



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



SIDNEY FIGUEROBA RAIMUNDO

Cirurgião-Dentista

**Influência da insuficiência estrogênica e do uso
de anti-inflamatórios sobre o deslocamento
posterior funcional da mandíbula induzido na
ATM de ratas.**

Tese Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno e orientada pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

PIRACICABA, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

R133i Figueroba Raimundo, Sidney, 1963 -
 Influência da insuficiência estrogênica e do uso de anti-
 inflamatórios sobre o deslocamento posterior funcional da
 mandíbula induzido na ATM de ratas / Sidney Figueroba
 Raimundo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

 Orientador: Francisco Carlos Groppo.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

 1. Ovariectomia. 2. Maloclusão. I. Groppo, Francisco Carlos.II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
 de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Influence of estrogen insufficiency and anti-inflammatory drugs in functional posterior displacement of the mandible of female rats' TMJ

Palavras-chave em Inglês:

Ovariectomy

Malocclusion

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Francisco Carlos Groppo [Orientador]

Rui Barbosa de Brito Júnior

Rogério Heládio Lopes Motta

Mauro Antonio de Arruda Nóbilo

Maria Cristina Volpato

Data da defesa: 20-10-2011

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

Folha de aprovação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 20 de Outubro de 2011, considerou o candidato SIDNEY FIGUEROBA RAIMUNDO aprovado.

Handwritten signature of Francisco Carlos Groppo.

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

Handwritten signature of Rui Barbosa de Brito Junior.

Prof. Dr. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

Handwritten signature of Rogério Heládio Lopes Motta.

Prof. Dr. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

Handwritten signature of Mauro Antonio de Arruda Nóbilo.

Prof. Dr. MAURO ANTONIO DE ARRUDA NÓBILO

Handwritten signature of Maria Cristina Volpato.

Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

Dedico este trabalho

Quando apagamos as chamas da Paz, Fé e Amor, ainda assim, nem tudo está perdido... Alguma coisa há de ter restado dentro de nós. Isto tem que ser preservado, acima de tudo...

A Felicidade nem sempre bate a nossa porta. Para tê-la é preciso uma busca incessante, e ao encontrá-la ter a coragem de trazê-la para dentro de nós!

Graças Te rendemos, Grande Arquiteto do Universo, porque, por Tua Bondade e Misericórdia, nos tem sido possível vencer as dificuldades interpostas em nosso caminho.

Dedico este trabalho às pessoas que pacientemente aceitaram minha ausência para que pudesse concluí-lo. Amo muito vocês: minha esposa Michelle e meus filhos Thomas e Caio. A vocês minha eterna Gratidão por todo amor recebido até hoje e que o Grande Arquiteto do Universo os ilumine e proteja.

Aos meus familiares e amigos, por fazerem parte da minha vida em todas as situações.

Agradecimento Especial

Em especial ao professor *Dr. Francisco Carlos Groppo* pela orientação deste trabalho. Sem dúvida, encontrei em você, além de professor, amigo e fonte de aprendizado, não apenas farmacológico, mas humano. Muito obrigado. Que o Senhor Deus possa retribuir-lhe em múltiplas alegrias a dedicação na orientação deste trabalho e a constante amizade.

Ao meu grande amigo Paulo César Venâncio, pelos momentos agradáveis e difíceis passados juntos, trabalhos e estudos compartilhados, pela força na execução dos trabalhos, pela sua bela família e pela presteza na elaboração dos fármacos utilizados nesse estudo.

Ao meu amigo e Irmão Sandro Luís Biscaro, pela oportunidade dada a mim de fazer parte de sua equipe de professores no curso de ortodontia ministrado na APCD do Ipiranga em São Paulo durante seis anos e ter me apresentado ao Professor Francisco Carlos Groppo, meu muito obrigado.

À minha família, aos amigos, obrigado por fazerem parte da minha vida, por todo o apoio, incentivo, toda a torcida, confiança e carinho que me deram.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor, Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP), por meio do seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

À Profa. Dra. Renata C. Matheus R. Garcia, coordenadora dos cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e à Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

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

Aos professores e amigos da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. José Ranali, Prof. Dr. Thales Rocha de Matos Filho, e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia de Piracicaba.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo incentivo concedido, processo nº 2006/05023-5.

Aos meus amigos Professores Drs. Gilson César Nobre Franco e Fábio André dos Santos, pelas contribuições para a realização do meu trabalho, pelos conselhos e pela amizade.

Aos Professores Dr. Eduardo Dias de Andrade, Dr. Felipe B. Prado e Dra. Karina Cogo Muller membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização deste projeto.

Aos amigos da farmacologia, com carinho, Márcia Pochapski, Myrella Lessio Castro, Cristiane de Cássia Bergamashi, Luciana Salles Almeida, Luciana Aranha Berto, Karina Cogo Muller, Daniela Belisario Baroni, Michelle Franz Montan, Vanessa Cristina Pin Queiroz, Bruno Bueno Silva, Júlio César Leite da Silva, Patrícia Maria Wiziack Zago, Leila Servat e Leandro Augusto Pinto Pereira, por todos os momentos que passamos juntos, pela ajuda nos seminários, pela amizade e companheirismo.

À Eliane Melo Franco, excelente técnica de laboratório, grande amiga, sempre pronta a ajudar em todos os momentos.

À Maria Elisa dos Santos, secretária eficiente, sempre prestativa, por sempre nos ajudar nas questões burocráticas.

À amiga Luciana Aranha Berto, pela ajuda no preparo do material para a análise de ELISA, meu muito obrigado.

Aos amigos Nádia F. Omar e José R. Gomes, pela ajuda no preparo do material para análise e pela atenção dada sempre que precisei, meu muito obrigado e contem sempre comigo.

Ao José Carlos Gregório, técnico da Disciplina de Farmacologia, muito obrigado pela atenção e ajuda prestada.

À Maria Aparecida Santiago Varela, técnica da Disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela ajuda no preparo do material de microscopia de luz, meu muito obrigado.

Aos meus amigos professores da FOP Dr. Francisco Haiter Neto, Dr. Paulo Henrique Caria, Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar e Dr. Antônio Carlos Pereira, pelos momentos agradáveis que passamos junto, muito obrigado pelas suas amizades.

Aos amigos e pessoas que embora não citados colaboraram e incentivaram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

As desordens da articulação temporomandibular (DTM) estão associadas com o processo inflamatório, incluindo os componentes biológico e comportamental. O objetivo foi avaliar o efeito de dois anti-inflamatórios (parecoxibe e dexametasona) na morfologia da ATM e produção de interleucinas pro-inflamatórias em ratas ovariectomizadas (OVX), com ou sem deslocamento posterior funcional (DPFM). Foram utilizadas 72 ratas em quatro grupos: G1 - sem DPFM e não OVX; G2 – com DPFM e não OVX; G3 - sem DPFM e OVX; G4 – com DPFM e OVX. O DPFM da mandíbula foi induzido por meio de um dispositivo confeccionado com bandas ortodônticas nos incisivos superiores. Após 7 dias da indução do DPFM, as ratas foram tratadas com NaCl 0,9% (CONT) ou parecoxibe 0,3mg/kg/dia (PARE) ou dexametasona 0,1mg/kg/dia (DEXA), via intramuscular. Após 7 dias de tratamento, as ATM de ambos os lados foram retiradas em bloco. Uma das ATM foi submetida ao processamento histológico (hematoxilina-eosina). A ATM contralateral foi macerada e centrifugada e o sobrenadante submetido ao imunoenensaio (ELISA) para avaliação das interleucinas IL1-beta e IL-6. A leitura foi feita por espectrofotometria. Todos os animais foram pesados com a mesma idade, previamente à sua morte. Foi possível observar que, independentemente do tratamento, as fêmeas que não foram submetidas ao DPFM mostraram variação de peso corporal em média (\pm erro padrão) de $-0,41 \pm 0,72\%$; aquelas submetidas ao DPFM de $-4,8 \pm 1,1\%$; as submetidas à OVX de $26,9 \pm 1,2\%$ e aquelas submetidas ao DPFM e OVX de $8,3 \pm 2,5\%$. Estes dados em conjunto mostram que houve ganho de peso nos animais submetidos à OVX, mas não houve alteração de peso nos animais submetidos ao DPFM. O PARE e a DEXA diminuíram (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) a área da cartilagem articular nos animais do Grupo sem-DPFM em relação ao controle, mas o PARE aumentou a área em relação à DEXA, não havendo diferenças entre ambos e o controle. Os tratamentos não influenciaram a concentração de IL1-beta no Grupo sem-DPFM, mas no Grupo com-DPFM, a

concentração foi maior (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) para DEXA. Nos demais Grupos não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Independentemente do tratamento, a IL1-beta foi menor no Grupo sem-DPFM do que nos demais grupos. O nível de IL1-beta no Grupo com-DPFM foi maior do que no grupo sem-DPFM+OVX, mas não apresentou diferenças com o grupo com-DPFM+OVX, exceto para a DEXA. A concentração de IL-6 não foi afetada pelos tratamentos em nenhum dos quatro grupos. Entretanto, a comparação entre os grupos revelou que o Grupo com-DPFM apresentou maior concentração de IL-6, considerando todos os tratamentos. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de IL-6 dos Grupos sem-DPFM, sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX. Os parâmetros histológicos não foram afetados pelo DPFM ou OVX, mas sim pelos tratamentos. Concluímos que o DPFM aumentou os níveis das interleucinas pró-inflamatórias IL1-beta e IL-6, sendo que as ratas com DPFM tiveram as concentrações das interleucinas atenuadas pela ovariectomia. Os anti-inflamatórios parecoxibe e dexametasona não interferiram com as concentrações das citocinas. A área da cartilagem articular não foi influenciada pelo DPFM, mas a associação ao PARE gerou aumento na área da cartilagem articular.

Palavras chaves: Articulação Temporomandibular, Ovariectomia, Anti-inflamatórios

ABSTRACT

Temporomandibular disorders (TMD) are associated with pain/inflammatory process, including biological and behavioral parameters. The aim of the present study was to evaluate the effect of two anti-inflammatories (parecoxib and dexamethasone) in the TMJ morphology of ovariectomized rats (OVX) with or without retrusive displacement of mandible (RDM). 72 rats were distributed into 4 groups: G1 – no RDM and no OVX; G2 - with RDM and no OVX; G3 – no RDM, but with OVX; G4 - with both RDM and OVX. The RDM induction was achieved by placing an oral device made with steel strips (orthodontic band) in the rat upper-incisors. After 7 days of RDM, the animals were submitted to one of the following treatments: 0.9% NaCl (CONT); 0.30mg/kg/im/day parecoxib (PARE); or 0.1mg/kg/im/day dexamethasone (DEXA). After 7 days of treatment, the TMJs of both sides were removed. One of them was submitted to histological procedure (HE) after fixation and decalcification. The contralateral TMJ was macerated, centrifuged and the supernatant was submitted to the immunoassay (ELISA) in order to evaluate the pro-inflammatory cytokines (IL1-beta and IL-6). The readings were performed by spectrophotometry. All animals were weighed with the same age and before they were killed. It was possible to observe that the rats without RDM showed a mean (\pm SE) variation of body weight of $-0.41\pm 0.72\%$; the ones not submitted to RDM was $-4.8\pm 1.1\%$; with OVX of $26.9\pm 1.2\%$ and the ones submitted to both RDM and OVX was $8.3\pm 2.5\%$. In general, these data showed a body weight gain in the animals with OVX, but not in the ones with RDM. Both PARE and DEXA decreased (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) the articular cartilage area in G1 when compared to CONT, but PARE increased the area in relation to DEXA. None of the treatments influenced the IL1-beta levels in G1, but it was higher in G2 (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) for DEXA. No differences were observed among treatments for groups 3 and 4 ($p > 0.05$). IL1-beta levels were lower in G1 when compared to the other ones, disregarding of treatments. These levels were higher

in G2 than G3 but not G4 (except for DEXA). None of the treatments affected the IL-6 levels considering each group. G2 showed the highest IL-6 levels than the other groups, irrespectively of the treatments. No statistically significant differences among the levels of IL-6 of G1, G3 and G4 were found. The morphological parameters were not affected by RDM or by OVX, but the treatments. We concluded that RDM increased the levels of both cytokines, being reduced by OVX. Both PARE and DEXA did not interfere with cytokines levels. The articular cartilage area was not influenced by RDM, but it increased this area when associated with PARE.

Key words: Temporomandibular joint, Ovariectomy, Anti-inflammatory

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- AINES - Anti-inflamatório não esteroidal
- ATM - Articulação Temporomandibular
- CFA - Adjuvante Completo de Freund
- DPFM - Deslocamento Posterior Funcional da Mandíbula
- DTM - Disfunção Temporomandibular
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- i.m. - Intramuscular
- i.p. - Intraperitoneal
- nm - Nanômetro
- OVX - Ovariectomia

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O fenômeno inflamatório.....	4
2.2 Os corticoides.....	6
2.3 Os anti-inflamatórios (AINEs).....	9
2.4 Estrógeno.....	12
2.5 Citocinas.....	17
2.6 Modelos de interferência oclusal em animais.....	19
3 PROPOSIÇÃO.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5 RESULTADOS.....	35
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação do tipo sinovial, que se estabelece entre as extremidades ósseas da cabeça da mandíbula, a fossa mandibular e o tubérculo articular do osso temporal. As superfícies articulares da fossa mandibular e da cabeça da mandíbula são revestidas por tecido fibrocartilagenoso (Katchburian & Arana, 2004).

Este tecido é geralmente menos susceptível aos efeitos de envelhecimento do que a cartilagem hialina presente na maioria das articulações do tipo sinovial e, dessa forma, menos provável de desgaste com o tempo. A cartilagem fibrosa ou fibrocartilagem é uma forma de transição entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina, uma vez que se constitui de uma combinação de fibras colágenas densas e de células cartilaginosas localizadas em lacunas e rodeadas por quantidades variáveis de matriz hialina (Geneser, 2003).

A disfunção temporomandibular (DTM) é um termo amplo que abrangem variados e diversos problemas clínicos que afetam os músculos da mastigação, a ATM e estruturas associadas. Estas disfunções são caracterizadas principalmente por dor, sons na articulação e função limitada ou irregular da mandíbula (Zarb & Carlsson, 1979).

A DTM tem sua maior prevalência no gênero feminino, cerca de 80% (Warren & Fried, 2001), com idade predominante entre 20 e 45 anos (Okuda *et al.*, 1996). Os fatores que afetam o equilíbrio dinâmico do sistema da mastigação

são traumas, fatores anatômicos, patofisiológicos e psicossociais. Por ser classificada como uma doença multifatorial, a DTM não apresenta fator etiológico específico, mas fatores de risco, subdivididos em predisponentes, iniciadores e perpetuantes. A DTM é subdividida pela Academia Americana de Dor Orofacial (American Academy of Orofacial Pain - AAOP) em DTM muscular, DTM articular ou ambas. A DTM articular engloba as desordens de origem congênita, desordens de disco articular, e desordens inflamatórias e não inflamatórias da ATM (De Leeuw, 2008).

O estrogênio, em concentrações fisiológicas, possui participação importante na remodelação das ATM, desempenhando um papel na remodelação da cartilagem articular (Yasuoka *et al.*, 2000). Um aumento nas expressões de estrogênio predispõe o desenvolvimento das DTMs e sua deficiência leva a um aumento da atividade das unidades de remodelação óssea, com consequente aumento do desequilíbrio de remodelação (Abubaker *et al.*, 1996).

Injúrias na articulação temporomandibular podem ser a causa inflamatória envolvendo os tecidos da ATM. A interleucina 1-beta (IL-1beta) seria um dos mediadores chave no processo inflamatório e na contribuição da destruição da cartilagem nas doenças inflamatórias articulares (artrite reumatoide).

O controle da dor é a primeira meta no tratamento da DTM. Os agentes mais comumente usados para o tratamento dessa sintomatologia dolorosa e inflamatória são os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), corticosteroides, relaxantes musculares (ciclobenzaprina, tizanidina), ansiolíticos,

opioides e antidepressivos tricíclicos. Infelizmente, o tratamento farmacológico é muito empírico, pois há poucos estudos que demonstram a eficácia destes agentes (Cairns *et al.*, 2010).

Quando usados como parte de um programa mais amplo, incluindo várias modalidades terapêuticas tais como placas oclusais, acupuntura, fisioterapia, entre outras, a terapia farmacológica pode ser um método efetivo, pois esses fármacos podem promover maior conforto, contribuindo para a reabilitação do paciente.

Os anti-inflamatórios (esteroidais e não esteroidais) são indicados no tratamento de processos inflamatórios, dolorosos ou febris, como osteoartrites, sinovites, etc. Os AINEs seletivos da cicloxigenase inflamatória (COX-2) surgiram como uma alternativa terapêutica, pois não produziram efeitos gastrintestinais adversos quando comparado com os não-seletivos. O parecoxib é o único AINE seletivo disponível na forma injetável atualmente no mercado, sendo que existem poucas informações sobre sua eficácia farmacológica. A importância dos glicocorticoides (GC) está ligada não só à melhora da qualidade de vida, como também à sobrevida de pacientes com doenças que apresentam características imunológicas em sua etiopatogênese. Ambas as classes de anti-inflamatórios tem larga utilização dentro da Odontologia.

Entretanto, o uso de corticoides e AINES para o tratamento da DTM não está bem documentado na literatura, assim como sua eficácia e influência nos parâmetros morfológicos e inflamatórios dessa patologia ainda é incipiente, mesmo em modelos animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Embora as disfunções temporomandibulares (DTM) sejam de etiologia multifatorial (Carlsson, 1984), o papel da oclusão tem ocupado um lugar de destaque e neste ponto existe muita polêmica a respeito das alterações oclusais que podem estar significativamente envolvidas nessa etiologia (McNamara *et al.*, 1995), entretanto, é consenso de que combinação de algumas alterações oclusais tornam a oclusão um fator de risco em indivíduos biologicamente susceptíveis (Pullinger *et al.*, 1993). A oclusão não é sinônima de dor orofacial ou de DTM dolorosa, mas, se o componente oclusal for um fator contribuinte para a dor por disfunção, é evidente que ele é significativo e não deve ser desprezado (Litvak & Malament, 1993).

2.1 O fenômeno inflamatório

Após a lesão tecidual, o organismo ativa a fosfolipase A2, enzima presente em todos os tecidos e que converte os fosfolípidos da membrana das células lesadas em ácido araquidônico, entre outros produtos. Devido à sua instabilidade este ácido é rapidamente convertido em outros subprodutos, por dois sistemas enzimáticos: cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (Andrade 2006).

Existem pelo menos duas isoformas de COX, as quais apresentam diferenças na sua regulação e expressão. As COX-1 e COX-2 possuem 60% de homologia na sua sequência de aminoácidos e são expressas de forma conjunta em muitos tecidos. A COX-1, dita "constitutiva", auxilia na manutenção da

integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetária e modulação do fluxo plasmático renal (Klippel *et al.*, 2001).

A COX-2 é uma enzima induzível, geralmente indetectável na maioria dos tecidos, sendo sua expressão é aumentada em processos inflamatórios. Ela é expressa constitutivamente no cérebro, rim, ossos e provavelmente no sistema reprodutor feminino. Sua atividade é importante na modulação do fluxo sanguíneo glomerular e balanço hidroeletrólítico. Sua expressão é inibida pelos glicocorticoides, o que explicaria os seus efeitos anti-inflamatórios (Solomon, 2007).

O ácido araquidônico metabolizado pelas COXs produz, entre outros subprodutos, as prostaglandinas (PG). A PG-G₂ sob ação da peroxidase é transformada em PG-H₂, sendo então convertida em outras prostaglandinas, prostaciclina (PG-I₂) e tromboxanos (TXs). As prostaglandinas têm ação vasodilatadora, sendo a PG-D₂ liberada de mastócitos ativados por estímulos alérgicos, entre outros. A PG-E₂ inibe a ação de linfócitos e outras células que participam das respostas alérgicas ou inflamatórias. Além de promoverem vasodilatação, as PG sensibilizam os nociceptores (hiperalgesia) e estimulam os centros hipotalâmicos de termorregulação, causando a febre. A PG-I₂ predomina no endotélio vascular e atua causando vasodilatação e inibição da adesividade plaquetária (Júnior *et al.*, 2000).

O TX, predominante nas plaquetas, causa efeitos contrários, tais como vasoconstrição e agregação plaquetária, aos da PG-I₂. Os leucotrienos aumentam

a permeabilidade vascular e atraem os leucócitos para o sítio da lesão. A histamina e a bradicinina, embora não sejam produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico, também aumentam a permeabilidade capilar e ativam os receptores nocigênicos (Júnior *et al.*, 2000).

2.2 Os corticoides

Os glicocorticoides, corticosteroides ou corticoides, são hormônios secretados pelo córtex das glândulas suprarrenais e estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, bem como na adaptação ao estresse. A hidrocortisona (cortisol) é o principal corticoide natural, sendo produzida de forma rítmica, cíclica, com pico às 8 horas da manhã. Por ser um derivado lipídico com baixa solubilidade plasmática, cerca de 80% do cortisol é transportado ligado a uma proteína plasmática carreadora específica (uma globulina fixadora de cortisol chamada de transcortina) e 10% ligado à albumina, sendo que o restante circula em sua forma livre (Kirwan, 1998). Tanto o cortisol quanto os seus análogos sintéticos são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal.

Os corticoides podem ser classificados de acordo com sua meia-vida, sua potência e sua duração de ação. A cortisona e cortisol são considerados de ação curta (8 a 12 horas); a prednisona, a prednisolona, a metilprednisolona e a triamcinolona de ação intermediária (12 a 36 horas); e a dexametasona e a betametasona de ação longa (36 a 72 horas). Estes últimos têm sido considerados

como primeira escolha para o uso odontológico, apresentando potência de ação entre 25 a 30 vezes maior que a hidrocortisona (Andrade, 2006).

Basicamente, o mecanismo de ação dos corticoides ocorre pela indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias, as chamadas anexinas, tais como a lipocortina-1 e proteína inibidora do fator nuclear kB (IkB), e proteínas que atuam no metabolismo (ativadoras da gliconeogênese, por exemplo). Este processo é chamado de transativação (Song *et al.*, 2005).

Atuam também pela trans-repressão, interagindo com fatores de transcrição gênica (proteína ativadora 1 e o fator nuclear kB), inibindo as funções de outras proteínas. Por essa via, por exemplo, a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL-6, IL-2, IL-1, IL-12, interferon-gama), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), prostaglandinas (PG) e leucotrienos é reduzida. Muitos estudos têm demonstrado que a maior parte dos efeitos clínicos dos corticoides ocorre por mecanismos de trans-repressão, enquanto que grande parte dos efeitos adversos é relacionada aos mecanismos de transativação (Song *et al.*, 2005).

Os corticoides suprimem também a síntese e a ação do estrógeno e da testosterona, promovendo mudanças na síntese, liberação e ação de neurotransmissores e neuropeptídeos – particularmente catecolaminas, GABA e prostaglandinas. Além disso, diminuem a proliferação de fibroblastos, a síntese de DNA e do colágeno, reduzindo discretamente os níveis de imunoglobulinas, sem reduzir a produção específica de anticorpos (Klippel *et al.*, 2001).

Em relação à prevenção da hiperalgesia e ao controle do edema, a inibição da fosfolipase A₂ e, conseqüentemente, as enzimas COX e LOX, é provavelmente o principal mecanismo de ação dos corticoides. A inativação desta enzima faz diminuir a disponibilidade de ácido araquidônico nas células no local inflamado, diminuindo a síntese de seus metabólitos pela via COX-2, sendo que estes fármacos praticamente não atuam sobre a COX-1 (Andrade, 2006).

A dexametasona pertence à classe dos corticosteroides sintéticos e, como outros hormônios esteroides, atua controlando a velocidade de síntese de proteínas. Esses agentes reagem com proteínas receptoras no citoplasma das células sensíveis de muitos tecidos, formando um complexo esteroide-receptor, promovendo alterações significativas na resposta imune linfocitária, sendo isso parte de sua ação anti-inflamatória e imunossupressora (Andrews & Walker, 1999).

No tratamento das inflamações articulares, vários tipos de corticosteroides têm sido utilizados, tais como a prednisolona, metilprednisolona e betametasona, mas com maior preferência pela dexametasona (El-Hakim *et al.*, 2005).

A dexametasona administrada via intraperitonal em ratos com sinovite induzida por trauma não causa nenhum efeito deletério na ATM. Entretanto, animais medicados com a dexametasona em injeção única intra-articular sofrem reabsorção com atividade osteoclástica ativa na superfície da cabeça do côndilo mandibular na sexta semana (El-Hakim *et al.*, 2005).

Um estudo, realizado por Kerins *et al.* (2005), mostrou a eficácia da

dexametasona no tratamento da dor e inflamação na ATM de ratos (induzidas pela injeção de adjuvante completo Freund (CFA)), sendo que a dexametasona, injetada via i.p., atenuou os efeitos nocivos na ATM quando comparado com os animais do grupo controle.

2.3 Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Outro tipo de anti-inflamatório muito utilizado em Medicina e Odontologia, são aqueles chamados de não esteroidais (AINEs), os quais têm como protótipo o ácido acetilsalicílico. O principal mecanismo de ação destes anti-inflamatórios é a inibição da COX, com a consequente redução da conversão do ácido araquidônico em seus subprodutos.

Tanto a aspirina quanto os outros AINEs não bloqueiam a via da lipoxigenase; não inibindo, desta forma, a produção de leucotrienos. Portanto, os AINEs reduzem, mas não eliminam completamente os sinais e sintomas inflamatórios (Hardman *et al.*, 1996).

A partir da década de 90, foram desenvolvidos vários anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) com propriedades inibitórias seletivas contra a COX-2, numa tentativa de aumentar a aceitação dessas medicações pelos pacientes, reduzindo a toxicidade (principalmente gastrointestinal) e aumentando o efeito anti-inflamatório. Dentre os AINEs de uso corrente, são considerados com maior seletividade para COX-2: a nimesulida, o meloxicam, o celecoxibe, o rofecoxibe, o etoricoxibe, o valdecoxibe e o lumiracoxibe, sendo os últimos cinco fármacos

considerados como altamente seletivos para a isoforma COX-2 (Solomon, 2007). Estes inibidores altamente seletivos não tem grupo carboxílico, presente na maioria dos AINEs e, por isso, são capazes de inativar a enzima COX-2 de maneira seletiva, pois tem encaixe espacial diferente dos outros AINES. Apresentam baixa hidrossolubilidade, o que dificulta a sua administração parenteral (Griec & Stitzel, 2005).

Alguns destes fármacos já foram removidos dos mercados mundiais. O perfil de toxicidade destes anti-inflamatórios mais seletivos foi evidenciado em estudos clínicos que mostraram uma ocorrência elevada de eventos cardiovasculares e tromboembólicos em usuários crônicos destes medicamentos. Estes inibidores reduzem a produção de PG-I₂ vascular e podem afetar o equilíbrio entre TX-A₂ e PG-I₂, levando a um aumento de eventos trombóticos e cardiovasculares. Alguns estudos clínicos apontaram diferenças entre os coxibes em relação ao risco cardiovascular, sendo que estas diferenças não estariam apenas associadas a eventos trombóticos, mas também à retenção de sódio e água, elevação da pressão arterial e ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Muitos destes eventos ocorrem devido a alterações na formação de prostaglandinas alterando as trocas de sódio e água em nível tubular renal (Saraiva, 2007; Monteiro *et al.*, 2008).

O parecoxibe é uma pró-droga hidrossolúvel do valdecoxibe, sendo inibidor altamente seletivo da cicloxigenase-2 (COX-2). Foi desenvolvido como agente analgésico e anti-inflamatório para uso no pós-operatório de pacientes nos quais

fosse necessária a adição de analgésicos parenterais ao tratamento com opiáceos ou mesmo em substituição aos opiáceos ou AINES convencionais administrados por via parenteral (Tang J *et al.*, 2002).

É indicado para o tratamento das sinovites e capsulites, particularmente da forma aguda, aliviando os efeitos da inflamação de maneira imediata, prevenindo o desenvolvimento de fibrose na cápsula articular e também prevenindo ou minimizando o desenvolvimento da osteoartrite. Nestes quadros ocorre diminuição do movimento e da capacidade de absorver choques, induzindo maior dano aos tecidos envolvidos (McIlwraith, 2002).

Acredita-se que diferenças na estrutura química dos coxibes sejam fatores determinantes do perfil farmacológico de cada um deles. Entretanto, a relação entre dose e efeitos adversos tem mostrado uma linearidade comum a todos os coxibes. O papel dos coxibes na terapia anti-inflamatória e analgésica é questionável, pois sua eficácia é similar a dos AINEs não-seletivos, sendo que estes últimos apresentam custo consideravelmente menor e maior segurança cardiovascular. É recomendável cautela em relação aos representantes destes fármacos seletivos que permanecem no mercado, evitando seu uso como medicamentos de primeira escolha. Assim, a prescrição de coxibes deve ser reservada a pacientes com alto risco gastrointestinal, sendo contraindicado na doença coronariana e cerebrovascular estabelecida (Monteiro *et al.*, 2008). Entretanto, essa classe de fármacos tem sido largamente utilizada em doses únicas

diárias, por curtos períodos de tempo, em muitos procedimentos odontológicos (Mehlich *et al.*, 2004; Meechan, 2006).

Lauren & Dionne (2004) compararam o efeito do celecoxibe, naproxeno e placebo para o tratamento de pacientes sintomáticos, com deslocamento do disco e redução durante seis semanas. Após este período, o naproxeno reduziu significativamente a dor, quando em comparação ao celecoxibe e placebo, sendo mais efetivo para o tratamento de dor da ATM.

2.4 Estrógeno

Os hormônios sexuais esteroides têm uma grande influência sobre o metabolismo e atividade celulares. Esses hormônios influenciam a diferenciação, crescimento, desenvolvimento e atuam no metabolismo dos tecidos conjuntivos em vários aspectos: controle da proliferação celular, morte celular, síntese de colágeno e outras proteínas, e síntese de prostaglandinas (Dyer *et al.*, 1980).

Cerca de 80% dos hormônios são moléculas hidrossolúveis (polipeptídios, proteínas) e se ligam a receptores que são proteínas integrais da membrana das células-alvo. Ao se combinarem aos respectivos hormônios, os receptores acionam os mecanismos intracelulares que aumentam a concentração de íons de cálcio ou de adenosina-monofosfato cíclico (Plaut, 1987).

Os hormônios lipossolúveis, como os hormônios esteroides da camada cortical da glândula suprarrenal, os dos ovários (estrógenos, progesterona) e dos testículos (testosterona), bem como os hormônios da glândula tireoide (T3 e T4),

que são aminoácidos modificados, atravessam facilmente a membrana celular e penetram na célula, indo agir sobre receptores específicos localizados no citoplasma e no núcleo. Ao se combinarem com os respectivos hormônios, esses receptores adquirem afinidade para determinadas sequências nucleotídicas do DNA, com as quais se combinam de modo reversível. Essa combinação altera a atividade dos genes próximos, que passam, geralmente, a produzir maior quantidade dos respectivos RNAs mensageiros, mas algumas vezes há diminuição e não aumento da transcrição gênica (Evans, 1988).

Para exercer a sua ação, o estrogênio deve se ligar a um receptor. A função básica do receptor consiste em: ligação, translocação, dimerização, ligação ao DNA e transativação (Tsai & O'Malley, 1994).

Estudos químicos sugerem que os receptores são estruturalmente organizados em diferentes domínios (Figura 1). Todos os receptores têm uma estrutura similar (Brentani & Feldman, 1995), a saber:

- região A/B, localizada na porção aminoterminal, a mais variável das regiões, denominada de região moduladora. A função desse domínio não é bem definida. A função de transativação, a qual parece ser independente da ligação do ligante, pertenceria a essa área, provavelmente pela interação com outros fatores transcricionais;

- região C ou domínio de ligação ao DNA. Essa região possui 70 aminoácidos, incluindo muitos resíduos de cisteínas; é importante região de reconhecimento da sequência de DNA e na dimerização do receptor;

- região D ou dobradiça, isto é, onde a molécula do receptor se dobra;
- região E e F ou domínios que contêm as funções de translocação.

Esta porção carboxiterminal é responsável pela ligação do ligante.

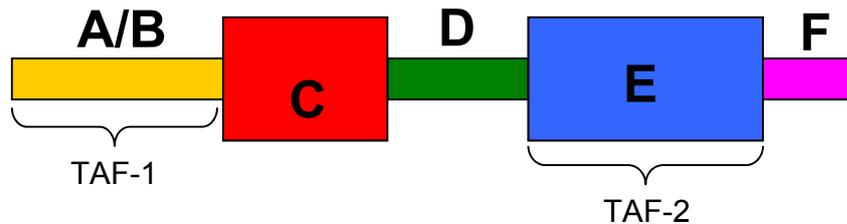


Figura 1. Estrutura funcional do receptor de estrogênio (adaptada de Jordan, 1996).

Uma vez ligado ao receptor, o complexo hormônio-receptor interage com uma sequência específica do DNA próxima ao gene-alvo, ativando ou reprimindo a transcrição gênica. A função específica dos diversos esteroides depende dos genes, isto é, da informação que eles regulam. Parte da especificidade da regulação gênica refere-se ao reconhecimento dos elementos de resposta do DNA (Zilliacus *et al.*, 1995).

O receptor de estrogênio acha-se presente em uma concentração de 10.000 a 100.000 moléculas por célula, em tecidos do trato reprodutivo, mas encontra-se em níveis bem mais baixos, em torno de 200 a 1000 moléculas por célula em outros tecidos, inclusive no ósseo. A especificidade do esteroide é determinada pelo domínio de ligação do hormônio na região do receptor e a resposta do tecido depende do número de receptores. A baixa concentração de

estrogênio em osteoblastos, comparativamente às células dos tecidos reprodutivos, é também compatível com uma atividade direta sobre o esqueleto (Turner *et al.*, 1994).

O efeito do estrogênio sobre o tecido ósseo, depois de finalizado o período de crescimento, consiste na inibição da remodelação ao diminuir a frequência de ativação. Possivelmente, o estrogênio exerça este efeito pela inibição da produção de citocinas que estimulam o recrutamento e a ativação de osteoclastos, entre elas a produção de interleucina-6 e interleucina-11 pelos osteoblastos.

O colágeno sintetizado pelo estímulo estrogênico é normalmente mais imaturo e mais elástico do que o colágeno Tipo I normalmente encontrado na articulação temporomandibular (Gage, 1985).

Vários estudos têm sido reportados sobre a influência da deficiência de estrogênio na ATM (Elovic *et al.*, 1995; Abubaker *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998; Yamashiro & Yamamoto, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Yasuoka *et al.*, 2000).

Entretanto, não há um consenso claro na literatura sobre o papel da deficiência estrogênica na DTM. Em concentrações fisiológicas, o estrogênio tem participação importante na remodelação da ATM, particularmente da cartilagem articular (Yasuoka *et al.*, 2000).

Omi & Ezawa, (1995) relatam que aos três meses de idade, as ratas já alcançam sua maturidade sexual e são capazes de responder à deficiência de hormônios sexuais provocada pela ovariectomia.

Ratas ovariectomizadas tendem ter um maior ganho de peso (Wronski *et al.*, 1987; Wronski *et al.*, 1988). A insuficiência de estrogênio pode provocar um aumento de até 25% no peso dos animais, com o conseqüente estímulo da função mastigatória, o que pode proteger a mandíbula da perda de sua integridade estrutural (Elovic *et al.*, 1995; Eckel, 2011).

Um aumento na expressão de estrogênio predispõe o desenvolvimento das DTM e sua deficiência leva a um aumento da remodelação óssea, com conseqüente aumento do desequilíbrio do processo de aposição/reabsorção óssea (Abubaker *et al.*, 1996). Talwar *et al.* (2006) também mostraram que o estrogênio diminui a espessura da cartilagem articular pela inibição da proliferação e aumento na maturação de condrócitos.

Tanaka *et al.* (2000) demonstraram que a deficiência de estrogênio provocou perda óssea em diferentes regiões específicas da ATM, sendo menor na porção que recebia maior carga oclusal, resultado da ação da carga mastigatória mais intensa e, conseqüentemente, supressão da reabsorção e redução do efeito provocado pela deficiência do estrogênio.

A falta de hormônios ovarianos em ratas ooforectomizadas levando a deficiência de estrogênio durante a puberdade predispõe a alterações da ATM (Okuda *et al.*, 1996).

Um estudo histomorfométrico da ATM de ratas ooforectomizadas concluiu que a reposição com estrogênio em uma concentração fisiológica pode desenvolver um papel importante na remodelação e restabelecer a espessura do tecido

articular (Yasuoka *et al.*, 2000).

A influência do estrogênio e androgênio sobre o metabolismo ósseo e modelação da cabeça da mandíbula em ratos ooforectomizados em crescimento, através de exame histológico e histoquímico foi descrito por Fujita *et al.*, 2001.

Além do fenômeno inflamatório, foi sugerida a hipótese de que o estrogênio aumentaria a excitabilidade neural da ATM de ratas ooforectomizadas. A comparação entre estas e ratas ooforectomizadas, mas que receberam reposição hormonal com 17β -estradiol, mostrou que o estrogênio e a inflamação afetam a expressão e as propriedades dos canais de íon dos neurônios da ATM, aumentando a excitabilidade neural (Flake *et al.*, 2005).

2.5 Citocinas

Injúrias na articulação temporomandibular pode ser a causa inflamatória envolvendo os tecidos da ATM. As citocinas predominantemente envolvidas nos processos degenerativos intra-articulares são IL1-beta e IL-6 (Milam *et al.*, 1998).

Algumas citocinas foram previamente associadas com a destruição do tecido conjuntivo da ATM, pois essas citocinas induzem a síntese de proteases o que pode aumentar a degradação de cartilagem (Emshoff *et al.*, 2000).

O estímulo mecânico patológico poderia causar um aumento no nível de IL1-beta (Nishimura *et al.*, 2002), sendo esta a principal interleucina pró-inflamatória, a qual pode acentuar a atividade catabólica de muitas células, tais como condrócitos e fibroblastos (Livne *et al.*, 1997).

Em um estudo realizado por Harper *et al.* (2001), foram analisados os efeitos de diferentes doses de CFA (Adjuvante Completo de Freund) injetadas na ATM de ratos sobre alguns marcadores biológicos da inflamação, com o objetivo de se estabelecer um modelo animal com variados graus de inflamação articular, permitindo assim, o desenvolvimento de agentes e terapias que pudessem modular a severidade da doença. Para esta finalidade, as concentrações plasmáticas de corticosteroide e de IL1-beta foram quantificadas utilizando as técnicas de radioimunoensaio e Elisa respectivamente. Os resultados sugerem que uma dose intermediária de CFA pode ser usada para efeito submáximo do nível de inflamação da ATM.

Algumas citocinas são também capazes de estimular a proliferação de sinoviócitos (van Leeuwen *et al.*, 1995; Kacena *et al.*, 2001). Lai *et al.* (2006) observaram que o aumento da expressão de IL1-beta na ATM de camundongos adultos causou disfunção e dor articular.

A IL-6 é produzida pela ação da TNF-alfa e IL1-beta, as quais são secretadas pelos sinoviócitos (Kacena *et al.*, 2001). É uma interleucina com atuação tanto na resposta imune-inata como na resposta adaptativa, sendo sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos (Souza *et al.*, 2008). Esta interleucina é normalmente expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressantes (Ersheler & Keller 2000). A IL-6 também é correlacionada com a

degradação da cartilagem e remodelação/reabsorção óssea, podendo ativar diretamente osteoclastos (van Leeuwen *et al.*, 1995; Kacena *et al.*, 2001).

Existem evidências de que o estrógeno atuaria sobre os monócitos promovendo a redução dos níveis de IL-1 (Pacifici *et al.*, 1989) e TNF-alfa (Pacifici *et al.*, 1990). Além disso, a ligação da TNF-alfa ao receptor p55-TNF-alfa de células T, induziria a liberação de M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) e RANKL (ligante do receptor ativador de fator nuclear- κ B), sendo que estes fatores promovem a fusão dos progenitores de osteoclastos (Cenci *et al.*, 2000). Desta forma, o estrógeno inibiria, de forma indireta, a formação de osteoclastos (Pacifici, 1996).

2.6 Modelos de interferência oclusal em animais

Modelos de estudo sobre alterações oclusais em animais, particularmente em ratos, são amplamente aceitos e descritos na literatura (Ulgen *et al.*, 1997; Kiliaridis *et al.*, 1999; Rabie *et al.*, 2001; Fuentes *et al.*, 2003; Muto *et al.*, 2003; Rabie *et al.*, 2003; Stockistill *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

Simonić-Kocijan *et al.* (2009) observaram que o stress crônico e a maloclusão não seriam capazes de alterar o comportamento nociceptivo de animais.

Entretanto, Kerins *et al.* (2005) mostraram uma redução no número e duração das refeições em animais submetidos à DTM por injeção de CFA, sendo a dor uma das causas de limitação no ganho de peso.

A função mastigatória prejudicada pode resultar na diminuição no tamanho da cabeça da mandíbula, em mudanças na espessura da cartilagem articular e/ou outras alterações morfológicas e histológicas (Kiliaridis *et al.*, 1999).

Estudos em animais mostraram que a ATM é uma estrutura dinâmica, a qual é capaz de se adaptar ao estresse biomecânico (Milam & Schmitz, 1995), sendo que esta capacidade adaptativa é individual e provavelmente causada por variações genéticas. Essa característica permite ao sistema mastigatório continuar funcionando quando ocorre perda ou dano tecidual (Gelb & Gelb, 1989; Imirzalioglu *et al.*, 2005).

O efeito do aumento da dimensão vertical bilateral em animais induz à resposta histológica e remodelação periodontal e da cartilagem da articulação temporomandibular (ATM), este aumento não influencia na ingestão de nutrientes e no peso corporal (Li *et al.*, 2010).

Os tecidos articulares apresentam grande quantidade de fibras colágenas e proteoglicanos, onde as fibras de colágenos são responsáveis pela resistência à tensão e os proteoglicanos pela resistência à compressão. Mao *et al.* (1998) checaram a expressão de proteoglicanos na ATM de ratos em resposta a um aumento unilateral da mordida. O aumento unilateral foi realizado com resina fotopolimerizável sobre os molares superiores direitos, mantendo por quatro

semanas. O aumento na expressão de proteoglicanos sugeriu que a alteração unilateral da mordida induziria a um aumento nas forças compressivas na ATM dos animais.

Ghafari & Degroote (1986) avaliaram a resposta na cartilagem articular em ratos com retrusão mandibular induzida por guia oclusal confeccionado com banda ortodôntica cimentado nos incisivos superiores com resina composta. Observaram diminuição na espessura da zona hipertrófica, um aumento na zona proliferativa e diminuição na espessura total da cartilagem articular nos animais com oclusão alterada quando comparado ao grupo controle.

O deslocamento posterior funcional da mandíbula diminui a espessura da cartilagem articular (Fuentes *et al.*, 2003), enquanto que o deslocamento protrusivo prolongado da mandíbula aumentaria o número de replicações celulares na ATM (Rabie *et al.*, 2003).

O processo de remodelação das estruturas da articulação temporomandibular foi investigado em ratos, com deslocamento posterior funcional mandibular induzido. A oclusão foi alterada com a cimentação de um guia oclusal confeccionado com banda ortodôntica nos incisivos superiores em 24 ratos pelo período de 4, 7 e 14 dias. Os ratos com deslocamento mandibular induzido apresentaram diminuição em células proliferativas, disfunção na remodelação da cartilagem condilar e injúrias na inervação (Cholasueksa *et al.*, 2004).

Farias-Neto *et al.* (2011) utilizando a metodologia de indução da maloclusão, a qual foi adaptada de Cholasueksa *et al.* (2004), avaliaram a alteração do crescimento mandibular em ratas com deslocamento posterior funcional, durante oito semanas. Essa maloclusão resultou em menor crescimento no comprimento mandibular, mostrando, assim, que a metodologia induz alterações mandibulares significativas.

O efeito da maloclusão induzida por um aumento unilateral da dimensão vertical em ratos foi avaliado histologicamente e imunohistologicamente na cartilagem articular da cabeça da mandíbula. A avaliação imunohistológica com anticorpo anti-interleucina-1(IL-1) demonstrou a existência de condrócitos positivamente corados na cartilagem articular. Os resultados sugerem que a maloclusão unilateral pode induzir a uma diminuição da cartilagem articular, que pode ser o resultado do tamanho reduzido de condrócitos e componentes de matriz extracelular na articulação. Esta mudança pode ter sido causada por IL-1 que é fator catabólico para a cartilagem e possivelmente foi produzida pelos condrócitos articulares (Yamamoto, 1994).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Avaliar as alterações da espessura da cartilagem articular (aspectos histológicos) em ratas em estro e ovariectomizadas, submetidas ao deslocamento posterior funcional da mandíbula;
- 2) Verificar os efeitos do tratamento com parecoxibe ou dexametasona nesses animais;
- 3) Avaliar a concentração das citocinas pro-inflamatórias IL1-beta e IL-6 nas condições acima.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Procedimentos experimentais

Foram realizados dois estudos, sendo que o primeiro observou os efeitos de dois anti-inflamatórios, parecoxibe e dexametasona, em ratas normais e com deslocamento posterior funcional da mandíbula (DPFM) em relação às alterações da espessura da cartilagem articular, aspectos histológicos e concentração das citocinas pro-inflamatórias IL1-beta e IL-6. O segundo experimento observou a influência da ovariectomia (OVX) sobre os parâmetros avaliados no primeiro experimento. O Quadro 1 mostra a distribuição dos grupos experimentais dos estudos 1 e 2.

Quadro 1. Distribuição dos Grupos experimentais dos dois estudos.

Grupo	Tratamento	Maloclusão	Ovariectomia
sem-DPFM	Solução NaCl 0,9% (controle)	Sem	Sem
	Parecoxibe (0,30mg/kg/i.m./dia)	Sem	Sem
	Dexametasona (0,1mg/kg/i.m./dia)	Sem	Sem
com-DPFM	Solução NaCl 0,9% (controle)	Com	Sem
	Parecoxibe (0,30mg/kg/i.m./dia)	Com	Sem
	Dexametasona (0,1mg/kg/i.m./dia)	Com	Sem
sem-DPFM+OVX	Solução NaCl 0,9% (controle)	Sem	Com
	Parecoxibe (0,30mg/kg/i.m./dia)	Sem	Com
	Dexametasona (0,1mg/kg/i.m./dia)	Sem	Com
com-DPFM+OVX	Solução NaCl 0,9% (controle)	Com	Com
	Parecoxibe (0,30mg/kg/i.m./dia)	Com	Com
	Dexametasona (0,1mg/kg/i.m./dia)	Com	Com

4.1.1 – Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia/UNICAMP em 26 de junho de 2006, sob número 1035-1 (Anexo 1).

4.2 – Fármacos

Os seguintes fármacos foram utilizados: parecoxibe 20mg/mL (Bextra® injetável, Laboratórios Pfizer), dexametasona 4mg/mL (Decadron® injetável, Laboratórios Eurofarma), cloridrato de quetamina 100mg/mL (Dopalen injetável, laboratórios Vetbrands), cloridrato de xilasina 100mg/mL (Anasedan injetável, laboratórios Vetbrands), além de solução salina estéril (NaCl a 0,9%).

4.3 - ESTUDO 1

4.3.1 – Animais

Foram utilizadas 36 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, SPF*****)¹, adultas (3 meses de vida), com peso entre 200 a 300g, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB-UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e passaram uma semana de adaptação ambiental após o transporte, antes do início do experimento. Foram mantidas em regime de água e alimentação *ad libitum*, todos os animais receberam ração triturado durante todo

¹ S.P.F. = Specific Pathogen Free – livre de 5 patógenos específicos.

experimento, 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.

4.3.2 - Exame colpocitológico

Todas as ratas foram submetidas à colheita da secreção vaginal, diariamente durante três semanas, visando à avaliação da função ovariana. O material colhido em lâminas histológicas foi fixado em uma solução de álcool-éter (1:1), corado pelo método de Harris-Shorr (Shorr, 1941) e analisado ao microscópio de luz.

Somente as ratas apresentando dois ou mais ciclos estrais consecutivos de quatro dias foram incluídas no estudo (Montes & Luque, 1988).

4.3.3 - Grupos experimentais

Para o grupo sem-DPFM foram utilizadas ratas em estro, ou seja, não foram submetidas à OVX, nem ao DPFM, e receberam 0,15mL de solução de NaCl 0.9% (controle), parecoxibe 0,30mg/kg e dexametasona 0,1mg/kg/im durante sete dias.

O grupo com-DPFM foi composto de ratas em estro, ou seja, não foram submetidas à OVX, mas eram submetidas ao DPFM. A indução da maloclusão foi feita pelo DPFM e, para tanto, um dispositivo confeccionado com fita para bandas ortodônticas (0,10 mm de espessura x 4,50 mm largura, marca Morelli) na forma de anel com 8mm de diâmetro aproximadamente, foi fixado com resina

fotopolimerizável (Fill Magic – Vigodent) nos incisivos superiores, segundo a técnica adaptada de Cholasueksa *et al.* (2004).

As Figuras 2 e 3 mostram a colocação do dispositivo oclusal. O procedimento foi realizado sob anestesia geral, via i.p., utilizando quetamina (Dopalen) 90mg/kg e xilazina (Anasedan) 10mg/kg, a oclusão distalizada foi confirmada por exame visual do relacionamento dos molares em oclusão, em animais anestesiados. Os animais do grupo com-DPFM receberam 0,15mL de solução de NaCl a 0,9% (controle), parecoxibe 0,30mg/kg e dexametasona 0,1mg/kg por via i.m. pelo período de sete dias.

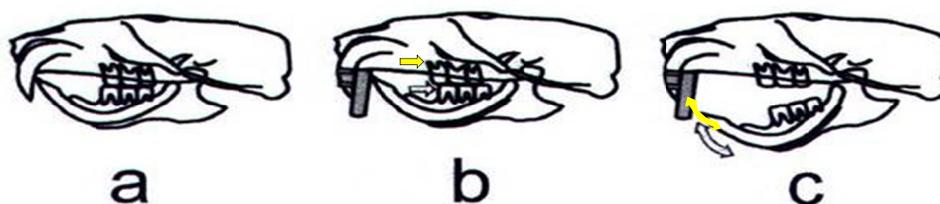


Figura 2. a - oclusão cêntrica; b - ratos com dispositivo oclusal; c - movimento de abertura. Adaptado de Cholasueksa *et al.* (2004).



Figura 3. Dispositivo posicionado nos dentes incisivos superiores do animal.

4.3.4 – Peso dos Animais

As ratas do grupo sem-DPFM foram pesadas no início do tratamento (peso inicial) e sete dias depois no final do tratamento (peso final). As ratas do grupo com-DPFM foram pesadas no dia da instalação do dispositivo para indução do DPFM (peso inicial) e 14 dias após a indução (peso final).

4.3.5 – Tratamentos

Após sete dias da instalação do dispositivo oclusal, todos os animais (Grupos sem-DPFM e com-DPFM) foram submetidos ao tratamento com os fármacos em estudo, sendo as administrações feitas por via intramuscular (im) durante sete dias, uma vez ao dia. Os animais foram mortos por meio de asfixia com gás carbônico, todos os animais foram mortos com o mesmo tempo de vida. Decorrido este período, 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 realizada a descalcificação da estrutura em solução de EDTA a 7%, 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 imunoenensaio (ELISA).

4.3.6– Processamento histológico

Após a descalcificação, a ATM foi lavada em água destilada, desidratada em etanol 70%, 95% e 100%, diafanizada em xilol e embebida/incluída em parafina a 65°C. Após, foram feitos nove cortes seriados de 6 µm em micrótomo manual (LEICA, RM 2145), os quais foram colhidos em lâminas histológicas, desparafinizados, hidratados e corados por Hematoxilina-Eosina (HE) para análise da estrutura geral da ATM (Michalani, 1980). Os cortes foram feitos coronalmente, no sentido anteroposterior, no centro do côndilo.

Foram feitas fotomicrografias dos cortes histológicos por meio de um fotomicroscópio (Eclipse E800, Nikon) e sistema fotográfico Nikon (FDX-35), empregando-se objetivas de 5 e 10 vezes em iluminação convencional.

As lâminas foram analisadas utilizando o sistema Image Pro-plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics). As imagens foram gravadas com uma câmera fotográfica (CoolSNAP-Pro Color - Roper Scientific Photometrics) adaptada ao microscópio, utilizando uma objetiva de 10 vezes. A Figura 4 mostra a região analisada e a morfometria realizada. A área da cartilagem articular (tecido conjuntivo denso, camada proliferativa e a fibrocartilagem) do côndilo foi medida quantitativamente, em pixels, utilizando-se o software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc)

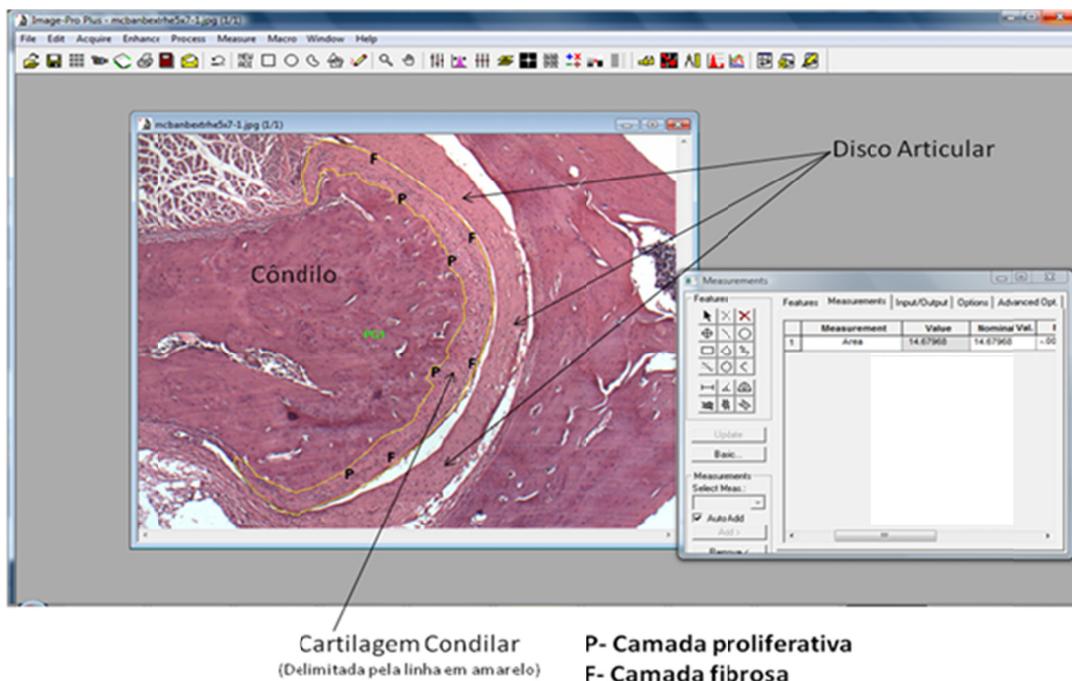


Figura 4. Método de quantificação da cartilagem articular.

4.3.7 Imunoensaio

A avaliação das citocinas pró-inflamatórias IL1-beta e IL-6 foi feita por meio do teste ELISA de captura. Os níveis dessas foram avaliados no sobrenadante após a trituração e extração celular.

Para este teste, foram utilizadas placas de 96 poços, as quais foram cobertas com 100 μ L/poço com anticorpo de captura para IL-6 (100 μ g/mL, Peprotech Inc.) ou anticorpo de captura para IL1-beta (200 μ g/mL, Peprotech Inc.), as quais foram deixadas à temperatura ambiente *overnight*. No dia seguinte, as placas foram lavadas em solução de Tween-20 a 0,05% em PBS (tampão

fosfato em salina, Sigma®) três vezes com tampão de lavagem apropriado, e então foram adicionados 300µL de tampão de bloqueio 1% BSA (albumina sérica bovina, Sigma®) em PBS para cada poço. As placas foram incubadas com esse tampão por 1 hora, em temperatura ambiente para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos.

Após este procedimento, as placas foram novamente lavadas, sendo acrescentados 100µL das amostras (diluídas 1:2) ou de uma solução-padrão (1µg/mL, Peprotech Inc.), a qual era diluída em nove concentrações (10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31, 0,15, 0,07, 0,03, 0ng/mL) por poço. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas. Após este período, as mesmas foram lavadas como descrito anteriormente e foram adicionados 100µL dos anticorpos de detecção nas concentrações de 0,25 µg/mL para a IL-6 e 0,5µg/mL para IL1-beta em cada poço, sendo que as placas foram incubadas em temperatura ambiente por mais 2 horas.

Em seguida, as placas foram novamente lavadas, acrescentados 100µL da solução de avidina-peroxidase conjugada em cada poço e incubadas por 30 minutos. Após nova lavagem, foram adicionadas 100 µL de solução para substrato – ABTS (solução de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico, Sigma®) para ELISA. A placa foi mantida em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor e, em seguida, a reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405nm com correção de 650nm.

A Figura 5 mostra as curvas de calibração obtidas em função das interleucinas pró-inflamatórias utilizadas no estudo. Na figura é possível observar as equações e os índices de correlação linear (R^2) das retas de regressão.

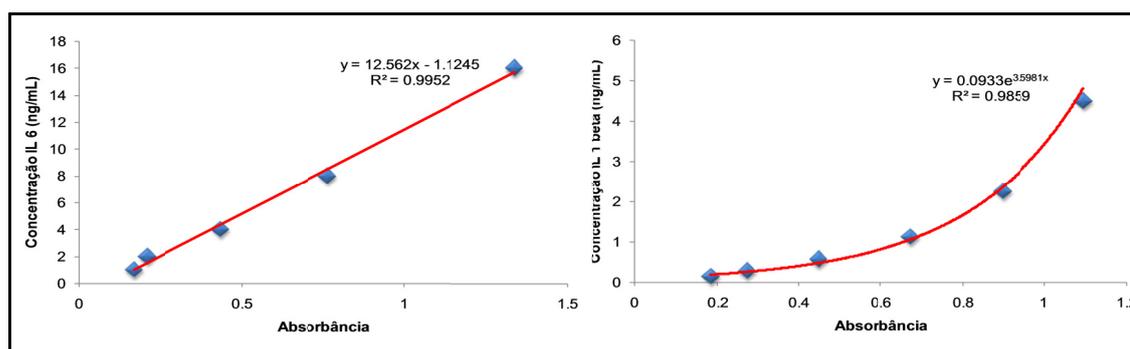


Figura 5. Curvas de calibração do imunoenensaio (ELISA) das citocinas pró-inflamatórias IL1-beta (direita) e IL-6 (esquerda).

As curvas apresentaram uma correlação satisfatória ($R^2 > 0,95$) indicando que as relações foram confiáveis.

4.4 - ESTUDO 2

Este estudo observou o efeito dos anti-inflamatórios parecoxibe e dexametasona sobre a ATM de ratas ovariectomizadas, e sem e com deslocamento posterior funcional da mandíbula.

4.4.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas 36 ratas, as quais foram ovariectomizadas (OVX) e divididas em dois Grupos (Grupos sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX) com 18 animais cada. A indução do DPFM no grupo com-DPFM+OVX foi feita da mesma forma já relatada para o Grupo com-DPFM.

4.4.2 Ovariectomia (OVX)

Após a análise do ciclo estral, dentre as ratas apresentando ciclos estrais regulares a OVX foi feita bilateralmente, sob anestesia geral via intraperitoneal, utilizando quetamina (Dopalen) 90mg/kg e xilazina (Anasedan) 10mg/kg, e teve como finalidade eliminar a produção gonadal de esteroides, produzindo um estado permanente de insuficiência estrogênica.

Foi realizada analgesia, no período pós-operatório imediato, com a administração de cloridrato de meperidina em dose única de 2mg/kg/animal, por via intramuscular (Latt, 1976).

4.4.3 Exame colpocitológico

Para a verificação do estado hormonal após a cirurgia, as ratas foram submetidas à colheita de secreção vaginal, foi realizado o exame colpocitológico nos 15 dias que sucederam a cirurgia. Somente as ratas que apresentaram esfregaços vaginais de padrão atrófico por 15 dias consecutivos foram incluídas no experimento.

4.4.4 Peso dos Animais

As ratas do grupo sem-DPFM+OVX foram pesadas no dia da OVX (peso inicial) e 28 dias após a OVX no final do tratamento (peso final). As ratas do grupo com-DPFM+DPFM foram pesadas no dia da OVX (peso inicial) e 35 dias após a OVX no final do tratamento (peso final).

4.4.5 Tratamentos

Após 21 dias da castração e sete dias da instalação do dispositivo oclusal, todos os animais dos Grupos sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX foram submetidos ao tratamento com os fármacos em estudo, sendo as administrações também feitas pelas mesmas vias e períodos de tempo descritos anteriormente. Após o período descrito, as ATM foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos anteriormente e todos os animais foram mortos no mesmo tempo.

4.5 - ANÁLISE DOS DADOS

Os testes da normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilks) e a da equivalência das variâncias (teste de Levene) mostraram que nenhuma variável apresentou normalidade e algumas das variâncias não mostraram homocedasticidade, mesmo após transformação dos dados. Assim, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (*post hoc*). O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados com os pacotes estatísticos BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá Belém, PA) e Prism 5.0 (GraphPad Software Inc).

5 RESULTADOS

Massa corporal

A alteração da massa corporal dos animais em estudo é mostrada na

Gráfico 1.

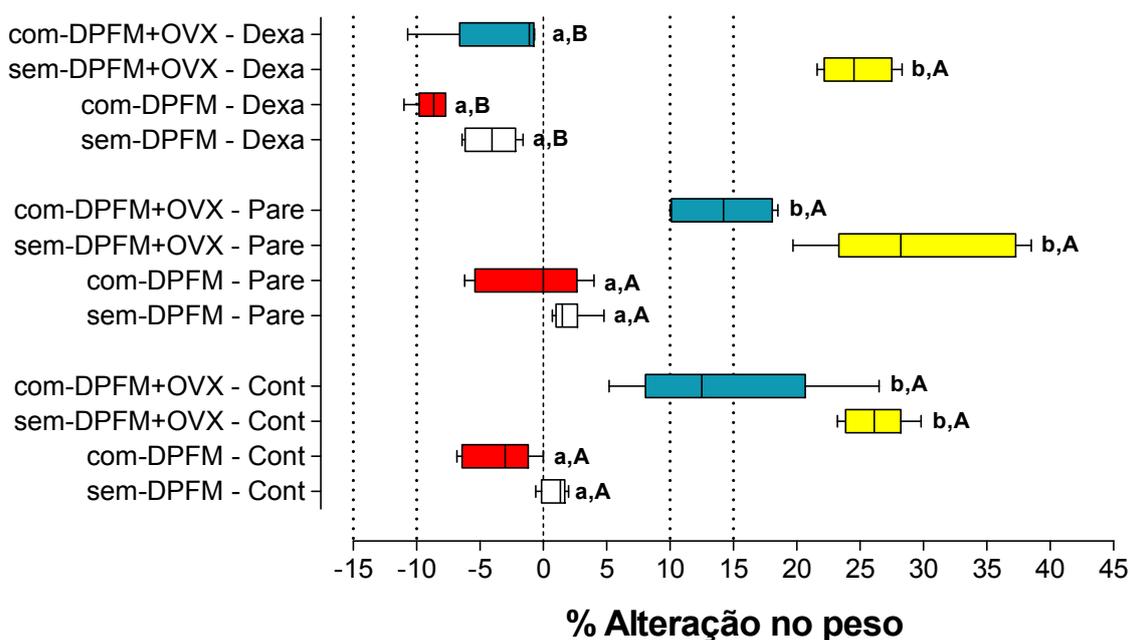


Gráfico 1. Alteração da massa corporal (em porcentagem). A linha central representa a mediana; a caixa, os quartis e as suíças, os valores máximo e mínimo. As letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) entre os GRUPOS. Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) entre os TRATAMENTOS considerando um mesmo Grupo. Cont= Controle; Pare=Parecoxibe; Dexa=Dexametasona.

Foi possível observar que houve tendência para as ratas ovariectomizadas em ganhar mais peso do que aquelas não submetidas à ovariectomia. Dentre as

ratas não ovariectomizadas, a dexametasona causou redução do peso corporal, quando comparada com os animais que receberam parecoxibe ou do Grupo controle. As ratas submetidas ao deslocamento posterior funcional da mandíbula que receberam dexametasona e foram submetidas à ovariectomia, perderam peso em relação aquelas ovariectomizadas que receberam parecoxibe ou controle.

Morfometria

Um espécime de cada grupo é mostrado na prancha (Anexo2), considerando a coloração com hematoxilina-eosina, para os grupos estudados.

O Gráfico 2 mostra as medianas obtidas para a área da cartilagem articular.

Nos animais do grupo sem-DPFM, o parecoxibe e a dexametasona diminuíram significativamente ($p < 0,05$) a área da cartilagem articular em relação ao controle. No Grupo com-DPFM, a dexametasona diminuiu a área quando comparada ao parecoxibe, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre a dexametasona ou parecoxibe em relação ao controle. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos em relação à área, considerando os Grupos sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as áreas da cartilagem articular dos grupos quando considerados os animais tratados com dexametasona e controle separadamente. Entretanto, nos animais tratados com o parecoxibe foi possível observar aumento da área no Grupo com-DPFM, em relação aos Grupos sem-DPFM, sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX.

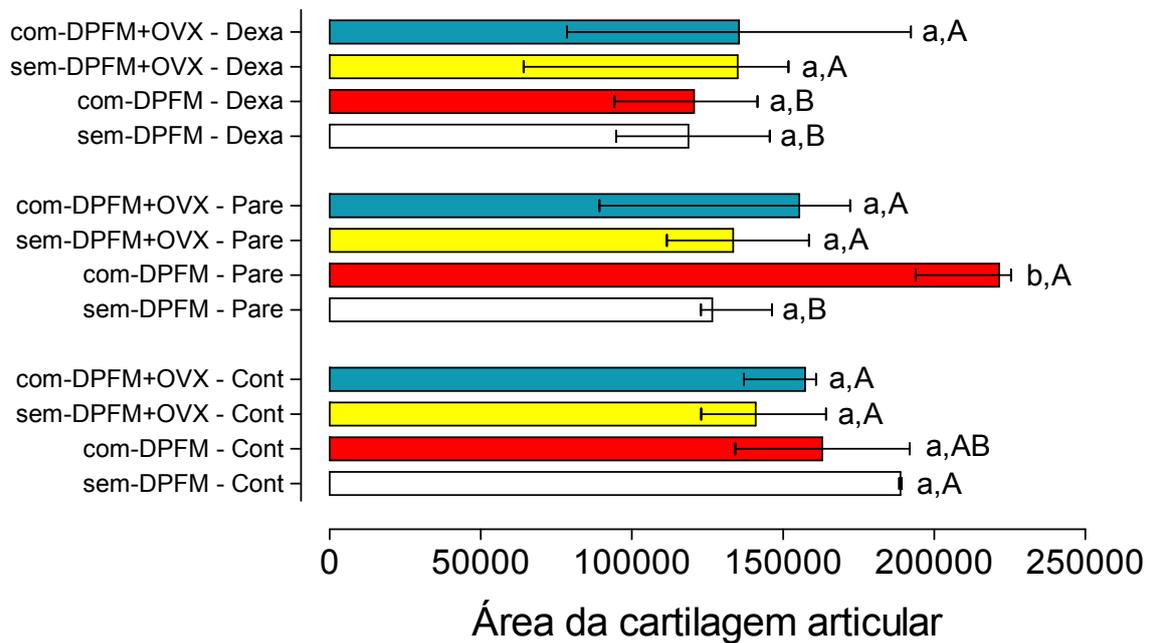


Gráfico 2. Medianas (desvio interquartil) obtidas pela morfometria da área da cartilagem articular. As letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significantes entre os GRUPOS. Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significantes entre os TRATAMENTOS considerando um mesmo grupo. Cont= Controle; Pare=Parecoxibe; Dexa=Dexametasona.

Imunoensaio

Os Gráficos 3 e 4 mostram, respectivamente, as medianas (desvio interquartil) das citocinas pró-inflamatórias IL1-beta e IL-6, obtidas por meio do teste ELISA de captura.

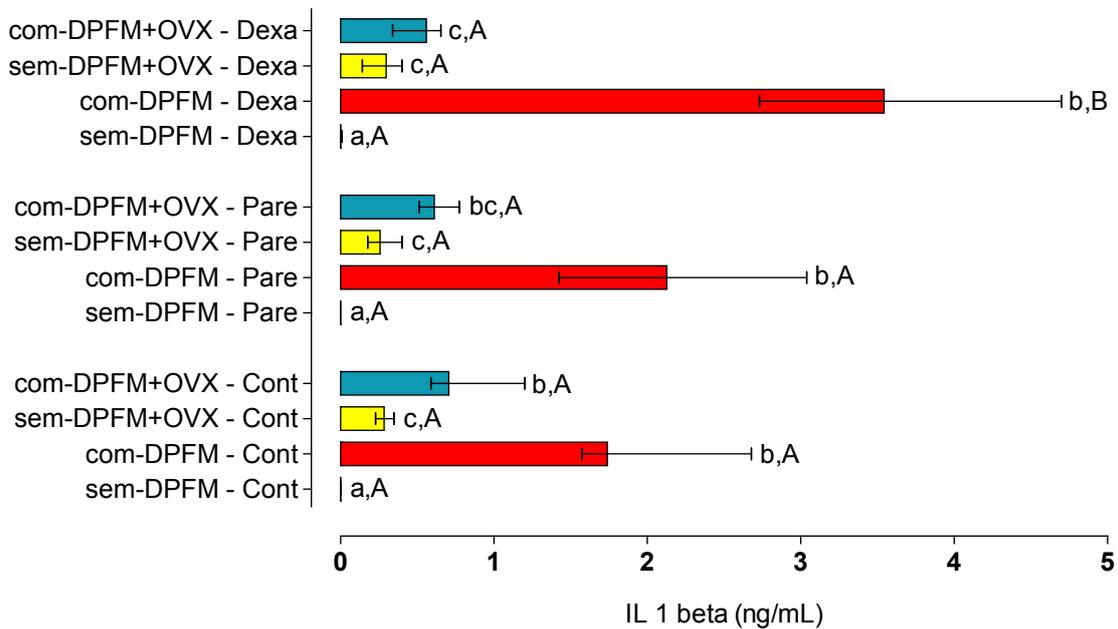


Gráfico 3. Concentração de IL1-beta (mediana e desvio interquartílico) de acordo com os grupos em estudo e tratamentos. As letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significantes entre os GRUPOS. Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significantes entre os TRATAMENTOS considerando um mesmo grupo. Cont= Controle; Pare=Parecoxibe; Dexa=Dexametasona.

A concentração de IL1-beta no Grupo sem-DPFM não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos (controle x parecoxibe x dexametasona). Entretanto, considerando isoladamente o Grupo com-DPFM, a concentração desta interleucina foi maior (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) nos animais tratados com dexametasona quando comparados com os animais tratados com parecoxibe e controle, sendo que entre esses dois tratamentos não houve diferença. Nos Grupos sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX não houve diferenças

($p > 0,05$) entre os tratamentos realizados considerando cada grupo isoladamente. A comparação entre os Grupos mostrou que aquele sem-DPFM apresentou a menor concentração e os Grupos com-DPFM e com-DPFM+OVX apresentaram a maior concentração desta interleucina, considerando o controle. Para os animais tratados com parecoxibe, o Grupo sem-DPFM mostrou menor concentração que os demais Grupos, sendo que o com-DPFM apresentou maior nível de IL1-beta que o Grupo sem-DPFM+OVX, mas não houve diferenças estatisticamente significantes entre os Grupos sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX, e nem entre os grupos com-DPFM e com-DPFM+OVX controle. Nos animais submetidos à dexametasona, os Grupos sem-DPFM e com-DPFM apresentaram, respectivamente, a menor e a maior concentração de IL1-beta que os demais Grupos, os quais não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si.

A concentração de IL-6 não foi afetada pelos tratamentos (controle, parecoxibe e dexametasona) em nenhum dos quatro grupos. Entretanto, a comparação entre os grupos revelou que o Grupo com-DPFM apresentou maior concentração de IL-6, considerando todos os tratamentos. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os Grupos sem-DPFM, sem-DPFM+OVX e com-DPFM, considerando os tratamentos "controle" e "parecoxibe". O tratamento "dexametasona" mostrou menor nível da interleucina para o Grupo sem-DPFM+OVX em relação ao Grupo com-DPFM, mas não houve diferenças estatisticamente significantes entre os Grupos com-DPFM+OVX e sem-DPFM e nem entre os Grupos sem-DPFM e sem-DPFM+OVX.

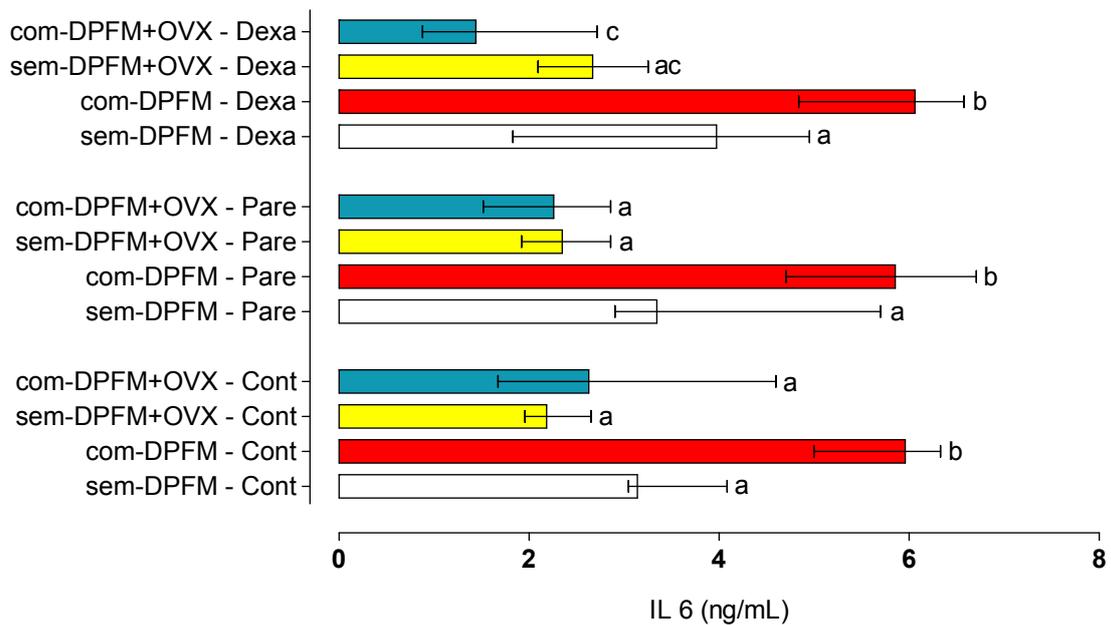


Gráfico 4. Concentração de IL-6 (mediana e desvio interquartil) de acordo com os Grupos em estudo e tratamentos. As letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significantes entre os GRUPOS.

6 DISCUSSÃO

MASSA CORPORAL

Modelos de estudo sobre alterações oclusais em animais, particularmente em ratos, a associação da maloclusão e massa corporal são descritos na literatura (Ulgen *et al.*, 1997; Kiliaridis *et al.*, 1999; Rabie *et al.*, 2001; Fuentes *et al.*, 2003; Muto *et al.*, 2003; Rabie *et al.*, 2003; Stockistill *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). No presente estudo, foi utilizado o modelo experimental adaptado daquele descrito originariamente por Cholasueksa *et al.* (2004). Este modelo utiliza o deslocamento posterior funcional da mandíbula como indutor da DTM. Li *et al.*, 2010 também descreveram um modelo de DTM baseado no aumento bilateral da dimensão vertical. Estes autores observaram que não houve diminuição do peso dos ratos submetidos ao modelo. Entretanto, Kerins *et al.* (2005) mostraram redução no número e duração das refeições em animais submetidos à DTM utilizando outro método diferente por nós utilizado, possivelmente mais agressivo (injeção de CFA).

No presente estudo, os animais do Grupo com deslocamento posterior funcional da mandíbula (com-DPFM) não tiveram seu peso corporal alterado em relação ao grupo sem-DPFM, provavelmente porque a função dos dentes posteriores e a dimensão vertical foram preservadas. Este fato foi observado por Farias-Neto *et al.* (2011) tendo utilizado o mesmo dispositivo adotado no presente estudo. Cholasueksa *et al.* (2004) também não encontrou diferenças no peso dos animais, sendo que estes autores não verificaram o atrito das bordas incisais dos

incisivos durante os 14 dias da utilização do dispositivo oclusal e os animais foram capazes de ocluir os dentes posteriores, além de abrir e fechar a mandíbula. Uma vez que os movimentos mandibulares estavam preservados, a adaptação fisiológica nos animais do presente estudo, bem como naqueles relatados por Farias-Neto *et al.* (2011) e Cholasueksa *et al.* (2004), foi rápida, colaborando para que os animais não perdessem peso. Além disso, Simonić-Kocijan *et al.* (2009) observaram que o stress crônico e a maloclusão não seriam capazes de alterar o comportamento nociceptivo de animais, sendo a dor uma das causas de limitação no ganho de peso (Kerins *et al.*, 2005).

A insuficiência de estrogênio, como aquela induzida nas ratas do Grupo sem-DPFM+OVX, pode provocar um aumento de até 25% no peso dos animais, com o conseqüente estímulo da função mastigatória, o que pode proteger a mandíbula da perda de sua integridade estrutural (Elovic *et al.*, 1995). Este aumento de peso seria um mecanismo de compensação frente à supressão de estrogênio, causando aumento do apetite nas ratas. Assim, como esperado, houve aumento de peso nos animais do Grupo sem-DPFM+OVX, em relação ao Grupo sem-DPFM. Este dado está em acordo com aqueles descritos na literatura, os quais mostram maior ganho de peso em ratas ovariectomizadas (Wronski *et al.*, 1987; Wronski *et al.*, 1988; Eckel, 2011).

Os animais do Grupo com-DPFM+OVX apresentaram peso semelhante aquele do Grupo sem-DPFM+OVX, mostrando que o deslocamento posterior funcional da mandíbula teve pouca influência no peso frente à ovariectomia.

Além dos efeitos metabólicos, vários estudos observaram uma diminuição do peso corporal, dose-dependente, em animais tratados com glicocorticoides sintéticos (De Vries *et al.*, 2002; Komamura *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2004; Ahtikoski *et al.*, 2004; Coderre *et al.*, 2007; Kaasik *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2007). Tem sido também identificado um aumento da síntese e secreção de leptina (substância que regula a ingestão de alimentos e o gasto energético, ativando o centro de saciedade do hipotálamo) em seres humanos com *síndrome de Cushing* (Masuzaki *et al.*, 1997), o que poderia estar ligado à diminuição de peso em sujeitos com *hipercortisolismo* ou com uso crônico de medicamentos que contenham dexametasona.

A perda de peso é, normalmente, acompanhada por atrofia muscular e diminuição de uma série de proteínas na musculatura esquelética, que acabam por comprometer a função muscular (De Vries *et al.*, 2002; Komamura *et al.*, 2003; Ahtikoski *et al.*, 2004, Lumbers *et al.*, 2005; Kaasik *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2007). No presente estudo, os Grupos sem-DPFM, com-DPFM e com-DPFM+OVX, que receberam tratamento com a dexametasona tiveram redução significativa de peso, sendo que este efeito foi neutralizado no Grupo sem-DPFM+OVX. O ganho no peso nos animais deste grupo pode ter sido induzido pela insuficiência estrogênica que poderia ter neutralizado o efeito da dexametasona. Curiosamente, o tratamento com este corticoide nos animais submetidos à combinação entre deslocamento posterior funcional da mandíbula e a ovariectomia levou à perda de peso nas ratas. Não existem dados na literatura a respeito deste achado. Assim, o

tratamento com a dexametasona durante sete dias foi determinante na perda de peso corporal, sendo que a ovariectomia causou aumento no peso dos animais.

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA ATM

A cabeça da mandíbula tem papel funcional importante durante a dinâmica da mastigação, recebendo cargas mecânicas decorrentes dos esforços oclusais. A cartilagem da cabeça da mandíbula não tem relação com o peso corporal, mas resulta da carga de forças aplicadas aos dentes durante a oclusão (Boyd *et al.*, 1990), à qual varia de acordo com a consistência da dieta alimentar (Kiliiridis *et al.*, 1999). No presente estudo, a dieta alimentar foi padronizada para todos os animais, diminuindo, assim, a influência desta variável, embora tenham sido verificadas diferenças no ganho de peso nas ratas submetidas aos diversos procedimentos.

Além disso, estudos em animais mostraram que a ATM é uma estrutura dinâmica, a qual é capaz de se adaptar ao estresse biomecânico (Milam & Schmitz, 1995), sendo que esta capacidade adaptativa é individual e provavelmente causada por variações genéticas. Essa característica permite ao sistema mastigatório continuar funcionando quando ocorre perda ou dano tecidual (Gelb & Gelb, 1989; Imirzalioglu *et al.*, 2005) e poderia explicar a ausência de alterações morfológicas significativas, verificada neste estudo nos animais submetidos ao deslocamento posterior funcional da mandíbula quando em comparação com os animais que não tinham alterações oclusais. No entanto, os animais que sofreram

a indução do deslocamento posterior funcional da mandíbula e receberam tratamento com parecoxibe (com-DPFM+pare) tiveram um aumento na espessura da cartilagem articular quando comparados aos animais tratados com dexametasona ou controle no mesmo grupo. Esse resultado é similar àqueles observados por Mastbergen *et al.* (2006). Esses autores observaram *in vitro* que a inibição seletiva da COX-1 causava efeitos adversos diretos sobre o tecido da cartilagem articular humana, inibindo a síntese de proteoglicanos. Já os AINEs seletivos para COX-2, além de não produzirem efeitos adversos sobre a cartilagem articular, apresentaram propriedade reparadora da cartilagem, aumentando a síntese de proteoglicanos e normalizando sua liberação.

A função mastigatória prejudicada pode resultar na diminuição do tamanho da cabeça da mandíbula, em mudanças na espessura da cartilagem articular e/ou outras alterações morfológicas e histológicas (Kiliaridis *et al.*, 1999). O deslocamento posterior funcional da mandíbula diminui a espessura da cartilagem articular (Fuentes *et al.*, 2003) e a camada de células proliferativas (Cholasueksa *et al.*, 2004), enquanto que o deslocamento protrusivo prolongado da mandíbula aumentaria o número de replicações celulares na ATM (Rabie *et al.*, 2003). Cholasueksa *et al.* (2004) observaram, de modo similar ao presente estudo, que no 14º dia após a instalação do dispositivo havia uma adaptação do tecido da cartilagem, havendo paralisia do processo de remodelação na região do côndilo da mandíbula. O presente estudo avaliou os animais no 14º dia não encontrando diferenças entre os animais sem e com DPFM. A avaliação dos animais em

períodos de tempo menores, entre quatro e sete dias, por exemplo, poderia revelar diferenças na remodelação, como observado por Cholasueksa *et al.* (2004).

Vários estudos têm sido reportado a influência da deficiência de estrogênio na ATM (Elovic *et al.*, 1995; Abubaker *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998; Yamashiro & Yamamoto, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Yasuoka *et al.*, 2000). Entretanto, não há um consenso claro na literatura sobre o papel dessa deficiência.

Em concentrações fisiológicas, o estrogênio tem participação importante na remodelação das ATM, particularmente da cartilagem articular (Yasuoka *et al.*, 2000). Um aumento na expressão de estrogênio predispõe o desenvolvimento das DTM e sua deficiência leva a um aumento da remodelação óssea, com consequente aumento do desequilíbrio do processo de aposição/reabsorção óssea (Abubaker *et al.*, 1996). Este processo é complexo e depende da interação entre reguladores bioquímicos e mecânicos. No presente estudo, a ovariectomia não induziu alterações significativas na espessura da cartilagem articular e zona proliferativa da cabeça da mandíbula, confirmando os relatos de Abubaker *et al.* (1996). Talwar *et al.* (2006) mostraram que o estrogênio diminui a espessura da cartilagem articular pela inibição da proliferação e aumento na maturação de condrócitos. Entretanto, não encontramos diferenças na espessura da cartilagem articular e camada proliferativa entre as ratas dos Grupos sem-DPFM, sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX, mostrando que a ovariectomia e a alteração

oclusal não interferiram no processo adaptativo, preservando a estrutura morfológica da articulação temporomandibular.

Embora neste estudo tenham sido utilizadas ratas, esses animais apresentam como vantagem, assemelhando-se aos seres humanos em vários aspectos, como por exemplo, em relação às alterações no tecido ósseo após ovariectomia (Dustan & Boyce, 1997). Aos três meses de idade, as ratas já alcançam sua maturidade sexual e são capazes de responder à deficiência de hormônios sexuais provocada pela ovariectomia (Omi & Ezawa, 1995).

Os animais do Grupo sem-DPFM+OVX, não apresentaram diferenças com o Grupo sem-DPFM, em relação à espessura da área da cartilagem articular e camada proliferativa. Uma possível alteração destas estruturas induzida pela deficiência estrogênica pode ter sido compensada pelo aumento da função mastigatória, sendo que as ratas ovariectomizadas tiveram aumento de peso e, conseqüentemente, maior atividade mastigatória. Como resultado da função mastigatória, em condições de carga normal fica garantida a remodelação do osso mandibular na ATM (Hill & Orth, 1998). Com base neste conceito, Tanaka *et al.* (2000) demonstraram que a deficiência de estrogênio provocou perda óssea em diferentes regiões específicas da ATM, sendo menor na porção que recebia maior carga oclusal, resultado da ação da carga mastigatória mais intensa e, conseqüentemente, supressão da reabsorção e redução do efeito provocado pela deficiência do estrogênio, confirmando os achados do presente estudo.

INTERLEUCINAS

As citocinas predominantemente envolvidas nos processos degenerativos intra-articulares são IL1-beta e IL-6 (Milam *et al.*, 1998). No presente estudo houve um aumento no nível das interleucinas IL1-beta e IL-6 no Grupo com-DPDM em relação ao Grupo sem-DPDM, mostrando que o deslocamento posterior funcional da mandíbula teve um papel importante no aumento da concentração dessas interleucinas. Algumas interleucinas foram previamente associadas com a destruição do tecido conjuntivo da ATM, à disfunção desta estrutura e aos sintomas clínicos da disfunção (Emshoff *et al.*, 2000). O estímulo mecânico patológico poderia causar aumento no nível de IL1-beta (Nishimura *et al.*, 2002), sendo esta a principal interleucina pró-inflamatória, a qual pode acentuar a atividade catabólica de muitas células, tais como condrócitos e fibroblastos (Livne *et al.*, 1997). Algumas citocinas são também capazes de estimular a proliferação de sinoviócitos (van Leeuwen *et al.*, 1995; Kacena *et al.*, 2001). Lai *et al.* (2006) observaram que o aumento da expressão de IL1-beta na ATM de camundongos adultos causou disfunção e dor articular.

A IL-6 é produzida pela ação da TNF-alfa e IL1-beta, as quais são secretadas pelos sinoviócitos (Kacena *et al.*, 2001). É uma interleucina com atuação tanto na resposta imune-inata como na resposta adaptativa, sendo sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos (Souza *et al.*, 2008). Esta interleucina é normalmente expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores

estressantes (Ersheler & Keller 2000). A IL-6 estava presente mesmo nos animais do Grupo sem-DPFM, indicando que outros fatores, além da disfunção oclusal, como o estresse, por exemplo, podem ter influenciado na concentração da mesma.

Esta interleucina pró-inflamatória também é correlacionada com a degradação da cartilagem e remodelação/reabsorção óssea, podendo ativar diretamente osteoclastos (van Leeuwen *et al.*, 1995; Kacena *et al.*, 2001). Embora estivesse aumentada nos animais do Grupo com-DPFM, nestes animais não foram observadas degradações significativas da cartilagem e nem processos de remodelação/reabsorção intensos, indicando, que o aumento desta interleucina possa ter sido ocasionado por outros fatores.

Não houve diferenças significativas entre os Grupos sem-DPFM, sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX, em relação à IL-6. Entretanto, houve aumento significativo do nível da IL1-beta, nas ratas dos Grupos sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX, em relação àquelas do Grupo sem-DPFM, confirmando que a deficiência de estrogênio pode aumentar o nível desta interleucina. Existem evidências de que o estrógeno atua sobre os monócitos promovendo a redução dos níveis de IL-1 (Pacifici *et al.*, 1989) e TNF-alfa (Pacifici *et al.*, 1990). Além disso, a ligação da TNF-alfa ao receptor p55-TNF-alfa de células T, induziria a liberação de M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) e RANKL (ligante do receptor ativador de fator nuclear- κ B), sendo que estes fatores promovem a fusão dos progenitores de osteoclastos (Cenci *et al.*, 2000). O aumento da IL1-beta, em ratas ovariectomizadas, também observado no presente estudo, estimula

a produção de outros fatores, tais como o GM-CSF, os quais promovem a fusão de células precursoras dos osteoclastos, apesar do aumento das interleucinas, não foram observadas alterações morfológicas .

Desta forma, o estrógeno inibiria, de forma indireta, a formação de osteoclastos (Pacifci, 1996). Embora os níveis de M-CSF e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos) não tenham sido medidos, é possível que a atividade osteoclástica estivesse preservada nos animais dos grupos sem-DPFM, sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX. Curiosamente, o nível da IL-6 não mostrou diferença significativa entre os Grupos sem-DPFM+OVX e com-DPFM+OVX, indicando que o deslocamento posterior funcional da mandíbula não foi capaz de causar um aumento ainda maior no nível desta interleucina, confirmando que a deficiência de estrogênio induzida pela ovariectomia atenuou esse aumento no grupo com-DPFM+OVX; o deslocamento posterior funcional da mandíbula foi o fator mais importante para aumentar a concentração desta interleucina. Entretanto, a principal interleucina pró-inflamatória (IL1-beta) teve sua concentração aumentada no Grupo com-DPFM+OVX em relação ao grupo sem-DPFM+OVX, indicando efeito adicional do deslocamento posterior funcional da mandíbula sobre esta interleucina.

INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS

É indicado para o tratamento das sinovites e capsulites, particularmente da forma aguda, aliviando os efeitos da inflamação de maneira imediata, prevenindo o desenvolvimento de fibrose na cápsula articular e também prevenindo ou minimizando o desenvolvimento da osteoartrite. Nestes quadros ocorre diminuição do movimento e da capacidade de absorver choques, induzindo maior dano aos tecidos envolvidos (McIlwraith, 2002). Desta forma, este fármaco foi escolhido no presente estudo, pois é uma alternativa terapêutica considerada para o tratamento de DTM. Além disso, é apresentado na forma injetável, diminuindo as possíveis interferências de outras vias de administração no efeito do fármaco, além de permitir uma melhor comparação com a dexametasona, a qual também foi utilizada de forma injetável neste estudo.

No tratamento das inflamações articulares, vários tipos de corticosteroides têm sido utilizados, tais como a prednisolona, metilprednisolona e betametasona, mas com maior preferência pela dexametasona (El-Hakim *et al.*, 2005) e, por isso, a dexametasona foi escolhida no presente estudo.

Os níveis de IL-6 não foi afetado pelos tratamentos realizados com parecoxibe e dexametasona, indicando que, de uma maneira geral, estes fármacos não foram capazes de interferir com o processo de formação dessa interleucina. Entretanto, nos animais do Grupo com-DPFM, o nível dessa interleucina teve um aumento significativo, independentemente do tratamento a que era submetido.

Nesses animais do Grupo com-DPFM, tratados com a dexametasona, os níveis de IL1-beta eram ainda maiores quando comparados aos outros tratamentos.

Um estudo, realizado por Kerins *et al.* (2005), mostrou que a dexametasona, (via i.p), atenuou os efeitos nocivos da inflamação na ATM de ratos (induzida pela injeção de CFA). Não existem evidências na literatura de que a administração oral ou intramuscular de dexametasona possa interferir com os níveis de interleucinas na ATM, mas animais medicados com este fármaco, em injeção única intra-articular sofrem reabsorção com atividade osteoclástica ativa na superfície do côndilo mandibular, a partir da sexta semana, piorando o estado inflamatório (El-Hakim *et al.*, 2005). Além disso, o relato de Hata *et al.* (2009) mostrou que a administração de altas doses (60mg/dia) de prednisolona em uma paciente com trombocitopenia idiopática causou sérios danos à sua ATM. Assim, é possível que a dexametasona possa induzir alterações na articulação quando administrada durante sete dias. Entretanto, nos animais ovariectomizados, estes anti-inflamatórios foram capazes de diminuir os efeitos do deslocamento posterior funcional da mandíbula sobre os níveis de IL1-beta.

Os animais tratados com parecoxibe ou dexametasona sofreram alterações na morfologia articular (diminuição da espessura da cartilagem articular) no grupo sem-DPFM em comparação ao controle do mesmo grupo. Esta diminuição nos animais tratados com dexametasona pode estar associada à perda de peso e conseqüentemente uma diminuição da carga mastigatória. Nos animais tratados com parecoxibe não encontramos na literatura algo que possa justificar essa

diminuição e ao associarmos o DPFM+PARE os animais desse grupo tiveram um aumento na área de cartilagem articular, sendo que os AINEs seletivos para COX-2, além de não produzirem efeitos adversos sobre a cartilagem articular, apresentaram propriedade reparadora da cartilagem, aumentando a síntese de proteoglicanos e normalizando sua liberação (Mastbergen *et al.*, (2006).

8 CONCLUSÕES

Com base nos achados do presente estudo, foi possível concluir que:

- 1) A área da cartilagem articular não foi influenciada pelo deslocamento posterior funcional da mandíbula, mas exibiu um aumento quando houve associação entre o deslocamento posterior funcional da mandíbula e o parecoxibe;
- 2) Os anti-inflamatórios parecoxibe e dexametasona não interferiram com os níveis de concentrações das IL1-beta e IL-6;
- 3) O deslocamento posterior funcional da mandíbula causou um aumento das concentrações das interleucinas pró-inflamatórias IL1-beta e IL-6, sendo que nas ratas com o deslocamento, mas ovariectomizadas, foi observado uma atenuação das concentrações dessas interleucinas.

REFERÊNCIAS

1. Abubaker AO, Hebda PC, Gunsolley JN. Effects of sex hormones on protein and collagen content of the temporomandibular joint disc of the rat. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54:721-27.
2. Ahtikoski AM, Riso EM, Koskinen SO, Risteli J, Takala TE. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. *Eur J Physiol.* 2004; 448(1): 123-130.
3. Andrade E. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia.* 2.ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006.
4. Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci Lond.* 1999 May; 96(5):513-23.
5. Boyd RL, Gibbs CH, Mahan PE, Richmond AF, Laskin JL. Temporomandibular joint forces measured at condyle of *Macaca arctoides*. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1990 Jun; 97(6):472-9.
6. Brentani MM, Feldman J. Receptores esteroídicos. In: Rodrigues de Lima G, Baracat EC Eds. *Ginecologia endócrina.* São Paulo: Ateneu; 1995.
7. Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain--basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil.* 2010 May;37(6):391-410.
8. Carlsson GE. Masticatory efficiency: the effect of age, the loss of teeth and prosthetic rehabilitation. *Int Dental J.* 1984; 4:93-97.
9. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest.* 2000; 106:1229-37.
10. Cholasueksa P, Warita H, Soma K. Alterations of the rat temporomandibular joint in functional posterior displacement of the mandibule. *Angle Orthodontist.* 2004; 74(5):677-683.
11. Coderre L, Vallega GA, Pilch PF, Chipkin SR. Regulation of glycogen concentration and glycogen synthase activity in skeletal muscle of insulin-resistant rats. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Aug; (1)464:144-50.

12. de Leeuw R. Internal derangements of the temporomandibular joint. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2008 May;20(2):159-68.
13. De Vries WB, *et al.* Alterations in adult rat heart after neonatal dexamethasone therapy. *Pediatr Res.* 2002; 52(6)900-6.
14. Dustan CR, Boyce BF. Animal models for the investigation of the action of factors on bone metabolism. In: Arnett TR, Henderson B. *Methods in bone Biology*, London, Chapman e Hall. 1997; 12:290-304.
15. Dyer RF, Sodek J, Heersche JNM. The effect of 17 β estradiol on collagen and non-collagenous protein synthesis in the uterus and some periodontal tissues. *Endocrinology.* 1980; 107:1014-21.
16. Eckel LA. *Physiol Behav.* The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. 2011 Sep 26;104(4):517-24.
17. El-Hakim IE, Abdel-Hamid IS, Bader A. Temporomandibular joint (TMJ) response to intra-articular dexamethasone injection following mechanical arthropathy: a histological study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34:305–310.
18. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcif Tissue Int.* 1995 Apr; 56(4):305-10.
19. Emshoff R, Puffer P, Rudisch A, Gassner R. Temporomandibular joint pain: relationship to internal derangement type, osteoarthritis, and synovial fluid mediator level of tumor necrosis factor-alpha. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 90:442–449.
20. Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 2000; 51:245-70.
21. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-895.
22. Farias-Neto A, Martins AP, Figueroba SR, Groppo FC, de Almeida SM, Rizzatti-Barbosa CM. Altered mandibular growth under functional posterior displacement in rats. *Angle Orthod.* 2011 Jul; 25.

23. Flake NM, Bonebreak DB, Gold MS. Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J Neurophysiol.* 2005; 93:1585-1597.
24. Fuentes MA, Opperman LA, Buschang P, Bellinger LL, Carlson DS, Hinton RJ. Lateral functional shift of the mandible: part I. Effects on condylar cartilage thickness and proliferation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003; 123:153-9.
25. Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Kaku M, Kawasoko S, Tanne K. Influences of ovariectomy and orchietomy on the remodeling of mandibular condyle in mice. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1998 Jul-Sep;18(3):164-70.
26. Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Tanne K. Influence of oestrogen and androgen on modeling of the mandibular condylar bone in ovariectomized and orchietomized growing mice. *Archives of Oral Biology.* 2001; 46:57-65.
27. Gage JP. Collagen biosynthesis related to temporomandibular joint clicking in childhood. *J Prosthet Dent.* 1985; 53:714-17.
28. Gelb H, Gelb M. Taking the mystique out of the diagnosis and treatment of craniomandibular (TMJ) disorders. *Int Dent J.* 1989 Jun; 39(2):129-39.
29. Geneser FA. *Histologia com bases biomoleculares.* 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, editora medica Panamericana; 2003 p.211.
30. Ghafari J, Degroote C. Condylar cartilage response to continuous mandibular displacement in the rat. *Angle Orthod.* 1986; 56:49– 57.
31. Griec CR, Stitzel RE. *Farmacologia Moderna com aplicações clínicas.* 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
32. Hardman JG, Limberd LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, Goodman and Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics.* 9.ed. New York: Mc Graw-Hill; 1996:617-58.
33. Harper RP, Kerins CA, Talwar R, Spears R, Hutchins B, Carlson DS, McIntosh JE, Bellinger LL. Meal Pattern analysis in response to temporomandibular joint inflammation in the rat. *Journal of Dental Research.* 2000; 79(9):1704.

34. Hata T, Hosoda M, Hamada Y, Kobayashi K. Steroid-induced damage to the condyles in treatment of idiopathic thrombocytopenia. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 38(2):193-5.
35. Hill PA, Orth M. Bone remodeling. *Brit J Orth.* 1998; 25(2):101-107.
36. Imirzalioglu P, Biler N, Agildere AM. Clinical and radiological follow-up results of patients with untreated TMJ closed lock. *J Oral Rehabil.* 2005 May; 32(5):326-31.
37. Jordan VC. Estrogen receptor antagonists. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. *Reproductive endocrinology, surgery and technology.* Philadelphia: Lippincott Raven Publishers 1996; 527-45.
38. Júnior JOL, Serrano SC, Teodoro AL, Dana BA. Os anti-inflamatórios não hormonais. *Prática hospitalar* 2000; 51: 173-8.
39. Kaasik P, Umnova M, Pehme A, Alev K, Aru M, Selart A, Seene T. Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarities of regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Jun-Jul; 105(1-5):85-90.
40. Kacena MA, Merrel GA, Konda SR, Wilson KM, Mark YX, Horowitz C. Inflammation and bony changes at the temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs.* 2001; 169:257–264.
41. Katchburian E, Arana-Chavez V. *Histologia e embriologia oral.* São Paulo: Panamericana; 2^a edição – 2004.
42. 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; 34:425-31.
43. Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H, Topouzelis N, Zafiriadis A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999; 116:121-5.
44. Kirwan JR. Systemic corticosteroids in rheumatology. In: Klippel J, Dieppe PA, editors. *Rheumatology.* 2.ed London: Mosby; 1998.

45. Klippel JH, Weyand CM, Wortmann RL. Primer in the rheumatic diseases. Georgia: Ed Arthritis Foudation; 2001; 583-91.
46. Komamura K, Shirotani-Ikejima H, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Kitakaze M, Miyatake K, Sunagawa K, Miyata T. Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2003; 17:(4)303-10.
47. Lai YC, Shaftel SS, Miller JH, Tallents RH, Chang Y, Pinkert CA, Olschowka JA, Dickerson IM, Puzas JE, O'Banion MK, Kyrkanides S. Intraarticular induction of interleukin-1b expression in the adult mouse, with resultant temporomandibular joint pathologic changes, dysfunction, and pain. *Arthritis & Rheumatism.* 2006; 54(4):1184–1197.
48. Latt RH. Drug dosages for laboratory animals. In: Melby Jr EC, Altman NH Eds. Cleveland: Handbook of laboratory animal science. CRC Press; 1976; 561-68.
49. Lauren E Ta, Dionne RA. Treatment of painful temporomandibular joints with a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized placebo-controlled comparison of celecoxib to naproxen. *Pain.* 2004; 111:13–21.
50. Li Y, Zhang Z, Wu S, Qiao Y. A novel experimental design model for increasing occlusal vertical dimension. *J Craniofac Surg.* 2010; 21:450-7.
51. Litvak H, Malament K. Prosthodontic management of temporomandibular disorders and orofacial pain. *J Prosthet Dent.* 1993; 69:77-84.
52. Livne E, Laufer D, Blumenfeld I. Osteoarthritis in the temporo-mandibular joint (TMJ) of aged mice and the in vitro effect of TGF-beta 1 on cell proliferation, matrix synthesis, and alkaline phosphatase activity. *Microsc Res Tech.* 1997; 37:314-23.
53. Lumbers ER, Boyce AC, Joulianos G, Kumarasamy V, Barner E, Segar JL, Burrell JH. Effects of cortisol on cardiac myocytes and on expression of cardiac genes in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Mar; 288(3):R567-74.
54. Mao JJ, Rahemtulla F, Scott PG. Proteoglycan expression in the rat

- temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res.* 1998; 77(7):1520-8.
55. Mastbergen SC, Jansen NW, Bijlsma JW, Lafeber FP. Differential direct effects of cyclo-oxygenase-1/2 inhibition on proteoglycan turnover of human osteoarthritic cartilage: an *in vitro* study *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(1):R2.
56. Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Miyawaki T, Hanaoka I, Hiraoka J, Yasuno A, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nishi S, Nakao K. Glucocorticoid Regulation of Leptin synthesis and secretion in Humans: Elevated Plasma Leptin Levels in *Cushing's Syndrome.* *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Aug; 82(8):2542-7.
57. McIlwraith C W. Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures. In: STASHAK, T. S. Adams' lameness in horses. Philadelphia: Baltimore; 2002; Cap7:469-644.
58. McNamara JA Jr, Seligman DA, Okeson JP. Occlusion, Orthodontic treatment, and temporomandibular disorders: a review. *J Orofac Pain.* 1995 Winter; 9(1):73-90.
59. Meechan J. COX-2 inhibitors and pain after oral surgery - pertinent papers 2002-2003. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Apr;44(2):163-5.
60. Mehlisch DR, Desjardins PJ, Daniels S, Hubbard RC. The analgesic efficacy of intramuscular parecoxib sodium in postoperative dental pain. *J Am Dent Assoc.* 2004 Nov;135(11):1578-90.
61. Menezes LG, Sobreira C, Neder L, Rodrigues-Júnior AL, Martinez JA. Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats. *J Appl Physiol.* 2007 Feb; 102(2):698-703.
62. Michalini G. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1980.
63. Milam SB, Schmitz JP. Molecular biology of temporomandibular joint disorders: proposed mechanisms of disease. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Dec; 53(12):1448-54.

64. Milam SB, Zardeneta G, Schmitz JP. Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: a proposed hypothesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Feb; 56(2):214-23.
65. Monteiro ECA, Trindade JMF, Duarte LBP, Chahade WH. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). *O Reumatologista Revista, Temas de Reumatologia Clinica.* 2008 maio; 9:2.
66. Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat.* 1988; 133:192-99.
67. Muto T, Shigeo K, Kanazawa M, Irie K, Yajima T, Kaku T. Ultrastructural study of synovitis induced by trauma to the rat temporomandibular joint (TMJ). *J Oral Pathol Med.* 2003; 32:25–33.
68. Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Suzuki T, Miyamaru M. Proinflammatory cytokines and arthroscopic findings of patients with internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 40:68–71.
69. Okuda T, Yasuoka T, Nakashima M, Nobumitsu O. The effect of ovariectomy on the temporomandibular joints of growing rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54:1201-10.
70. Omi N, Ezawa I, The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone.* 1995; 17(4):163-168.
71. Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocytes interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:2398-402.
72. Pacifici R, Brown C, Rifas L, Avioli LV. TNF- α and GM-CSF secretion from human blood monocytes: effect of menopause and estrogen replacement. *J Bone Miner Res.* 1990; 5:145.
73. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996; 11:1043-8.
74. Plaut M. Lymphocyte hormone receptors. *Ann Rev Immunol.* 1987; 5:621.

75. Pullinger AG, Seligman DA, Gambein JA. A multiple regression analysis of the risk and relative odds of temporomandibular disorders as a function of common occlusal features. *J Dent Res.* 1993; 72:968-79.
76. Rabie AB, Tang GH, Xiong H, Hagg U. PTHrP regulates chondrocyte maturation in condylar cartilage. *J Dent Res.* 2003; 82: 627–631.
77. Rabie AB, Zhao Z, Shen G, Hägg EU, Dr O, Robinson W. Osteogenesis in the glenoid fossa in response to mandibular advancement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001; 119:390-400.
78. Rhee MS, Perianayagam A, Chen P, Youn JH, McDonough AA. Dexamethasone treatment causes resistance to insulin-stimulated cellular potassium uptake in the rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Nov; 287(5):1229-37.
79. Saraiva JFK. COX-2 Risco Cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente? São Paulo: Phoenix Comunicação Integrada; 2007.
80. Shorr E. A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science.* 1941; 94:94.
81. Simonić-Kocijan S, Uhac I, Braut V, Kovac Z, Pavčić DK, Fugosić V, Urek MM. Influence of chronic stress and occlusal interference on masseter muscle pain in rat. *Col Antropol.* 2009; 33:863-6.
82. Solomon DH. NSAIDs: Mechanism of action. UpToDate. 2007 June.
83. Song IH, Gold R, Straub RH. New Glucocorticoids on the horizon: repress, don't active! *J Rheumatol.* 2005; 32(6):1199-207.
84. Souza JRM, Oliveira RT, Blotta MHSL, Coelho OR. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 90(2):94-99.
85. Stockstill JW, Wang MQ. Editor's comment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010; 137:460-1.

86. Talwar RM, Wong BS, Svoboda K, Harper RP. Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; Apr;64(4):600-9.
87. Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. Region-specific bone mass changes in rat mandibular condyle following ovariectomy. *J Dental Res.* 2000; 79(11):1907-1913.
88. Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. *J Prosthet Dent.* 1998; 79(6):685-90.
89. Tanaka M, Ejiri S, Nakajima M, Kohno S, Ozawa H. - Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. *Bone.* 1999; 25:339-347.
90. Tang J, Li S, White PF, Chen X, Wender RH, Quon R, Sloninsky A, Naruse R, Kariger R, Webb T, Norel E. Effect of parecoxib, a novel intravenous cyclooxygenase type-2 inhibitor, on the postoperative opioid requirement and quality of pain control. *Anesthesiology.* 2002 Jun; 96(6):1305-9.
91. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of *steroid/thyroid* receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63:451-86.
92. Turner RT, Riggs LB, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev.* 1994; 15:275-300.
93. Ulgen M, Baran S, Kaya H, Karadede I. The influence of the masticatory hypofunction on the craniofacial growth and development in rats. *Am J Orthodontofacial Orthop.* 1997; 111:189-98.
94. Van Leeuwen MA, Westra J, Limburg PC, van Riel PLCM, van Rijswijk MH. Interleukin-6 in relation to other proinflammatory cytokines, chemotactic activity and neutrophil activation in rheumatoid synovial fluid. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54:33-38.
95. Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women *Cells Tissues Organs.* 2001;169(3):187-92.
96. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM, Temporal relationship between bone loss

- and increase bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1988; 43:179-183.
97. Wronski TJ, Schenck PA, Cintrón M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1987; 40:155-159.
 98. Yamada M, Ito M, Hayashi K, Sato H, Nakamura T. Mandibular condyle bone mineral density measurement by quantitative computed tomography: a gender-related difference in correlation to spinal bone mineral density. *Bone.* 1997; 21:441-445.
 99. Yamamoto M. Involvement in morphological changes of the articular cartilage of rat temporomandibular joint induced by experimental malocclusion. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 1994; 85(3):78-90.
 100. Yamashiro T, Yamamoto T. Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. *Arch Oral Biol.* 1998; 43 191-195.
 101. Yasuoka T, Nakashima M, Okuda T, Tatematsu N. Effect of estrogen replacement on temporomandibular joint remodeling in ovariectomized rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58:189-96.
 102. Zilliacus J, Wright AP, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA. Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol.* 1995 Apr; 9(4):389-400.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado do CEEA-UNICAMP.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1035-1, sobre "INFLUÊNCIA DA REPOSIÇÃO HORMONAL E DE ANTIINFLAMATÓRIOS SOBRE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS EM RATOS COM OU SEM DTM INDUZIDA", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo / Sidney Figueroba Raimundo, 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)-IB-UNICAMP em reunião de 26 de junho de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1035-1, entitled "THE INFLUENCE OF HORMONE REPOSITION AND ANTI-INFLAMMATORY THERAPY OVER MORPHOLOGICAL, HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL IN RATS WITH OR WITHOUT INDUCED TEMPOROMANDIBULAR DISORDERS", 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 June 26, 2006.

Campinas, 28 de junho de 2006.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

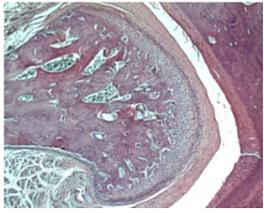
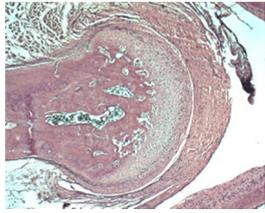
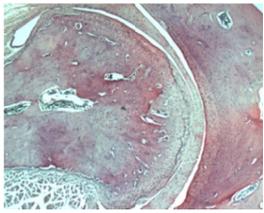
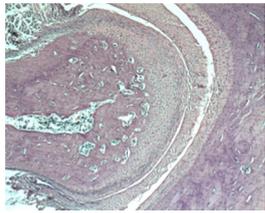
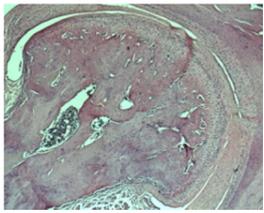
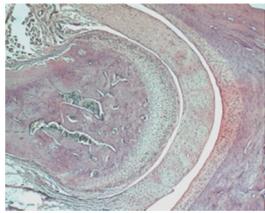
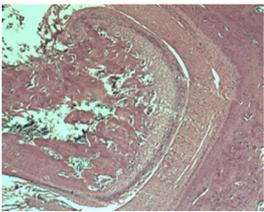
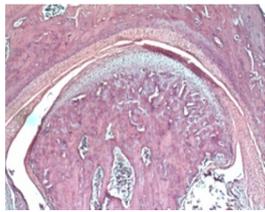
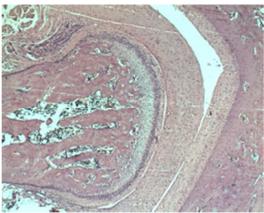
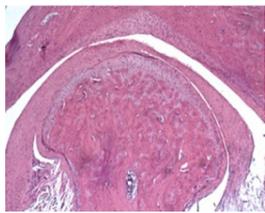
Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

Telefone: (19) 3738-6359
Telefax: (19) 3738-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

ANEXO 2

Prancha 1. Lâminas das ATMs coradas (hematoxilina-eosina) para todos os grupos.

Ovariectomia	Tratamento	Grupo sem-DPFM	Grupo com-DPFM
SEM	Controle		
	Parecoxibe		
	Dexametasona		
COM	Controle		
	Parecoxibe		
	Dexametasona	