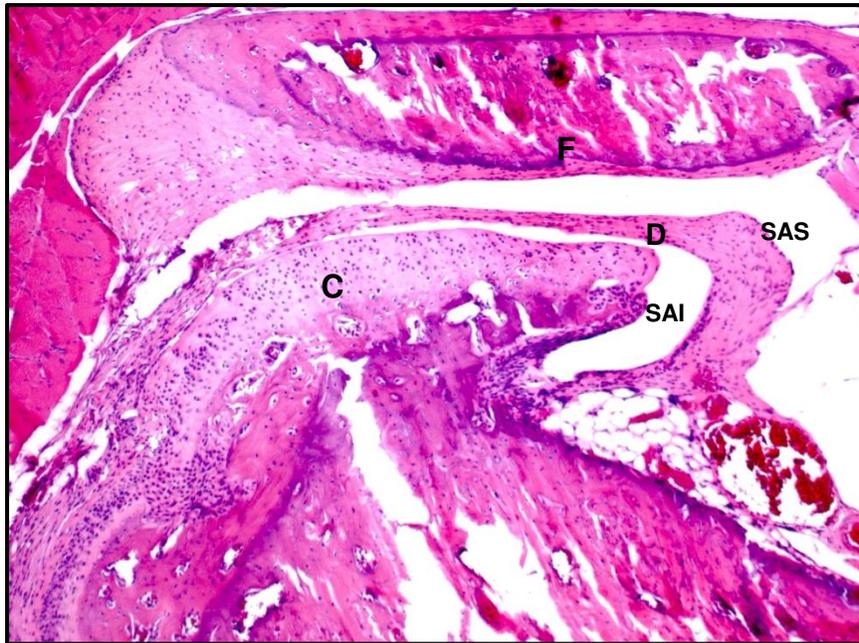


Figura 11- ATM lado direito de camundongo hemofílico mostrando não haver diferenças significativas 6 semanas após a hiper-extensão bucal induzida. F: fossa; C:côndilo; D: disco; SAS: membrana sinovial anterior superior; SAI: membrana sinovial da cavidade anterior inferior (HE, aumento original 5X).

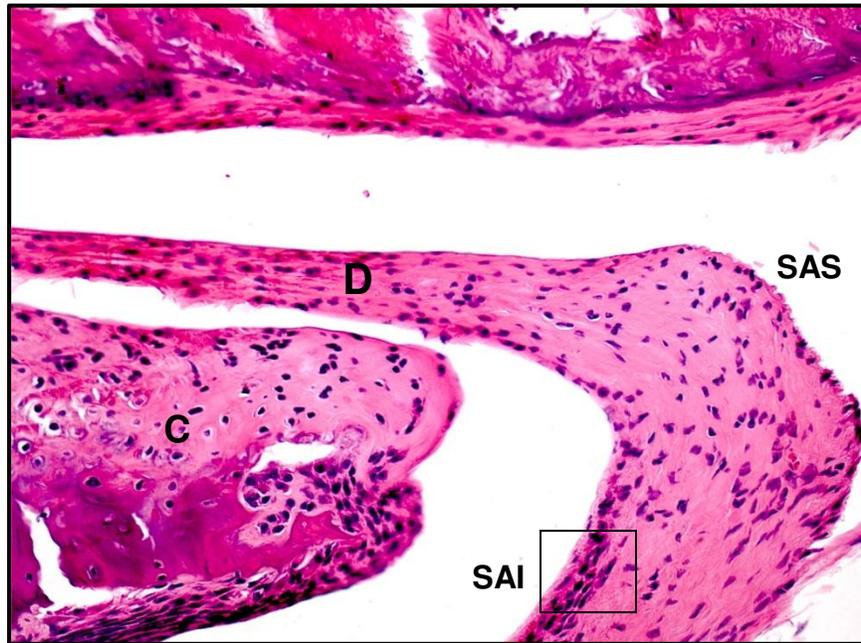


Figura 12- Em detalhe membrana sinovial com 4 camadas de células após 6 semanas da hiper-extensão bucal. F:fossa; C:côndilo; D: disco; SAS: membrana sinovial anterior superior; SAI: membrana sinovial anterior inferior (HE, aumento original 20X).

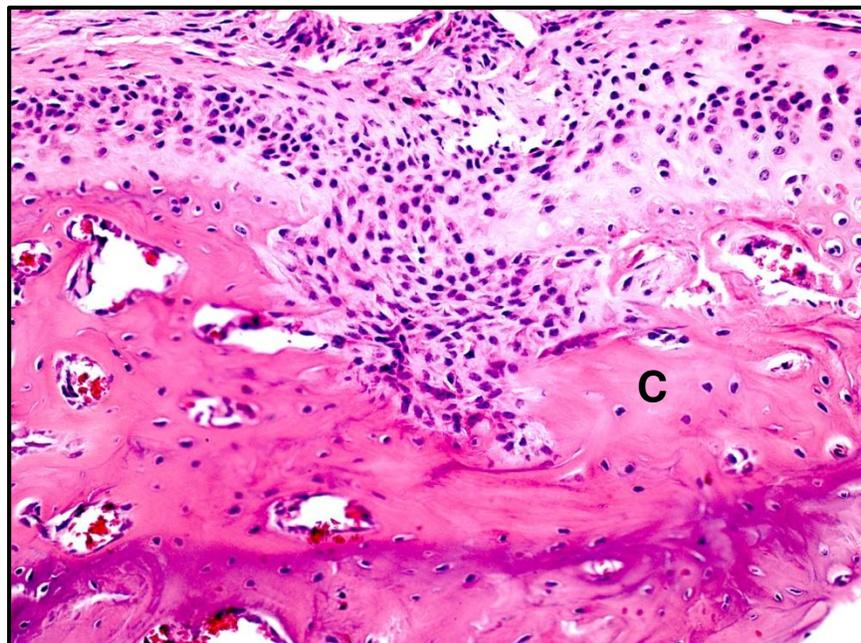


Figura 13- Processo de reparação no côndilo. Tecido fibro-cartilaginoso em organização e maturação, orientando neoformação óssea. C: côndilo (HE, aumento original 10X).

Tabela 3- Achados das avaliações histológicas das ATMs de camundongos deficientes de FVIII

| Lâminas articulações | Camadas de células sinoviais | | Dilatação Capilar | | Adesão sinovial | | Presença de sangue | | |
|----------------------|------------------------------|----------|-------------------|----------|-----------------|----------|--------------------|----------|---|
| | Número | Gradação | Descrição | Gradação | Descrição | Gradação | Descrição | Gradação | |
| 2 dias | 1 E | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 E | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 5 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| 5 dias | 1 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 1 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 3 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 3 E | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 D | 5 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| 5 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | |
| 2 semanas | 1 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 1 E | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 3 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 3 E | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 5 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 5 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |

ATM= articulação temporomandibular; D= lado direito; E= lado esquerdo

Tabela 3- Achados das avaliações histológicas das ATMs de camundongos deficientes de FVIII – (continuação)

| | Lâminas articulações | Camadas de células sinoviais | | Dilatação Capilar | | Adesão sinovial | | Presença de sangue | |
|-----------|----------------------|------------------------------|----------|-------------------|----------|-----------------|----------|--------------------|----------|
| | | Número | Gradação | Descrição | Gradação | Descrição | Gradação | Descrição | Gradação |
| 4 semanas | 1 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 1 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 E | 5 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 3 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 5 D | 2 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 5 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| 6 semanas | 1 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 1 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 2 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 3 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 3 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 D | 4 | 1 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 4 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 5 D | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |
| | 5 E | 3 | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 | Ausente | 0 |

ATM= articulação temporomandibular; D= lado direito; E= lado esquerdo

6 – DISCUSSÃO

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossomo X, que compromete principalmente, o sistema músculo-esquelético entre outros. As artropatias hemofílicas são decorrentes de sangramentos articulares recorrentes (hemartroses). Esses sangramentos induzem o aumento da membrana sinovial, promovem o aumento da pressão intra-articular, ocasionando posteriormente a destruição da cartilagem articular. Esse fenômeno causa limitações à articulação e comprometimento da qualidade de vida dos pacientes. Pouco se sabe sobre o envolvimento da articulação temporomandibular nas artropatias hemofílicas.

Nesse estudo, foi possível avaliar a ATM de camundongos deficientes de Fator VIII. Os resultados desse estudo demonstraram que a ATM desses animais possuem características estruturais anatômicas que podem ser comparadas com outras linhagens de camundongos. Foi observado uma fossa articular e côndilo mandibular convexos, além disso, a eminência articular não se apresentou evidenciada. O disco apresentou-se bastante celularizado. Como esperado, morfologicamente a ATM de camundongos deficientes de FVIII não diferiu daquelas apresentadas por camundongos de outras linhagens.

Interessante notar, que não foi observado extravasamento sanguíneo extra-articular nos animais estudados do grupo controle. Esse achado pode mostrar que a função mastigatória normal não induziu sangramentos intra-articulares nesses animais. Esses resultados podem ser entendidos pelas próprias características dos camundongos deficientes de FVIII. Bi *et al*, em 1995, relataram que estes animais possuíam a qualidade de não sangrarem espontaneamente como os humanos com hemofilia grave. Isso pode demonstrar a dificuldade de transpor a situação clínica para o modelo animal. Porém esse achado também pode ser explicado porque, segundo Leandro & Nunes (2000), a ATM possui

características próprias. Esta articulação é dupla, mobiliza apenas um osso e existe um disco articular entre o côndilo e a fossa articular que permite uma movimentação suave dessas estruturas. Além disso, ao contrário da maior parte das articulações móveis, a ATM não suporta maiores pressões ou forças aplicadas sobre as superfícies articulares.

A literatura tem demonstrado que as sinovites provenientes das constantes hemartroses são uma das principais complicações nos pacientes hemofílicos (Mulder, 2004; Goddard & Mann, 2007; Rodriguez-Merchan, 2007; Lafeber, 2008). O joelho, por ser uma das articulações mais afetadas pela hemartrose e pela sinovite nesses pacientes, foi a articulação mais estudada em modelos *in vivo* para o entendimento da fisiopatologia da artropatia hemofílica. A maioria desses estudos utilizou modelos animais, como cães Beagles e camundongos deficientes de Fator VIII. Neste estudo, tentamos produzir um trauma por hiper-extensão da ATM em camundongos hemofílicos, que pudesse de certa forma, reproduzir uma situação clínica de atendimento odontológico. Para isso, a metodologia utilizada foi a descrita por Muto *et al* (1998a), idealizada para promoção de sinovites em modelos animais utilizando ratos (Wistar).

Rodriguez-Merchan (2003 e 2007) descreveu os achados clínicos das hemartroses recorrentes nas articulações hemofílicas. Segundo esse autor, a hemartrose é caracterizada por inchaço da articulação e dor, com restrição de mobilidade. Os resultados deste estudo não mostraram nenhuma alteração clínica como aumento de volume na região das ATMs após a indução do trauma, que pudessem corresponder a hemartrose ou a sinovite, ou mesmo sinais que demonstrassem evidências de dor ou perda da mobilidade dessa articulação. Esses achados foram comprovados clinicamente pela manutenção do peso, o que indicou alimentação adequada durante o período de estudo.

Segundo Hoffman (2008), tem sido difícil desenvolver modelos que reproduzam as complicações ortopédicas da hemofilia em modelos animais.

Valentino *et al* (2004) conseguiram desenvolver um modelo de hemartrose com aplicação de força sobre uma espécie de mola posicionada nos joelhos de camundongos deficientes de FVIII. Apesar disso, foi utilizado neste trabalho uma técnica descrita por Muto *et al* (1998) para indução de sinovite em ATM de ratos Wistar.

. A classificação da avaliação histológica utilizada neste estudo foi a publicada por Muto *et al* (1998b). Essa metodologia foi desenvolvida baseada no fato de que doenças degenerativas da articulação temporomandibular estar acompanhadas por sinovite. Nesta descrição foi avaliada a membrana sinovial superior anterior da ATM de ratos Wistar. Os autores descreveram um aumento das camadas de células sinoviais nos primeiros dias após trauma, porém estas camadas diminuíram no grupo de ratos sacrificados após semanas. Neste estudo, apesar de aplicada a mesma metodologia do estudo anteriormente mencionado foi avaliada a membrana sinovial anterior inferior, onde as mesmas classificações foram aplicadas. Nesse trabalho, as amostras da membrana sinovial anterior superior não foram analisadas por não estarem devidamente representadas em todos os cortes.

Os resultados dessa análise mostraram que os camundongos hemofílicos que sofreram trauma, apresentaram de 4 a 6 camadas de células na membrana sinovial anterior inferior. Esse resultado seria graduado com Grau 1 por Muto *et al* (1998b), dando um diagnóstico de hiperplasia sinovial. Entretanto, quando comparados com a mesma análise nos camundongos que não sofreram o trauma, esse número de células não foi alterado. Esses resultados podem sugerir que a gradação utilizada por Muto *et al* (1998b) deve ser utilizada somente para a análise da membrana anterior superior de ratos (Wistar) e não de camundongos. Infelizmente, não pudemos encontrar na literatura, trabalhos nos quais a membrana sinovial anterior inferior tenha sido analisada de forma semelhante ao proposto por este trabalho.

O fato deste estudo não ter apresentado resultados de sinovite nos camundongos deficientes de Fator VIII na membrana sinovial anterior inferior pode ser explicado possivelmente pela dificuldade de indução de sinovites na ATM. Okeson *et al* (2000) e Ash & Schmidseder (2007) relataram que a ATM é uma articulação que sofre adaptações estruturais e funcionais quando submetida à lesão, à alterações oclusais e a outras alterações. Essa adaptação pode ser demonstrada pelos resultados de Muto *et al* (1998b) que observaram a diminuição da sinovite após o término do trauma por hiper-extensão.

Muto *et al* (1998b) relataram haver mais de 2/3 de membrana sinovial envolvidos por capilares dilatados na maioria das ATMs dos ratos Wistar submetidos ao trauma de hiper-extensão. Esse achado mostrou uma correlação temporal, já que sua diminuição foi observada nos ratos sacrificados após longo tempo de espera pós-trauma. Em nosso estudo, a dilatação capilar não foi observada no grupo submetido ao trauma. A dilatação capilar e a presença de eritrócitos na camada sinovial foram observadas em estudos de sinovites realizados em joelhos de camundongos deficientes de Fator VIII (Valentino & Hakobyan, 2004; Valentino *et al*, 2006; Mejia-Carvajal, 2008) fazendo parte do complexo de avaliação histológica para a sinovite.

Durante a sinovite, a hiperplasia que ocorre durante esse processo pode promover uma adesão das camadas sinoviais opostas. Esse achado pôde ser observado por Muto *et al* (1998ab). Este estudo não demonstrou, em nenhuma das articulações avaliadas, a presença de hiperplasia e, conseqüentemente, de adesão sinovial. Esse achado pode estar relacionado à membrana sinovial por nós estudada. Ozaki *et al* (2008), em modelo de hiper-extensão em ratos Wistar, demonstraram a presença da adesão sinovial em somente uma articulação na região da membrana anterior superior em 8 ratos saudáveis investigados.

A visualização de extravasamento sanguíneo vascular, que pudesse caracterizar a presença de hemartroses em nosso estudo, não pôde ser realizada.

A dificuldade de indução de hemartrose em ATM pode ser observada pelo trabalho publicado por Roosendaal *et al* (1999). Os autores conseguiram induzir hemartrose nos joelhos de cachorros Beagles através da injeção de sangue na articulação e conseguiram observar inflamação sinovial após 4 e 16 dias. Alons, *et al* (2009) aplicaram metodologia semelhante em ATM de ratos Wistar saudáveis. Os autores conseguiram induzir hemartrose na ATM desses ratos, no entanto, esta desapareceu completamente após 4 dias da injeção de sangue, além disso somente pequenos sinais iniciais de inflamação foram observados. Portanto, baseados nos resultados apresentados nesse estudo em relação à indução de trauma por hiper-extensão bucal em ATM de camundongos deficientes de FVIII, pode-se inferir que esses dados corroboram com a dificuldade de indução de hemartrose em ATM em nossos modelos.

Provavelmente em estudos futuros, o uso de trauma direto para induzir sinovite, como foi demonstrado por Valentino *et al*,(2004) nos joelhos de camundongos deficientes de Fator VIII, talvez permita respostas diferentes na ATM.

7-CONCLUSÕES

- 1- Os achados morfológicos encontrados nas articulações temporomandibulares de camundongos deficientes de Fator VIII foram semelhantes aos previamente descritos para outros modelos murinos.
- 2- O modelo de trauma por hiper-extensão bucal utilizado não foi capaz de desenvolver sinovite na membrana sinovial anterior inferior de camundongos deficientes de Fator VIII.

REFERÊNCIAS

1. Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med.* 1994; 236:391–9.
2. Allons K, Naphausen MTP, Von Den Hoff JW, Van Der Krann PM, Maltha JC, Veltien AA *et al.* Induction of haemarthrosis in the TMJ of rats: Validation by MR imaging(MRI) and histology. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2009; 37: 140-4.
3. Antunes, S. Haemophilia in the developing world: the Brazilian experience. *Haemophilia.* 2002; 8:199-204.
4. Ash MM, Schmidseder J. *Oclusão.*São Paulo: Editora Santos, 2007.
5. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxhan BJ. *Anatomia, embriologia e histologia bucal.* 3ed. Porto Alegre: Artmed editora; 2004.
6. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet.* 1995; 10(1):119-21.
7. Birch CL. *Hemophilia: clinical and genetic aspects.* Urbana, Ill, University of Illinois Press, 1937.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. Bolton-Maggs PHB, Pasi KJ. Haemophilia A and B. Lancet. 2003; 361: 1801-09.
9. Cate RT. Anatomia Macroscópica e microscópica In: Zarb GA, Carlsson GE, Sessle BJ, Mohl ND editores. São Paulo: Editora Santos; 2000.p. 48-65.
10. Cate ART. Histologia Bucal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
11. Dijkgraaf LC, Liem RSB, de Bont LGM. Synovial membrane involvement in osteoarthritic temporomandibular joints. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1997; 83: 373-86.
12. Fehrenbach MJ, Herring SW. Anatomia Ilustrada da cabeça e pescoço. São Paulo: Editora Manole, 1998.
13. Franco RF. Defeitos moleculares das hemofilias A e B. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. Hematologia Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu; 2001.p.797-802.
14. Gardner E, Gray DJ, Rahilly RO. Anatomia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
15. Gynther GW, Dijkgraaf LC, Reinholt FP, Holmlund, AB, Liem RSB, de Bont LG. Synovial inflammation in arthroscopically obtained biopsy specimens from the temporomandibular joint: a review of the literatura and a proposed histologic grading system. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998; 56: 1281-86.

16. Goddard NJ, Mann H. Diagnosis of haemophilic synovitis. *Haemophilia* 2007; 13 (suppl.3): 14-19.
17. Hakobyan N, Kazarian T, Valentino LA. Synovitis in a murine model of human factor VIII deficiency. *Haemophilia*. 2005; 11(3):227-32.
18. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. *Haematology*. 4th ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.
19. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001; 85 (6): 958-965.
20. Hoffman M. Animal models of bleeding and tissue repair. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl 3) :62-7.
21. Hooiveld MJJ, Roosendaal G, Jacobs KMG, Vianen ME, van de Berg HM, Bijlsma JWJ *et al*. Initiation of degenerative joint damage by experiemntal bleeding combined with loading of the joint. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50: 2024-31.
22. Hoots WK, Rodriguez N, Boggio L, Valentino LA. Pathogenesis of haemophilic synovitis: clinical aspects 2007; 13 (suppl.3): 4-9.
23. Kaneda T, Nagayama M, Ohmori M, Minato F, Nakajima J, Shikimori M. Hemarthrosis of the temporomandibular joint in a patient with hemophilia B: report of a case. *J Oral Surgery*. 1979; 37:513-14.

24. Kaufman RJ, Antonarakis SE, Fay PJ. Factor VIII and hemophilia A. In: Colman R, Hush J, Marder VJ, Clowes AW, George JN editores. Hemostasis and Thrombosis. 4ed. Philadelphia: Lippcott Williams & Wilkins, 2000.
25. Lafeber FP, Miossec P, Valentino LA. Physiopathology of haemophilic arthropathy. Haemophilia. 2008; 14 (Suppl 4):3-9.
26. Leekas C. Experimental degenerative temporomandibular joint disease. Int J. Oral Maxillofac Surg. 1994; 23:423-24.
27. Leandro LFL, Nunes LJ. ATM diagnóstico e tratamento. São Paulo: Pancast Editora, 2000.
28. Maciel RN, Turell JCF. ATM e dores craniofaciais. São Paulo: Editora Santos, 2003.
29. Mejia-Carvajal C, Hakobyan N, Enockson C, Valentino LA. The impact of joint bleeding and synovitis on physical ability and joint function in a murine model of haemophilic synovitis. Haemophilia 2008; 14: 119-126.
30. Merrill RG, Yih WY, Langan NJ. A histologic evaluation of the accuracy of TMJ diagnostic arthroscopy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990; 70: 393-98.
31. Monahan PE. Factor IX: Insights from knock-out and genetically engineered mice. Thromb Haemost. 2008; 100(4):563-75.
32. Mulder K, Llinás A. The target joint. Haemophilia. 2004; 10 (Suppl 4):152-6.

33. Muto T, Kanawakami J, Kanazawa M, Yajima T. Histologic study of synovitis induced by trauma to the rat temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1998a; 86:534-40.
34. Muto T, Kanawakami J, Kanazawa M, Kaku T, Yajima T. Development and histologic characteristics of synovitis induced by trauma in the rat temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998b; 27:470-75.
35. Okeson JP. *Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão.* São Paulo: Artes Médicas, 2000.
36. Øvlisen K, Kristensen AT, Jensen AL, Tranholm M. IL-1 beta, IL-6, KC and MCP-1 are elevated in synovial fluid from haemophilic mice with experimentally induced haemarthrosis. *Haemophilia.* 2009; 15(3):802-10.
37. Ozaki M, Kaneko S, Soma K. Masseter weakness affects temporomandibular synovitis induced by jaw opening in growing rats. *Angle Orthodontist.* 2008; 78(5):819-25.
38. Rodriguez-Merchan EC. Haemophilic arthropathy in haemophilia patients with inhibitors: new perspectives. *Haemophilia.* 2003; 9(5): 547-8.
39. Rodriguez-Merchan EC. Haemophilic synovitis: basic concepts. *Haemophilia.* 2007; 13 (suppl.3): 1-3.
40. Romney G, Glick M. An updated concept of coagulation with clinical implications. *JADA.* 2009; 140:567-574.

41. Roosendaal G, Vianen ME, Wenting MJ, van Rinsum AC, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia. *J Bone Joint Surg Br.* 1998; 80(3):540-5.
42. Roosendaal G, TeKoppele JM, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Blood-induced joint damage: a canine in vivo study. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(5):1033-9.
43. Sharawy M, Bhussry BR, Suarez F. In: Bhaskar SN, editor. *Histologia e Embriologia de Orban*. 10 ed. Porto Alegre: Artmed ; 1989.p. 427-37.
44. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care.* 2009; 19(1): 3-10.
45. Stephensen D, Tait RC, Brodie N, Collins P, Cheal R, Keeling D *et al.* Changing patterns of bleeding in patients with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2009; 15(6):1210-4.
46. Toledo OA, Bezerra ACB. Atendimento odontológico para pacientes especiais. In: *Odontopediatria fundamentos para prática clínica*. São Paulo: Editora Premier, 1996.
47. Valentino LA, Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar KJ, Jabbar AA. Experimental haemophilic synovitis: rationale and development of a murine model of human factor VIII deficiency. *Haemophilia.* 2004; 10:280–7.
48. Valentino LA, Hakobyan N. Histological changes in murine haemophilic synovitis: a quantitative grading system to assess blood-induced synovitis. *Haemophilia* 2006; 12:654-662.

49. Valentino LA, Hakobyan N, Rodriguez N, Hoots WK. Pathogenesis of haemophilic synovitis: experimental studies on blood-induced joint damage. *Haemophilia*. 2007;13 (Suppl 3):38-44.
50. Villaça PR, Carneiro JDA, D`Amico. Hemofilias. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. *Hematologia Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu; 2001.p.803-18.
51. Weijs WA. Mandibular movements of the albino rat during feeding. *J Morphol*. 1997; 145: 107-24.
52. Wen FQ, Jabbar AA, Chen YX, Kazarian T, Patel DA, Valentino LA. c-myc proto-oncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies of the effects of iron and ceramide. *Blood*. 2002; 100(3): 912-6.

**ANEXO - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL CEEA/UNICAMP**



UNICAMP

CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

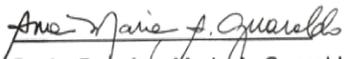
CERTIFICADO

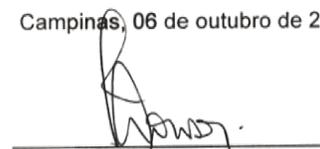
Certificamos que o Protocolo nº **1642-1**, sobre "**Estudo da articulação temporomandibular em modelo murino knockout para hemofilia A e B**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Corrêa / Patricia do Socorro Queiroz Feio**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de outubro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1642-1**, entitled "**Study of the temporomandibular joint in a murine model knockout for Haemophilia A and B**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **October 6, 2008**.

Campinas, 06 de outubro de 2008.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>