

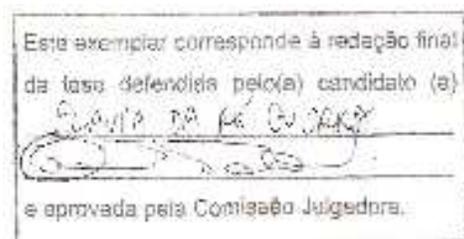


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FLÁVIA DA RÉ GUERRA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO DISCO
ARTICULAR DA ATM DE RATOS SUBMETIDOS À TERAPIA
COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM ANIMAIS PORTADORES DE
DISFUNÇÃO TÊMPOROMANDIBULAR**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G937a Guerra, Flávia Da Ré
Avaliação morfológica e bioquímica do disco articular da ATM de ratos submetidos à terapia com o laser de baixa potência: estudo experimental em animais portadores de disfunção temporomandibular / Flávia Da Ré Guerra. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Evanisi Teresa Palomari.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Transtornos da articulação temporomandibular. 2. Lasers – Uso terapêutico. 3. Rato - Anatomia. 4. Rato - Histologia. 5. Lesão muscular. I. Palomari, Evanisi Teresa, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Morphologic and biochemical evaluation from articular disk of rat's TMJ submitted to low power laser therapy: experimental studies in bearers animals of temporomandibular joint disfunction.

Palavras-chave em inglês: Temporomandibular joint disorders; Lasers – Therapeutic use; Rats - Anatomy; Rats – Histology; Muscular damage.

Área de concentração: Anatomia.

Títuloção: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Evanisi Teresa Palomari, Valdemar Antônio Paffaro Júnior, Inês Carmelita Minniti Rodrigues Pereira.

Data da defesa: 22/05/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 22 de maio de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior



Assinatura

Profa. Dra. Ines Carmelita Minniti Rodrigues Pereira



Assinatura

Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

Assinatura

Profa. Dra. Eneida de Paula

Assinatura

Aos meus pais, Cesar e Tânia que possibilitaram minha formação e sempre me incentivaram em cada etapa de minha vida e ao meu irmão Bruno sempre companheiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus...

Sonhei que estava caminhando na praia juntamente com Deus, e revi, espelhado no céu, todos os dias da minha vida passada. E em cada dia vivido, apareciam na areia, duas pegadas: as minhas e as do Senhor. No entanto em alguns trechos vi que havia apenas duas pegadas, e isso precisamente nos dias mais difíceis da minha vida. Então perguntei a Deus: “Senhor, eu quis viver contigo, e tu prometeste ficar sempre comigo. Porque me deixaste sozinho, logo nos momentos mais difíceis?” Ao que Ele respondeu: “Meu filho, sabes que Eu te amo e nunca te abandonei. Os dias em que viste só duas pegadas na areia são precisamente aqueles em que nos meus braços te carreguei.”

Aos meus pais pelo apoio, compreensão e incentivo durante essa jornada, ajudando em cada obstáculo encontrado. Como foi difícil estar longe do amor e dos conselhos de vocês. Essa distância reforçou a importância que vocês têm em minha vida. Amo vocês!

Ao meu irmão Bruno, obrigada pela divertida amizade e companheirismo, desde os momentos mais fúteis aos mais importantes!

*“Te adoro simplesmente porque você existe.”
(Charles Chaplin)*

A minha família, pela motivação e carinho.

Aos meus eternos amigos Mariane, Cintia, Ju, Milene, Déborah, Sabrina e Lincoln. Obrigada por fazerem parte de minha vida em todos os momentos!

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos.”

(Vinícius de Moraes)

Aos novos amigos Andréa, Isabel, Mayta, Toni, Marcos, Rafael, Raphael Piá, Valéria, Fábio, Eurico e Ivan. Obrigada pela inestimável amizade construída ao longo desses anos de trabalho.

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.

(Charles Chaplin)

Ao Gabriel por fazer parte de minha vida em todos os momentos, mesmo que a distância.

*It's always better when we're together
Yeah we'll look at the stars when we're together.*

(Jack Johnson)

A Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari por me acolher em seu laboratório e me dar a oportunidade de crescer como profissional e como pessoa. Obrigada pela dedicação, preocupação, confiança e amizade.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Edson Rosa Pimentel pela amizade, paciência e disponibilidade em ajudar a buscar respostas aos problemas encontrados neste trabalho.

A Liliam S. Panagio, pela amizade, atenção, cuidado e especialmente pela paciência em explicar tudo nos mínimos detalhes! Obrigada por ser essa pessoa incrível sempre disposta a ajudar!

Aos professores Humberto Santo Neto, Luiz Antônio Violin Dias Pereira, José Meciano Filho e Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira pelas considerações durante meu exame de qualificação.

Aos técnicos e funcionários Francisco, Paulo, Marlene, Carlos, Marco Aurélio, Paulo Francisco, Norivaldo e Ana pela ajuda com os experimentos, o aprendizado, e amizade.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes pelos esclarecimentos e disponibilidade.

Aos meus colegas de laboratório: Lilian, Fabiano, Camila, Valéria, Ivan, Fábio, Marcos e Luciana pela amizade e sugestões enriquecedoras na conclusão desse trabalho.

Aos meus colegas do departamento de Anatomia pelo companheirismo e amizade.

Ao professor e amigo Wagner Costa Rossi Junior, que despertou em mim a carreira acadêmica, sempre incentivando e orientando quanto ao meu potencial para a realização das pesquisas. Obrigada por todas as oportunidades concedidas, pela orientação no TCC e iniciação científica e pelas portas sempre abertas para a sua ex-aluna.

Ao departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp, seus mestres doutores e funcionários que me proporcionaram os conhecimentos necessários para minha titulação como mestre e pesquisadora.

A empresa *MM Optics* pelo fornecimento do equipamento de Laser que possibilitou o tratamento dos animais.

Ao programa de pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural por ter me acolhido, dando-me a oportunidade de estudar e aprender.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/DS) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse estudo.

*"Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres vivos. A consciência de aprender tudo que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída."
(Mahatma Gandhi)*

*"Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei..."
(Almir Sater e Renato Teixeira)*

LISTA DE ABREVIATURAS

AT – Azul de Toluidina

ATM – Articulação têmporomandibular

CS – Condroitim sulfato

DS – Dermatam sulfato

DTM – Disfunção têmporomandibular

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

GAGs – Glicosaminoglicanos

GaAsAl – Arseneto de gálio e alumínio

GaAs – Arseneto de gálio

GC – Grupo controle

GL – Grupo tratado com Laser de baixa potência

GD - grupo modelo de disfunção têmporomandibular

GDL - grupo modelo de disfunção têmporomandibular tratado com laser.

HE – Hematoxilina-eosina

He-Ne – Hélio-neônio

HS – Heparan sulfato

LBP – Laser de baixa potência

LMN – Padrão de baixo peso molecular

MEC – Matriz Extracelular

ML – Microscopia de luz

PBS – Tampão fosfato

PDA – Propileno diamino

PG - Proteoglicana

PMSF – fenilmetilsulfonil fluoreto

RESUMO

Desordens decorrentes de danos ou doenças relacionadas à ATM afetam o aparelho mastigador como um todo e são caracterizadas como desordens temporomandibulares (DTM). Sabe-se que cerca de sete por cento da população mundial requer tratamento para as DTM. Tecidos cartilagosos, como os que constituem o disco articular da ATM, possuem uma capacidade limitada de regeneração, e ainda não existem técnicas e métodos fidedignos que estimulem o crescimento de um novo tecido, capaz de auxiliar o tratamento de traumas e doenças degenerativas. O tratamento com laser de baixa potência é uma das terapias utilizadas e, por isto, torna-se imprescindível o conhecimento de suas ações sob o ponto de vista celular e tecidual. Para tal, foram utilizados 24 ratos Lewis machos divididos em quatro grupos: GC, grupo controle; grupo GD, animais em que foi administrada a toxina botulínica; grupo GL, animais que receberam o tratamento com o laser de baixa potência; grupo GDL, animais em que foi administrada a toxina botulínica e em seguida, submetidos à terapia com o laser de baixa potência. Foi realizada análise morfológica por meio de cortes histológicos corados por HE, AT e picrosírius e; análise bioquímica por meio de eletroforese em gel SDS-poliacrilamida e dosagem de proteínas. Com base nos resultados morfológicos e bioquímicos, conclui-se que o modelo de DTM proposto mostrou-se satisfatório para estudos desta doença. Por outro lado, a terapia com o laser deve submeter seus protocolos clínicos a uma reavaliação, visto que a mesma apresentou resultados controversos do ponto de vista tecidual por ter promovido a síntese de alguns componentes da matriz extracelular e a desestruturação de outros essenciais ao bom funcionamento da articulação envolvida.

Palavras-chave: Transtornos da articulação temporomandibular. Lasers. Anatomia e Histologia. Lesão.

ABSTRACT

Disorders resulting from injury or disease related to TMJ affect the masticatory apparatus as a whole and are characterized as temporomandibular joint disorder (TMJD). It is known that about seven percent of world population requires treatment for the TMJD. Cartilaginous tissues, such as those that constitute the articular disc of the ATM, have a limited capacity for regeneration, and yet there are no reliable techniques and methods that encourage the growth of a new tissue, capable of assisting the treatment of trauma and degenerative diseases. Treatment with low power laser is one of the therapies used and, therefore, it is essential knowledge of their actions in terms of cellular and tissue. To this end, we used 24 male Lewis rats divided into four groups: GC control group GD animals in that group was given the botulinum toxin; GL group animals that received treatment with low-power laser; GDL animals in that group was given the botulinum toxin and then submitted to the low power laser therapy. Morphological analysis was performed by means of histological sections and stained by HE, and AT and picrosirius; biochemical analysis by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel and determination of proteins. It can be concluded based on morphological and biochemical results, the proposed model of TMD was shown satisfactory for studies of this disease, while treatment with the laser must submit their clinical protocols to a reevaluation because it showed controversial results of point of tissue for promoting the synthesis of some components of the extracellular matrix and destruction of other essential for the proper functioning of the joint involved.

Key words: Temporomandibular joint disorders. Lasers. Anatomy and Histology. Lesion.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 O aparelho mastigatório | 17 |
| 1.1.1 A articulação temporomandibular (ATM)..... | 17 |
| 1.1.2 Constituintes celulares e matriz extracelular do disco articular da ATM..... | 20 |
| 1.2 Desordens do aparelho mastigador | 24 |
| 1.2.1 Os músculos na adaptação e degeneração das articulações..... | 29 |
| 1.3 A toxina Botulínica | 30 |
| 1.3.1 Uso experimental da toxina botulínica..... | 32 |
| 1.4 Laser | 33 |
| 1.4.1 Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) | 35 |
| 2. OBJETIVOS | 39 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 40 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 Animais | 41 |
| 4.2 Grupo experimental | 41 |
| 4.3 Administração de toxina botulínica | 42 |
| 4.4 Técnica de aplicação do LBP | 43 |
| 4.5 Análise morfológica | 44 |
| 4.5.1 Coloração em Hematoxilina-eosina (HE) | 44 |
| 4.5.2 Coloração em Azul de Toluidina (AT)..... | 45 |
| 4.5.3 Coloração em Picrosirius..... | 45 |
| 4.5.4 Análise da Imagem | 46 |
| 4.6 Análise Bioquímica | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6.1 Extração dos componentes de matriz extracelular do disco articular | 47 |
| 4.6.2 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 47 |
| 4.6.3 Dosagem de proteínas não colagênicas pelo método de Bradford | 49 |
| 4.7 Análise Estatística | 49 |
| 5. RESULTADOS | 50 |
| 5.1 Análise Morfológica | 50 |
| 5.1.1 Coloração em Hematoxilina-eosina (HE) | 50 |
| 5.1.2 Coloração em Azul de Toluidina (AT)..... | 51 |
| 5.1.3 Coloração em Picrosirius | 52 |
| 5.2 Análise Bioquímica | 53 |
| 5.2.1 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 53 |
| 5.2.2 Dosagem de Proteínas não colagênicas pelo método de Bradford | 54 |
| 6. DISCUSSÃO | 55 |
| 7. FIGURAS | 65 |
| 8. TABELAS | 67 |
| 9. CONCLUSÕES | 68 |
| 10. REFERÊNCIAS | 69 |
| 11. ARTIGO SUBMETIDO AO JOURNAL OF DENTISTRY | 78 |
| 12. ANEXO1 | 92 |

1- INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é sem dúvida a articulação mais complexa do corpo (OKESON, 1992). Consiste em uma articulação, em que um disco divide completamente o espaço articular em compartimento superior e inferior (MOHL et al., 1991). Os meios de união desta articulação são: cápsula articular, ligamento lateral, ligamento esfenomandibular, disco articular e ligamento estilomandibular (GRAY, 1988). Essas características promovem suporte de componentes e forças que atuam na articulação, além de facilitar o deslizamento entre os elementos ósseos (WONG et al., 2005).

Estudos revelam que cerca de setenta e cinco por cento da população mundial adulta apresenta pelo menos um sintoma relacionado à disfunção temporomandibular, trinta por cento apresenta mais de um sintoma, porém um número muito pequeno, três a sete por cento, requer tratamentos específicos para estas desordens (KULEKCIOGLU et al., 2003; BHUTADA, 2004; HOLMLUND, 2007; RODA et al., 2007).

As DTM são decorrentes de danos ou doenças relacionadas à ATM e afetam o aparelho mastigador como um todo, além da própria articulação. As mudanças degenerativas que ocorrem decorrentes de lesão, esforço ou da própria idade não são totalmente compreendidas e, portanto, ainda muito estudadas (SHEETS et al., 2006).

Atualmente muitos tratamentos vêm sendo utilizados como forma de reduzir a dor e induzir o reparo da cartilagem nos indivíduos portadores de DTM. Algumas intervenções terapêuticas utilizadas são: placa miorelaxante, exercícios, e em último

caso, artroscopia, debridamento, técnica da microfratura, uso de biomembranas e o tratamento com laser de baixa potência (HUNZIKER, 2001).

O efeito analgésico do laser de baixa potência (LBP) tem sido muito estudado, porém não se tem ainda total compreensão de seu efeito no tecido articular. Portanto, o desenvolvimento de métodos que possam potencializar a regeneração ou a proliferação de células da cartilagem será de grande valia no tratamento de doenças articulares.

1.1 O Aparelho Mastigatório

O sistema mastigatório pode ser considerado como uma unidade funcional dentro do contexto de outras entidades funcionais subjacentes, que compreendem a cabeça e o pescoço e, na realidade, todo o corpo (MOHL et al., 1991).

Anatomicamente, o aparelho mastigatório encontra-se constituído pelos ossos, dentes e suas estruturas periodontais de proteção e suporte, pela ATM, musculatura mandibular, músculos dos lábios, bochechas e língua, além de tecidos moles que revestem estas estruturas, ligamentos, vasos e nervos (PICOSSE, 1971; MOHL et al., 1991).

1.1.1 A Articulação Temporomandibular (ATM)

A ATM dos mamíferos constitui a ligação móvel entre a mandíbula e o osso temporal. É uma articulação do tipo diartrose biaxial altamente especializada em

movimentos de compressão e tensão (MIZOGUCHI et al., 1996). É classificada como sinovial verdadeira, pois suas superfícies ósseas contíguas são recobertas por cartilagem articular e unidas por ligamentos revestidos por membrana sinovial, sendo caracterizada como uma combinação entre gínglimo e junta plana e por este motivo, permite amplos movimentos da mandíbula em torno do osso temporal (GRAY, 1988; MOHL et al., 1991).

A articulação é facilmente reconhecível através da abertura ampla da boca, de modo que a mandíbula é trazida para diante e uma depressão pode ser palpada entre o côndilo da mandíbula e a fossa situada no osso temporal, precisamente a frente do trago da orelha (GRAY, 1988). Anteriormente, relaciona-se com o músculo pterigóideo lateral; e, posteriormente, com a glândula parótida, o nervo auriculotemporal e os vasos temporais superficiais. A ATM é subcutânea lateralmente e possui relação com o nervo facial, enquanto que, medialmente está relacionada com a espinha do esfenóide, o forame espinhoso, a artéria maxilar interna e seu plexo nervoso (TESTUT e JACOB, 1932; GARDNER, GRAY, O'RAHILLY, 1971).

O espaço articular acha-se dividido em dois compartimentos pela interposição do disco articular. Os elementos que intervêm nesta articulação são: o tubérculo articular do temporal, a cabeça ou côndilo da mandíbula e o disco articular (SICHER e TANDLER, 1981).

A cápsula articular se dispõe em forma de manguito ao redor da articulação e define os limites anatômicos e funcionais da ATM (TESTUT e JACOB, 1932). É composta por tecido conjuntivo frouxo que se estende entre a superfície articular superior e o colo da mandíbula, fusionando-se anularmente com o colo articular.

(GARDNER, GRAY, O'RAHILLY, 1971; SICHER e TANDLER, 1981; MOHL et al., 1991).

O reforço desta juntura é dado pelo ligamento lateral ou temporomandibular, que se estende do tubérculo, na raiz do processo zigomático, à superfície lateral do colo da mandíbula; pelo ligamento esfenomandibular, que se estende do processo e dos ligamentos anteriores do martelo, dos lábios da fissura petrotimpânica e da espinha do esfenóide até a língula da mandíbula; e, pelo ligamento estilomandibular, que se estende entre o processo estilóide e o ângulo e borda posterior do ramo da mandíbula (TESTUT e JACOB, 1932; GARDNER, GRAY, O'RAHILLY, 1971).

A superfície articular inferior é convexa, a superior é convexa em sua região anterior e côncava posteriormente, sendo, portanto superfícies sem um encaixe satisfatório, para promover a adaptação da articulação um disco se interpõe entre elas (TESTUT e JACOB, 1932).

O disco articular é uma estrutura firme e flexível de tecido fibroso, geralmente, bicôncavo e localiza-se entre as superfícies articulares do côndilo da mandíbula e da fossa glenóide. A margem deste liga-se à cápsula articular, perde-se atrás em fibras elásticas e num plexo venoso retroarticular. Anteriormente por meio de uma cápsula, o disco está ancorado ao tendão do músculo pterigóideo lateral (GARDNER, GRAY, O'RAHILLY, 1971). Tem como função proteger e possibilitar o contato de duas superfícies ósseas durante os movimentos mandibulares. Além disso, tem a propriedade de amortecer choques, regular os movimentos, estabilizar o côndilo na cavidade e auxiliar na lubrificação pela produção de líquido sinovial (PICOSSE, 1971; HANAOKA et al., 2005). A área central do disco, chamada de zona intermediária, é

mais fina do que a periferia é através desta área que o côndilo normalmente exerce pressão contra a eminência articular. A parte mais espessa do disco é a margem (MOHL et al., 1991).

A ATM realiza cinco tipos de movimentos. Os movimentos de descida, produzidos pelos músculos supra-hióideos; os movimentos de elevação, produzidos pelos músculos temporal, masseter e pterigóideo lateral; os movimentos de projeção anterior, realizado pelo músculo pterigóideo lateral; os movimentos de projeção posterior, produzido pelos fascículos posteriores do músculo temporal; e por fim, movimentos de lateralização, realizados pela contração alternada dos músculos pterigóideos (TESTUT e JACOB, 1932).

No ato da mastigação existem basicamente três tipos de movimento mandibular: compressão, tensão e movimentos cortantes (*shear*). No movimento natural da articulação, esses três movimentos ocorrem de maneira combinada. Durante todo o tipo de movimento, o disco articular sofre deformação para se acomodar perfeitamente ao movimento realizado (TANAKA e VAN EIJDEN, 2003). Não obstante a isto, os movimentos da articulação dependem em alto grau da forma e situação dos dentes, músculos e estruturas adjacentes (SICHER e TANDLER, 1981).

1.1.2 Constituintes Celulares e Matriz Extracelular do disco articular da ATM

A matriz extracelular (MEC) corresponde aos complexos macromoleculares relativamente estáveis, formados por moléculas de diferentes naturezas que são produzidas, exportadas, e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia

e biomecânica dos tecidos. A MEC pode ser dividida em três componentes principais: os componentes fibrilares representados pelos colágenos fibrilares e pelas fibras elásticas; os componentes não-fibrilares, representados pelos proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas; e, as microfibrilas, representadas por colágeno tipo VI e microfibrilas associadas ao sistema elástico (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001).

Achados gerais indicam que o disco articular é uma placa oval constituída de tecido conjuntivo composto basicamente de fibras colágenas, elásticas, proteoglicanas to tipo condroitim sulfato de alto peso molecular e água. O tipo predominante por volume é o colágeno tipo I. O colágeno do tipo II está presente pericelularmente e nos interstícios da camada de colágeno do tipo I. O disco articular é composto também por colágeno tipo III que juntamente com os demais confere resistência ao disco (FUJITA e HOSHINO, 1989; TANAKA e VAN EIJDEN, 2003). O colágeno do disco é quase exclusivamente o tipo I e este se estende ântero-posteriormente, para o centro num arranjo de anel (*ringlike fashion*) em volta da periferia (DETAMORE e ATHANASIOU, 2003).

O colágeno é o componente mais abundante na maioria dos tecidos. As moléculas de colágeno possuem uma grande importância em fornecer resistência mecânica aos tecidos, além de estarem envolvidas, direta e indiretamente, na adesão e diferenciação celulares, quimiotaxia e outras funções importantes para o desenvolvimento e funcionamento do organismo (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001).

Os proteoglicanos diferenciam-se das demais glicoproteínas por possuir ao menos uma cadeia de glicosaminoglicano (HARDINGHAM e FOSANG, 1992). A

presença característica de cargas negativas garante a essas moléculas grande parte de suas características funcionais, por se associarem a uma grande quantidade de cátions livres e com isso reterem água nos tecidos. Em decorrência de sua estrutura molecular, as proteoglicanas possuem alta resistência às forças de compressão (TANAKA e VAN EIJDEN, 2003). Além de representarem o molde para a ligação dos GAGs e serem responsáveis pelo seu tráfego intracelular, pela via-biossintética secretora, apresentam domínios específicos na molécula que permitem sua interação com outros açúcares, com membranas celulares, ou com proteínas, como o colágeno. A composição dissacarídica e o tipo de ligação glicosídica entre eles, além do número e localização dos radicais sulfato, são responsáveis pela classificação dos GAGs (COMPER, 1996).

Glicosaminoglicanos (GAGs) são importantes constituintes do tecido cartilaginoso pois, sobre compressão exercem uma pressão contrária que é contida pelas fibras de colágeno. Os GAGs são de devida importância para as propriedades biomecânicas do tecido, oferecem resistência contra o fluxo de fluido no tecido até que o equilíbrio com a força externa aplicada seja atingido. Nesse ponto, o movimento do fluido é interrompido (MUIR et al., 1969 apud PAEGLE et al., 2003; URBAN e MCMULLIN, 1985).

Fibrocartilagens assim como a ATM e o menisco do joelho, contém grandes proporções de colágeno, enquanto os GAGs na forma condroitim-4-sulfato e condroitim-6-sulfato (Cs) estão presentes em pouca quantidade (PAEGLE et al., 2003).

Detamore et al. (2005), estudaram o disco articular da ATM de porcos, com o objetivo de caracterizar a MEC do disco. Os autores verificaram que existem características diferentes entre a zona intermediária e as bandas anterior e posterior do

mesmo. Dentre estas características, pôde-se observar que existe uma maior concentração de glicosaminoglicanos e colágeno II na porção intermediária do disco.

Kondoh et al. (2003), estudaram o disco articular da ATM de cadáveres e observaram que, existe uma diferença nos padrões de distribuição de colágeno tipo II em toda a extensão do disco, o que os permitiu concluir que estes achados refletem a demanda funcional do processo de remodelação do disco. Ressaltaram também que no disco, as fibras colágenas apresentam-se mais espessas e mais densas comparadas à cápsula articular.

Alguns autores acreditam que, em indivíduos com osteoartrite, o disco articular se apresenta com uma diminuição no conteúdo de GAGs, indicando a degradação no tecido (AXELSSON et al., 1992; PAEGLE et al., 2003).

Em contrapartida, Huang et al. (2002), induziram em coelhos a má oclusão dentária, e, verificaram que em resposta ao estresse mecânico provocado pela perda de dentes, os condrócitos alteraram a síntese de GAGs sulfatadas e sua taxa de degradação resultando num elevado nível de GAGs na cartilagem condilar.

Existem diferenças entre as regiões do disco quanto ao número e distribuição das fibras elásticas e colágenas e, também na sua espessura, o que pode ser explicado como forma de distribuir o estresse sobre a estrutura (SCAPINO et al., 2006).

Detamore et al. (2006) observaram o disco articular da ATM de porcos e verificaram que existiam células semelhantes a condrócitos, os fibrocondrócitos. Estes se situam, principalmente, na zona intermediária do disco, além de fibroblastos predominando por todo o disco. A microscopia eletrônica de transmissão revelou

diferenças entre os fibrocondrócitos e os condrócitos de cartilagem hialina, quanto às organelas e a região pericelular.

Berkovitz e Pacy (2000) estudaram a ATM de ratos de diferentes idades e observaram que as células do disco articular de animais com até 15 meses de idade, caracterizavam-se por apresentar elevado número de retículo endoplasmático e outras organelas associadas com a síntese de proteínas e secreção. Por outro lado, em animais mais velhos (aproximadamente com dois anos e meio de idade), as células apresentaram morfologia semelhante à condrócitos. Estas, por sua vez, se encontravam rodeadas por uma matriz pericelular derivada de microfibrilas de colágeno e embebidas numa grande quantidade de substância fundamental. Portanto, concluíram que estes animais apresentam mudanças celulares no disco articular, decorrentes da idade. Este por sua vez, sofre modificação na sua constituição, passando de tecido fibroso para fibrocartilagem, condição similar a que é verificada em humanos.

1.2. Desordens do Aparelho Mastigador

Desordem têmporomandibular ou DTM é um termo geralmente aplicado a uma condição ou condições caracterizadas por dor e, ou disfunção do aparato mastigatório (COOPER e KLEINBERG, 2007).

As DTM são condições que afetam a forma e/ou função da ATM, músculos mastigatórios, e o aparelho dentário (NUNEZ et al., 2006) e compreendem as miopatias e artropatias do sistema crânio-mandibular. Estas desordens têm uma prevalência nove

vezes maior nas mulheres (BERMEJO-FENOLL e SÁEZ-YUGUERO, 2005), e preferencialmente afeta mulheres em idade reprodutiva ou que fazem uso de estrógeno exógeno possivelmente porque o estrógeno contribui como modulador do processo inflamatório associado ao dano da ATM (FLAKE, HERMANSTYNE, GOLD, 2006; FISCHER, CLEMENTE, TAMBELI, 2007).

Segundo Okesson (1992), as DTM são classificadas de maneira geral em desordens: dos músculos mastigatórios; de interferência do disco; de crescimento, inflamatórias; e hipomobilidade mandibular crônica. Das causas mais comuns para estas desordens encontram-se a involução do aparelho mastigador, ocasionado, principalmente, pelo desgaste ou perda dos elementos dentários, e as desordens nos músculos mastigatórios.

A involução do aparelho mastigador, mesmo em condições normais, ocorre gradativamente. É um processo lento e irreversível que se inicia após completar-se o aparelho dentário (por volta dos 12-14 anos). Entre as causas da involução dentária estão: atrição ou desgaste fisiológico dos dentes; abrasão ou desgaste patológico; erosão; queda dos dentes; reabsorção do processo alvéolos e dos ossos alveolares (PICOSSE, 1971).

A queixa mais freqüente relatada pelo indivíduo com distúrbios funcionais do sistema mastigatório é a dor muscular. Esta, geralmente, associada a atividades funcionais, agravada por palpação normal ou manipulação funcional dos músculos. As desordens musculares podem ser subdivididas em mio-espasmo, miosites, dor miofascial em pontos algícos e contratura muscular protetora. Esta última consiste de um estado hipertônico induzido involuntariamente que ocorre como resultado de

alterações proprioceptivas do sistema nervoso central. Desarmonias desta natureza podem ocasionar desordens do disco articular, através da hiperatividade muscular gerando um microtrauma do disco (OKESSON, 1992).

Existem ainda fatores de nível celular que podem contribuir com essas condições. Estudos realizados por Kuwambara et al. (2002) mostraram que a expressão de determinados proteoglicanos como a decorim aumentam conforme a idade, enquanto a biglicam diminui gradualmente, fato que pode refletir as mudanças bioquímicas causadas pelo desenvolvimento das funções orofaciais. Todos estes fatores por sua vez implicarão em modificações no maxilar, mandíbula, musculatura da face e na ATM.

As diferentes propriedades identificadas para a decorim sugerem que a mesma contribui imensamente com a organização da MEC. Além deste existe um outro pequeno proteoglicano, o fibromodulim que possui papel complementar à decorim, interagindo com o colágeno modulando sua fibrilogênese (COMPER, 1996; CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001).

A proporção de colágeno no tecido do disco aumenta conforme a idade, enquanto a quantidade de água permanece a mesma. Os discos articulares jovens contêm maior quantidade de fluido a ser liberado para o disco, resultando numa maior elasticidade. Por outro lado, os discos maduros, por possuírem mais colágeno, apresentam menor perda de água após o relaxamento (TANAKA e VAN EIJDEN, 2003).

As miopatias mais freqüentes relacionadas com as DTM são as dores miofaciais e os mioesposmos. Enquanto as artropatias de maior prevalência são, a luxação discocondilar e em conseqüência a artrose. Estas doenças estão freqüentemente associadas

e são provocadas, principalmente, por alterações oclusais (GLAROS et al., 2005; BERMEJO-FENOLL e SÁEZ-YUGUERO, 2005).

O posicionamento da ATM, língua e mandíbula, pescoço, cabeça e da região da coluna vertebral estão correlacionados, o que implica dizer que alterações da estrutura mandibular podem provocar alterações na postura do indivíduo visto que o repouso dos músculos inseridos na mandíbula é afetado pela posição mandibular. Essa diferença de comprimento muscular irá causar mudanças compensatórias em outros músculos e, assim, alterar todo o equilíbrio músculo-esquelético. O oposto, também ocorre, visto que lesões posturais podem levar à ocorrência de uma DTM (GOMES, 2005).

Zang et al. (2003), verificaram em ratos o efeito da mastigação unilateral, provocado pela extração ou perda dos dentes, e observaram que houve uma remodelação interna da fossa glenóide. Concluíram, então, que a mastigação unilateral pode ser considerada um fator etiológico das DTM.

As propriedades bioquímicas do disco articular sofrem alterações em decorrência de trauma ou doença da ATM. Todo processo de dano causado a esta estrutura pode provocar mudanças na conformação e composição bioquímica, como nos glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanas. Estas mudanças podem por sua vez implicar em modificações nas propriedades mecânicas do disco articular (TANAKA e VAN EIJDEN, 2003).

Leonardi, et al. (2001) realizaram um estudo histoquímico do disco articular da ATM de indivíduos com DTM. Observaram que ocorreu um aumento do número de fibras elásticas e oxaláticas em discos com severo desgaste patológico. Este

aumento parece conferir complacência biomecânica, devido ao reforço de regiões desprovidas de colágeno, e tem como função absorção de choques e compressão.

A maioria das pessoas com DTM queixa-se de sons de estalido na articulação, movimentos anormais da mandíbula e dor muscular crônica que afetam os músculos orofaciais (DENG, FU, HÄGG, 1995; COOPER e KLEINBERG, 2007). Também podem apresentar dor do tipo referida, que pode chegar a afetar a musculatura cervical e da orelha média. A sintomatologia é variada e se caracteriza por vertigem até a sensação de ouvido tapado (RAMIREZ et al., 2005). A conexão mecânica direta entre a ATM e a orelha média foi estudada em cadáveres adultos onde se pôde estabelecer um vínculo anatômico preciso entre a ATM, o ligamento esfenomandibular e o ouvido médio, por meio dos ligamentos disco-maleolar e o ligamento maleolar anterior. Esta comunicação implica que qualquer lesão na altura da ATM pode alcançar a orelha média e vice-versa (TESTUT e JACOB, 1932; RODRIGUEZ-VÁZQUEZ et al., 1998).

Kavuncu et al. (2006), observaram em indivíduos que sofriam de dor à palpação muscular e/ou movimentos mandibulares que os mesmos apresentavam limitação de movimentos da mandíbula e, portanto, eram portadores de uma DTM.

Dentre outros fatores de risco para DTM está a idade, a hiper mobilidade, mesmo que sistêmica como a síndrome de Ehler-Danlos e o bruxismo (RODA et al., 2007). Estudos recentes demonstraram que a extração do terceiro molar pode aumentar em sessenta por cento o risco de desordens têmporomandibulares (HUANG e RUE, 2006) assim como o uso de aparelhos ortodônticos (GODOY, ROSENBLATT, GODOY-BEZERRA, 2007).

Como forma de amenizar os sintomas decorrentes desta doença diversas intervenções terapêuticas são utilizadas nos indivíduos portadores de DTM, o tratamento geralmente envolve uma combinação de terapias, medicamentos são prescritos para diminuir a dor; tratamentos fonoaudiológico e fisioterápico e, se a terapia conservadora não for eficaz, são lançadas as técnicas cirúrgicas como a artroscopia, debridamento e técnica de microfratura. Dentre as terapias vigentes, o laser de baixa potência - LBP tem apresentado um efetivo resultado terapêutico (CETINER, KAHRAMAN, YÜCETAS, 2006).

1.2.1 Os músculos na adaptação e degeneração das articulações

A principal função dos músculos esqueléticos é promover a movimentação de articulações e uma atividade que exceda o limiar pode ocasionar respostas degenerativas por parte da junta envolvida. Esse quadro pode acarretar mudanças no alinhamento da superfície articular, ou injúrias a cápsula e cartilagem articular (BOOTH, 1982; TABER, 1995; HERZOG et al. 2003).

Matic et al. (2007) realizaram um estudo com coelhos e observaram por meio de tomografia computadorizada os efeitos da paralisia do músculo masseter no crescimento dos ossos da face. Nos animais em que o músculo sofreu paralisia, houve uma redução significativa do volume dos ossos zigomático e mandibular. Indicou, portanto, que o músculo possui uma função de manutenção no volume ósseo por meio do controle da produção desse tecido.

Herzog et al. (2003), estudaram joelhos de coelho e observaram que a redução da força muscular, estava associada com degenerações da articulação do joelho, o que permitiu concluir que a condição dos músculos é um fator essencial para as respostas adaptativas da articulação.

Durante o desenvolvimento da mandíbula de ratos, Kim (2008) administrou toxina botulínica no músculo masseter e observou que ocorreu um aumento de apoptose na cartilagem articular.

Fink, et al. (2007) estudaram o músculo vasto medial em indivíduos portadores de osteoartrite de joelho e, verificaram que estes apresentavam modificações da estrutura muscular, tais como, degeneração de fibras.

Estes achados reforçam o papel dos músculos no crescimento, desenvolvimento e bom funcionamento dos ossos e articulações, indicando a relação de interdependência entre os sistemas osteoarticular e muscular.

1.3 A Toxina Botulínica

A toxina botulínica é produzida pelo *Clostridium botulinum*, uma bactéria gram negativa e anaeróbica. Esta toxina foi inicialmente estudada por ser causadora do chamado botulismo, uma condição de paralisia muscular associada à intoxicação alimentar caracterizada por disfagia, diplopia, miastenia e insuficiência respiratória, podendo ser fatal (HAMBLETON, 1992).

A bactéria *Clostridium botulinum* possui oito sorotipos que produzem sete neurotoxinas distintas, similares em sua estrutura e ação farmacológica, porém diferem entre si no sítio receptor nos neurônios, no mecanismo de ação celular, na potência e duração do efeito (CHERINGTON, 2004; MORBIATO, 2007). As toxinas são complexos protéicos que incluem a subdivisão neurotóxica, com aproximadamente 150 kDa, e uma ou mais proteínas não tóxicas que correspondem a cerca de 70 % da massa total. Essas proteínas têm a função de proteger a molécula da toxina e, podem ou não ter atividade de hemaglutinação (HAMBLETON, 1992; CARRUTHERS, 2003; KLEIN, 2003; MORBIATO, 2007). A toxina classificada como do tipo A é a mais potente, de efeito mais duradouro e comercializada com finalidade terapêutica (HAMBLETON, 1992; GRACIES, 2000; BHIDAYASIRI, 2005).

A ação da toxina consiste basicamente da inibição da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular. A toxina penetra nas terminações nervosas por um processo de endocitose após se ligar aos receptores de membrana pré-sináptica, agindo então como uma endoprotease dependente de zinco que acaba por romper alguns peptídeos necessários à liberação das vesículas de acetilcolina, produzindo uma denervação química efetiva nos músculos estriados, com conseqüente paralisia muscular (GRACIES, 2000; KLEIN, 2003; CARRUTHERS, 2003). Esta ação pode levar até duas semanas para atingir o efeito desejado e a função muscular normal começa a retornar após cerca de três meses, geralmente retornando a seu estado normal por volta dos seis meses (GRACIES, 2000).

1.3.1 Uso experimental da toxina botulínica

A toxina botulínica do tipo A é uma substância líquida, estéril e liofilizada. Devido sua ação farmacológica vêm sendo largamente utilizada em diversos estudos como forma de modelo experimental em diversas doenças (HAMBLETON, 1992; ELEOPRA, 1997; HERZOG, 2003; CHILDERS, 2004; SHEN, 2005; BHIDAYASIRI, 2005; BAKKE, 2005; YOSHIDA, 2006, MORBIATO, 2007; MINAMOTO, 2007; CHOI, 2007; MATIC, 2007; KIM, 2008).

Quando injetada via intramuscular, em doses terapêuticas, a toxina produz uma paralisia muscular localizada por denervação química temporária. Esta denervação produz uma atrofia do músculo, que com o passar do tempo desenvolve novos receptores extrajuncionais para a acetilcolina e a debilidade instalada se reverte (ALLERGAN, 2003).

Kim et. al, 2008 utilizaram injeções locais de 0,05ml de toxina botulínica tipo A, totalizando 2,5 unidades/Kg do animal no músculo masseter de ratos, e Kwon et. al, 2007, utilizaram injeções locais de 5 e 15 unidades de toxina botulínica tipo A, no músculo masseter de coelhos. Ambos os estudos tiveram por finalidade observar as influências da paralisia muscular no desenvolvimento da mandíbula desses animais. Os resultados apontaram que houve uma influência no desenvolvimento desta devido a modificações na cartilagem condilar.

Choi et al. (2007) administraram uma dose diária durante 28 dias (1, 3 e 9 ng/Kg) da referida droga em ratos para induzir a atrofia muscular. Verificaram apenas a atrofia muscular e não efeitos colaterais de outra natureza.

Estudos com a administração de 2,5 unidades/100 µl da toxina no músculo quadríceps femoral de camundongos demonstrou que houve uma significativa perda óssea nos animais do grupo tratado. Isto indica que a funcionalidade muscular interfere em toda a homeostase do sistema osteoarticular (WARNER, 2006).

O papel dos músculos na adaptação e degeneração da articulação do joelho de felinos foi estudado por Herzog et. al, 2003. Foi desenvolvido um modelo animal para estudar os efeitos da fraqueza muscular na articulação através da administração de 5 unidades/Kg da toxina botulínica. Os resultados permitiram concluir que a atrofia, ou simplesmente a fraqueza muscular, está associada à degeneração e instabilidade da articulação do joelho.

Em 2005, Longino et al. propuseram por meio da administração de 3,5 unidades/Kg de toxina botulínica, um modelo animal para estudar os efeitos da fraqueza muscular na degeneração de articulações, como a osteoartrite.

1.4 Laser

A palavra laser tem sua origem na língua inglesa e vem da expressão *Light Amplification by Stimulated emission of Radiation* que significa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Essa radiação constitui um tipo de fonte luminosa com características bastante específicas. A radiação a laser é monocromática, ou seja, emite radiações em um único comprimento de onda e apresenta coerência espacial e temporal. Sua direcionalidade permite a obtenção de alta densidade de energia

concentrada em pequenos pontos. Com o auxílio de dispositivos ópticos, sua radiação pode ainda ser polarizada (LOPES, 2003).

A potência do laser é o valor dado pelo fabricante em watts (W). A densidade de potência é a potência de saída de luz por unidade de área medida em watts por centímetro quadrado (W/cm^2). A densidade de energia, também chamada de dose, é a grandeza que avalia a possibilidade de estímulo ou inibição dos efeitos do laser, ou seja, a quantidade de energia por unidade de área transferida ao tecido geralmente expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm^2) (MISERENDINO e PICK, 1995).

A maioria dos equipamentos que utilizam lasers é composta pelos seguintes elementos segundo Miserendino e Pick, 1995; Zezell, 2001 apud Damante, 2003:

- **Ressonador:** tubo ou cavidade óptica com arranjo de espelhos que amplificam os efeitos do laser.
- **Meio ativo:** determina o comprimento de onda da luz emitida. Pode ser sólido como o neodímio, érbio e os lasers semicondutores de arseneto de gálio e alumínio (GaAsAl) e arseneto de gálio (GaAs). Entre os meios ativos gasosos estão o argônio, hélio-neônio (He-Ne), dióxido de carbono (CO_2), enquanto os lasers líquidos são compostos de corantes orgânicos.
- **Mecanismo de excitação ou bombeamento:** Consiste de uma fonte de energia externa que excita os elétrons

do meio ativo. Pode ser uma descarga elétrica, o disparo de um flash e até uma ativação por outro laser.

O laser pode chegar ao tecido alvo por diferentes sistemas de entrega, entre eles através de lentes, microscópios, braços articulados e fibras ópticas (ZEZELL, 2001 apud DAMANTE, 2003).

Quando a luz atinge um tecido biológico pode haver quatro tipos de interação (MISERENDINO e PICK, 1995; ZEZELL, 2001 apud DAMANTE, 2003):

- Absorção: a luz é absorvida por componentes do tecido como água, hemoglobina e melanina.
- Reflexão: parte da luz incidente é refletida e perdida.
- Espalhamento: parte da luz se espalha pelo tecido perdendo sua potência.
- Transmissão: A luz atravessa toda a espessura do tecido.

Os principais efeitos gerados pelo LBP nos tecidos têm natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia, vascularização, entre outros.

1.4.1 Terapia com laser de baixa potência (LBP)

As células possuem um limiar de sobrevivência, relacionado ao tecido o qual constituem e seu estado fisiológico. Quando se trabalha com *laser* respeitando esse limiar celular, lhes é oferecida uma baixa intensidade de energia e, portanto o *laser* é operado em baixa intensidade de potência. Por isso este *laser* é conhecido clinicamente

como “*laser* de baixa potência” ou “*laser* de baixa intensidade de energia” (LOPES, 2003).

As terapias com *laser* de baixa intensidade usam porções do espectro visível e infravermelho de luz. Os LBPs estão numa faixa do espectro que não é absorvida por muitos componentes do organismo e, por isso, possuem maior profundidade de penetração. Comprimentos de onda mais longos são mais resistentes ao espalhamento e penetram mais nos tecidos. A terapia a *laser* envolve usualmente exposições de $4\text{J}/\text{cm}^2$, o que significa uma penetração de 0,5 a 2,5cm podendo atingir até nervos, músculos e articulações (BASFOR, 1955 apud DAMANTE, 2003).

A terapia com LBP tem sido utilizada como uma alternativa no tratamento analgésico em indivíduos portadores de DTM (TULLBERG et al., 2003, SUN, TUNER, 2004; DEMEDEIROS et al., 2005; NUNEZ et al., 2006; GU et al.; 2006).

Nunez et al. (2006) realizaram um estudo com indivíduos que sofriam de DTM e foram expostos à terapia com LBP. Observaram que houve uma melhora significativa quanto ao controle de abertura da boca imediatamente após o tratamento.

Fikácková et al. (2007) realizaram um estudo em que pacientes portadores de DTMs foram submetidos a terapia com diversas dosagens de LBP de GaAIAs, e os grupos tratados com as doses de $10\text{J}/\text{cm}^2$ e $15\text{J}/\text{cm}^2$ mostraram uma significativa melhora em relação aos demais grupos. Resultados semelhantes também foram obtidos por Mazzetto et al. (2007) no controle da dor de indivíduos portadores da DTM.

O tratamento com LBP com doses de $2\text{J}/\text{cm}^2$ em indivíduos que sofriam de dor orofacial permitiu a De Medeiros et al. (2005) concluírem que o mesmo auxiliou na analgesia da doença.

Zeredo et al. (2003), realizaram um estudo com ratos para avaliar as propriedades analgésicas do LBP expondo os animais á 0,1J/cm² por 10 minutos. Os resultados mostraram que esta terapia foi efetiva no controle da dor e no reflexo de abertura da boca e concluíram que o laser deve ser usado como auxílio no controle da dor em diversos tratamentos dentários.

Herman e Khosla (1988) demonstraram em culturas normais de cartilagem articular bovina, que a terapia com LBP demonstrou-se potencialmente efetiva na regeneração do tecido cartilaginoso.

Spivak et al. (1992) e Torricelli et al. (2001), submeteram culturas de condroblastos de cartilagem articular caninas e bovinas ao tratamento com o LBP, onde, no primeiro estudo as culturas foram expostas a uma única dose de 51J/cm² e, no segundo estudo, foi utilizado um protocolo de 300J o qual foi distribuído em 5 dias. Ambos verificaram que a exposição das culturas promoveu um estímulo da síntese de matriz cartilaginosa e colágeno.

Outra possível causa da resposta positiva ao tratamento com o laser de baixa potência pode ser pelo fato deste promover um aumento da microcirculação como verificado por Tullberg et al. (2003).

Segundo Wong et al. (2005), a irradiação com o LBP aquece o tecido e altera fisicamente a matriz cartilaginosa provocando mudanças mecânicas.

Sabe-se que a cartilagem é um tecido de capacidade regenerativa limitada e existem várias técnicas para a estimulação do crescimento de um novo tecido para tratar doenças degenerativas e traumas. Isto se deve ao fato deste tecido apresentar poucas células e reduzida vascularização (WONG et al., 2005). Os principais efeitos

gerados pelo LBP nos tecidos têm natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia, vascularização, etc. Estudos prévios demonstraram que a terapia de irradiação com o LBP estimulou a produção de proteínas da matriz extracelular e o metabolismo de condrócitos (PULLIN et al., 1996; KAMALI et al., 2007).

A terapia com LBP tem se mostrado eficaz no tratamento de DTM e, por isto, torna-se imprescindível o conhecimento de suas ações sob o ponto de vista celular e tecidual.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar as possíveis alterações teciduais da ATM de ratos, após terapia com o laser de baixa potência.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um modelo de DTM experimental em ratos através do uso da toxina botulínica, de modo a obter-se um disco articular com as mesmas características de um disco articular acometido por esta doença para este e outros estudos de regeneração de fibrocartilagens;
- Testar um protocolo de aplicação do LBP;
- Verificar mudanças decorrentes de lesões ocasionadas no disco articular da ATM de ratos, previamente, tratada com a toxina botulínica, através do auxílio da microscopia de luz (ML) e da técnica de eletroforese;
- Verificar mudanças decorrentes do tratamento com o LBP que ocorrem no disco articular da ATM de ratos através do auxílio da microscopia de luz (ML) e da técnica de eletroforese.

3. JUSTIFICATIVA

A articulação temporomandibular representa uma rica fonte de estudo devido aos processos degenerativos e doenças que a acometem.

As DTM afetam uma grande parcela da população, em sua maioria mulheres. Estudos revelam que cerca de setenta e cinco por cento da população mundial adulta apresenta pelo menos um sintoma relacionado à disfunção temporomandibular (KULEKCIOGLU et al., 2003; BHUTADA, 2004; HOLMLUND, 2007; RODA et al, 2007).

Diferentes tratamentos são aplicados às DTM e associam-se a estas modificações celulares e teciduais. Entretanto, estas alterações ainda não estão esclarecidas totalmente e requerem comprovações sobre os efeitos no tecido.

O tecido cartilaginoso possui uma capacidade limitada de regeneração, e ainda não existem técnicas e métodos fidedignos que estimulem o crescimento de um novo tecido capaz de auxiliar o tratamento de traumas e doenças degenerativas (WONG et al., 2005). Torna-se necessário o desenvolvimento de modelos experimentais que possibilitem a investigação dos efeitos das terapias utilizadas nos tecidos tratados.

A terapia com o laser de baixa potência tem se mostrado efetiva, mas ainda há muito a se aprender sobre seus mecanismos, demonstrando que existe um potencial a ser explorado (SUN e TUNER, 2004). Com isto, propusemo-nos a estudar seus efeitos, de maneira que, os resultados possam permitir a elaboração de técnicas apropriadas para o tratamento das DTM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente trabalho está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 30 de junho de 2008, sendo protocolado sob o n° 1554-1.

Foram utilizados 24 ratos Lewis/Uni machos, com idade média de 60 dias e peso entre 300 e 350 gramas. Os animais foram obtidos por meio de fornecedor cadastrado do biotério CEMIB e, mantidos em gaiolas plásticas padrão, com livre acesso à água e ração.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos, conferindo 6 animais por grupo:

Grupo I (GC): grupo controle, no qual não foi realizado nenhum procedimento.

Grupo II (GD): grupo em que os animais foram submetidos à administração de toxina botulínica.

Grupo III (GL): grupo em que os animais receberam o tratamento com o laser de baixa potência.

Grupo IV (GDL): grupo em que os animais submetidos à administração de toxina botulínica e, em seguida, foram submetidos ao tratamento com o laser de baixa potência.

Para os procedimentos de morfologia e bioquímica foram utilizados três animais em cada grupo.

Foram mantidos apenas dois animais por gaiola, com o propósito de manter uma boa recuperação.

4.3 Administração da Toxina Botulínica

A toxina botulínica foi aplicada unilateralmente com a finalidade de provocar a paralisia temporária do músculo masseter esquerdo dos animais, de maneira a proporcionar um déficit nos movimentos mastigatórios da região esquerda da ATM, o que conseqüentemente acarretou hiperfunção da porção direita da mesma, lesando, portanto o disco articular correspondente, o qual passou a apresentar características de um disco articular de portadores de DTM, trinta dias após a aplicação da toxina botulínica.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de 1:1 de Ketamina (70mg/Kg) e Xylazina (10 mg/Kg). Um frasco contendo 100 unidades de toxina botulínica (Prosigne ®) liofilizada, foi reconstituído com a instilação de 2 ml de solução salina normal (50 unidades/ml)(SHEN et al, 2006, KIM et. al, 2008).

Após a anestesia, os animais receberam uma dose de 6 unidades/kg de peso, que conferiu um volume de injeção de 20µl por animal (SHEN et al, 2006). Foi utilizada uma seringa Hamilton de 25µl para a administração unilateral da droga no músculo masseter esquerdo dos animais.

4.4 Técnica de aplicação do Laser de Baixa Potência

O equipamento utilizado foi o Twin Flex da marca MM Optics. O Laser de GaAlAs possui comprimento de onda de 780 nm, e foi programado para atuar com uma potência de 50 mW.

Os animais foram imobilizados manualmente e receberam uma aplicação unilateral no músculo masseter direito, oposto à aplicação da toxina botulínica, de 10 J com duração de 8 segundos, num período de sete dias, respeitando-se sempre o mesmo horário, o mesmo aparelho e acessórios. Ao final do tratamento, obtêm-se uma dosagem ideal recomendada para distúrbios da ATM de 70 J/cm². (LIZARELLI, 2007; FIKÁCKOVÁ et al., 2007).

Após a última sessão, os animais sofreram eutanásia com aprofundamento de anestesia, para a remoção do disco articular da ATM direita. Os tecidos subcutâneos e músculos foram cuidadosamente afastados para exposição do mesmo que por sua vez foi retirado do animal para análises subseqüentes.

4.5 Análise Morfológica

Após a dissecação, o disco articular submetido á terapia com o LBP foi transferido para um recipiente e fixado em solução de paraformaldeído 4%, pH 7,4 durante 24 horas a 4°C.

Em seguida, as peças foram lavadas em água, seguindo para desidratação em banhos de concentrações crescentes de álcool, posterior diafanização com banhos de xilol e um processo de inclusão em parafina rotineiro. Após estas etapas, foram realizados cortes transversais de 7µm de espessura.

4.5.1 Coloração em Hematoxilina-eosina (HE)

As lâminas contendo os cortes histológicos foram mergulhadas em solução de Hematoxilina por quatro minutos, lavadas em água corrente, e posteriormente mergulhadas em Eosina por trinta segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em uma seqüência alcoólica (70, 80, 95, 100%), mergulhadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá (KIERNAN, 1981).

A hematoxilina é um corante básico que carrega uma carga positiva na porção da molécula que irá conferir cor ao tecido. Corantes básicos reagem com componente aniônicos das células e tecidos, os quais incluem grupos fosfatos, ácidos nucléicos, grupos sulfatos de glicosaminoglicanas e grupos carboxila das proteínas. Estruturas celulares que podem ser coradas com corantes básicos incluem heterocromatina,

nucléolo, RNA ribossômico, matriz extracelular da cartilagem. A hematoxilina cora geralmente as estruturas em azul. Corantes ácidos reagem com componentes catiônicos das células e tecidos. Quando usados juntamente com corantes básicos como a hematoxilina, coram o citoplasma, filamentos citoplasmáticos e fibras extracelulares. A eosina geralmente cora as estruturas em vermelho ou rosa (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).

4.5.2 Coloração em Azul de Toluidina (AT)

O azul de toluidina é um corante básico. Esta coloração tem por função detectar proteoglicanos (PG). A coloração foi com AT 0,025% em tampão MacIlvaine pH 4,0. As lâminas foram deixadas na solução corante por 15 minutos, lavadas no próprio tampão, colocadas para secar ao ar, mergulhadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá (MELLO e VIDAL, 1980).

4.5.3 Coloração em Picrosirius

Este método baseia-se na utilização do Sirius Red que é um corante vermelho escuro fortemente ácido em associação com o ácido pícrico. Em tecidos corados com Sirius Red os grupamentos sulfônicos reagem com grupamentos amínicos das moléculas de lisina do colágeno, de tal modo que as moléculas do corante se dispõem paralelamente às moléculas alongadas de colágeno (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).

Alterações na organização molecular colagênica podem ser observadas com a microscopia de luz polarizada, que nos informa a morfologia e direção das fibras, sua distribuição e o grau de empacotamento, pelo fenômeno da birrefringência (VIDAL, 1987).

As lâminas foram desparafanizadas em xilol, hidratadas em uma bateria de álcoois coradas por aproximadamente 15 minutos em Picrosirius, lavadas em água corrente, receberam coloração de fundo em Hematoxilina de Harris por 5 minutos, novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

Neste método os componentes fibrilares contendo moléculas orientadas de colágeno aparecem como estruturas brilhantes contra um fundo escuro quando analisadas em microscópio sob a luz polarizada. Regiões mais espessas exibem uma coloração de interferência vermelha e maiores taxas de absorbância. Regiões em que as fibras de colágeno apresentaram-se menos compactadas e conseqüentemente menos espessas apresentam coloração do vermelho, passando pelo amarelo até o verde (VIDAL, MELLO, PIMENTEL, 1982).

4.5.4 Análise da Imagem

A captura e análise das imagens foram realizadas por meio de um microscópio de luz da marca Nikon modelo Eclipse E800 e de uma câmera acoplada a este. Para a observação das lâminas coradas com Picrosirius foi também utilizado um filtro de polarização encaixado ao microscópio.

4.6 Análise Bioquímica

4.6.1 Extração dos componentes da matriz extracelular do disco articular

O tecido logo que retirado do animal foi dissociado com o auxílio de um bisturi sobre uma placa de petri mantida em torno de 4°C para diminuir o risco de proteólise.

Após rápida lavagem em PBS (NaCl 0,15 M em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 com EDTA 50 mM), o material foi secado com papel de filtro e pesado. O material foi extraído com 15 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4M contendo 0,05 M de EDTA, 1nM de PMSF em tampão acetato 0,05 M pH 5,8 (HEINEGARD e SOMMARIN, 1987), por 24 horas, sob temperatura de 4°C em constante agitação.

Após extração o material foi centrifugado em 12000 r.p.m., durante 60 minutos, a 4° C em centrífuga Beckman J2-21 (Rotor JA-20). O sobrenadante contendo o material extraído em GuHCl, foi utilizado para dosagem de proteínas não-colagênicas e SDS-PAGE.

4.6.2 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas extraídas foram analisadas em gel de poliácrlamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), com gradiente (4-16%) de poliácrlamida segundo o método descrito por Zingales (1984). O sistema de tampão foi utilizado de acordo com Laemmili (1970), com gel de empacotamento contendo 3,5% de acrilamida. Amostras

de 50µl dos diferentes extratos foram precipitados em 100µl de tampão acetato de sódio 0,5M pH 7,4, contendo 9 volumes de etanol, durante 24 horas a 4°C. Após este tempo as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga Fischer Scientific Model 235 Va 8.000, a 9.000 rpm por cinco minutos e lavadas com 150µl de tampão acetato 0,5 M pH 7,4 e nove volumes de etanol. O precipitado obtido foi seco em estufa a 37°C e ressuspenso em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1 mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01%. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C.

O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi de Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1% em pH 6,8. A corrente elétrica aplicada foi de 30 mA para cada gel. Os padrões de peso molecular foram analisados em paralelo, contendo albumina sérica bovina (64kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), β-lactoalbumina (14,4 kDa). Para o padrão de colágeno foi empregado o colágeno tipo I extraído do tendão da cauda de rato, sendo que foram aplicados 80 µl no gel. Após a corrida o gel foi fixado em metanol 50%, ácido acético 12% durante duas horas, e em seguida corado por Coomassie Brilliant Blue-R (CBB-R-250) 0,25%, 50% de metanol e 7% de ácido acético. O gel foi descorado em solução de 50% metanol e 10% ácido acético.

4.6.3 Dosagem de Proteínas não colagênicas pelo método de Bradford

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G 250. Como padrão foram empregadas diferentes soluções de albumina bovina (BSA), nas concentrações: 10; 20; 40; 80; 100; $\mu\text{g/ml}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da HP em 595 nm, onde utilizou-se 4 μl de amostra.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Minitab 12, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise Morfológica

5.1.1 Coloração com Hematoxilina-eosina

Foram realizados cortes transversais de 7 μ m de espessura. Esta coloração tem por objetivo demonstrar o aspecto geral do tecido (Fig.1).

Na figura 1A, o grupo controle (GC), no qual não foi realizado nenhum experimento e nos serviu de padrão, o aspecto morfológico do tecido demonstrou a existência de fibroblastos aderidos à matriz extracelular dispostos de maneira orientada ao longo de um eixo.

O grupo em que os animais receberam a administração da droga, nos conferiu o grupo do disco característico de disfunção temporomandibular, constituindo, portanto o grupo controle da disfunção (GD). Neste grupo pode-se observar (Fig. 1B) que ocorreu um desarranjo na organização dos fibroblastos, bem como na orientação da produção de matriz extracelular, também foi observada a diminuição aparente da quantidade de fibroblastos no tecido.

O grupo tratado com o laser de baixa potência (GL), e que não foi submetido ao modelo de disfunção temporomandibular, apresentou, como mostra a figura 1C, fibroblastos que se encontram, assim como a matriz extracelular, orientados e dispostos paralelamente, bem como foi observado no GC.

A figura 1D, representa um corte histológico referente ao grupo modelo de disfunção tratado com o laser de baixa potência (GDL). Neste observa-se grande quantidade de matriz extracelular interposta entre as células, quantidade aparentemente superior à observada nos grupos GC, GD e GL, bem como uma aparente diminuição do número de células. Os fibroblastos apresentam uma aparente hipertrofia e, bem como a matriz extracelular encontram-se orientados.

5.1.2 Coloração com Azul de Toluidina

Nas lâminas coradas com azul de toluidina pode-se observar as GAGs presentes na matriz extracelular no tecido do disco articular.

O GC possui um conteúdo relativamente pequeno de GAGs. O GD (Fig. 1F) quando comparado ao GC (Fig. 1E) em relação à disposição e aparente quantidade de GAGs apresenta-se mais corado, indicando o aumento na produção destas pelas células do tecido após a disfunção induzida.

O GL (Fig. 1G) quando comparado ao GC (Fig. 1E) não apresentou diferenças quanto ao conteúdo de disposição de GAGs na matriz extracelular do disco articular.

Por sua vez, o GDL (Fig. 1H) comparado ao GD (Fig. 1F) não apresentou diferenças aparentes no conteúdo de GAGs em sua matriz extracelular. Porém observou-se um maior conteúdo de GAGs em relação ao GC (Fig. 1E) e GL (Fig. 1G), além de uma acentuada hipertrofia celular onde o citosol apresenta-se fortemente corado, indicando uma grande quantidade de ribossomos associados à síntese de proteoglicanos.

5.1.3 Coloração com Picrosirius

As lâminas coradas com picrosirius quando examinadas sob luz polarizada revelam a orientação e grau de compactação do componente colagênico da matriz extracelular dos discos articulares.

O Grupo GC apresentou feixes espessos e orientados de colágeno tipo I, como pode ser observada na figura 1I, onde a coloração vermelho-alaranjada indica alto grau de compactação das fibras.

No GD (Fig. 1J), as fibras colágenas apresentam-se também orientadas em feixes ao longo de um eixo, porém de coloração esverdeada indicando um menor grau de compactação das fibras colágenas tipo I deste tecido.

O grupo GL apresentou uma diferente disposição do colágeno tipo I em sua matriz (Fig. 1K) quando comparado ao GC (Fig. 1I) e GD (Fig 1J), estes pareceram não estar orientados em fibras, além de estarem em menor quantidade. O aspecto das lâminas observadas demonstrou fibras coradas fortemente de vermelho, indicando alto grau de compactação do colágeno tipo I, porém pode-se observar uma desorganização das fibras, que agora não se encontram orientadas ao longo de um eixo.

O grupo portador de disfunção que foi submetido ao tratamento com o laser de baixa potência (GDL), apresentou fibras colágenas tipo I desorganizadas, porém espessas e bastante compactadas (Fig. 1L), fato semelhante ao que foi observado no GL (Fig. 1K).

5.2 Análise Bioquímica

5.2.1 Eletroforese em gel SDS poliacrilamida (SDS PAGE)

As amostras do material extraído foram analisadas em gel SDS poliacrilamida. Os resultados estão expressos no gel SDS PAGE como mostra a figura 2.

Com relação ao colágeno, podem-se observar diferenças entre os grupos principalmente referentes às cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$. O GL mostrou uma banda menos evidente quando comparado ao GC.

A banda de colágeno referente ao GD mostrou-se menos evidente que a banda correspondente ao GC, GL e GDL.

Em contrapartida o GDL, apresentou uma banda menos evidente de colágeno comparado ao GC. Porém, quando comparado ao GL e GD este apresentou uma banda mais evidente de colágeno.

Uma banda de aproximadamente 60 kDa, possivelmente o fibromodulim, um proteoglicano de baixo peso molecular apresentou-se mais evidente nos grupos GC e GDL.

O GD evidencia uma diminuição do conteúdo de proteínas de menor peso molecular (entre 14,4 e 20,1), possivelmente pequenos proteoglicanos, quando comparado aos demais grupos.

5.2.2 Dosagem de proteínas não colagênicas pelo método de Bradford

Os resultados referentes à dosagem de proteínas não colagênicas podem ser observados na tabela 1, onde são expostos os dados referentes às médias das concentrações de cada grupo estudado.

Estes dados foram tratados estatisticamente pelo programa Minitab 12, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com $p < 0,05$, com o objetivo de se observar diferenças nas concentrações destes componentes protéicos.

Os valores de p obtidos foram expressos na tabela 2. O GC quando comparado ao GL apresentou diferenças estatisticamente significantes. O GL indicou possuir uma menor quantidade de proteínas não colagênicas quando comparado ao GC.

Num confronto entre os valores de GD e GDL, estes não obtiveram diferenças estatisticamente significativas.

Ao comparar-se o GC com o GD, também não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa. O mesmo pode ser observado entre os grupos GC e GDL, que obtiveram valores bem próximos; e entre os grupos GL e GD.

O grupo GDL, quando comparado ao GL, apresentou uma quantidade estatisticamente maior de proteínas não colagênicas.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho estudamos a importância da aplicação do laser de baixa potência no disco articular da ATM de ratos submetidos à disfunção temporomandibular induzida. Os dados serão apresentados de maneira a caracterizar cada grupo sob os diversos aspectos avaliados.

O disco articular da ATM possui a principal função de proporcionar a adaptação entre as superfícies ósseas que se articulam (TESTUT, 1932), além de possuir importantes propriedades biomecânicas como, por exemplo, amortecer choques (PICOSSE, 1971; HANAOKA, 2005). Sabe-se que o disco articular é uma placa oval constituída de tecido conjuntivo composto basicamente de fibras colágenas, elásticas, proteoglicanas condroitim sulfato de alto peso molecular e água (FUJITA E HOSHINO, 1989). Relacionada diretamente à demanda funcional exigida, as células do disco articular e seus componentes de matriz extracelular sofrerão alterações para proporcionar as adaptações necessárias.

O GC foi utilizado de maneira a servir de comparação aos demais grupos experimentais. Estudos de morfologia com lâminas coradas em HE evidenciaram a presença de fibroblastos em todo o disco articular. Por sua vez, estas células que são responsáveis pela produção de MEC, encontraram-se aderidas à matriz sintetizada num arranjo orientado ao longo de um eixo, de maneira a reforçar o disco articular, conforme foi observado também por Detamore em 2003.

A coloração em AT foi realizada com o objetivo de se observar os GAGs presentes no tecido. O conteúdo dos mesmos nos discos articulares do GC foi pouco expressivo, característicos de tecidos de natureza fibrocartilaginosa, concordando com Paegle (2003), que também observou nestas estruturas uma elevada proporção de colágeno, bem como em nossas observações em lâminas coradas em picrosirius. As fibras colágenas são flexíveis, mas possuem alta resistência à tração, sendo vitais para as propriedades biomecânicas desta articulação de maneira a proporcionar o bom funcionamento.

A coloração em Picrosirius para visualizar fibras de colágeno baseia-se na utilização do Sirius Red que é um corante vermelho escuro fortemente ácido de molécula alongada. Foi demonstrado que quando os tecidos são corados com Sirius Red, seus grupamentos sulfônicos reagem com os grupamentos amínicos das moléculas de lisina do colágeno. Desse modo, as moléculas do corante se dispõem paralelamente às moléculas alongadas de colágeno que são normalmente orientadas em uma só direção (JUNQUEIRA, 1983). Estudos realizados por Vidal, Mello e Pimentel (1982), relativos a dicroísmo linear e birrefringência, observaram que o brilho da birrefringência e as cores de interferência (retardos óticos), são diretamente proporcionais à espessura e o estado de empacotamento de materiais que possuem capacidade de formar feixes orientados. O colágeno I observado sob o picrosirius apresentou regiões mais espessas que exibiram uma coloração de interferência vermelha e maiores taxas de absorbância. Regiões em que as fibras de colágeno apresentaram-se menos compactadas e conseqüentemente menos espessas apresentaram coloração do amarelo até o verde, sugerindo que as cores de

interferência dependem da espessura das fibras de colágeno e grau de empacotamento (VIDAL, MELLO, PIMENTEL, 1982).

Os discos articulares do GC têm como principal constituinte da MEC o colágeno tipo I, o qual se apresentou em feixes organizados com alto grau de compactação de suas estruturas dada à coloração vermelho-alaranjada como também foi observado por Fujita em 1989 e Tanaka em 2003.

É sabido que os músculos possuem um importante papel tanto na adaptação quanto na degeneração de articulações, e desordens que afetem os músculos, como a hiperatividade através de atividades que excedam o limiar da articulação envolvida, podem ocasionar respostas degenerativas por parte desta (BOOTH, 1982; TABER, 1995; HERZOG, 2003) e, conseqüentemente, gerar um microtrauma do disco articular (OKESSON, 1992; HERZOG, 2003; FINK, 2007; MATIC, 2007).

A toxina botulínica do tipo A, quando utilizada em doses terapêuticas, produz uma paralisia muscular localizada, pela inibição da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (GRACIES, 2000; KLEIN, 2003; CARRUTHERS, 2003). Devido sua ação farmacológica vem sendo utilizada em diversos estudos como modelo experimental em distintas doenças, em especial para se estudar os efeitos da atrofia muscular temporária e suas implicações (KLEIN, 2003; HERZOG, 2003; LONGINO, 2005; WARNER, 2006; KWON, 2007; CHOI, 2007).

Com o objetivo de se criar um modelo satisfatório para o estudo das DTM e seus efeitos na ATM, propusemo-nos a realizar a aplicação unilateral da toxina botulínica no músculo masseter de ratos para gerar paralisia temporária do mesmo e,

conseqüentemente, induzir a hiperatividade muscular da porção oposta ocasionando uma DTM.

Esta hipótese baseia-se em estudos que verificaram que a mastigação unilateral consiste em um fator etiológico das DTM (ZANG, 2003).

Ao observarmos o disco articular da ATM dos animais submetidos à DTM induzida (GD) sob ML, verificamos uma aparente diminuição no número de fibroblastos, além de uma desorganização na sua distribuição bem como da MEC, onde o arranjo orientado ao longo de um eixo não foi observado.

Nas lâminas coradas com AT, observou-se o aparente aumento da proporção de GAGs no tecido. Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Huang em 2002 e Paegle et al., (2003), porém discorda dos encontrados por Axelsson em 1992 que observou uma diminuição do conteúdo de GAGs nos indivíduos com DTM.

Nas lâminas coradas com picosirius observou-se que apesar das fibras colágenas tipo I manterem sua orientação ao longo de um eixo, estas se encontravam num menor grau de compactação indicando a possível degradação deste componente tissular no disco articular dos animais do GD. Em concordância com estas evidências, dados do gel de SDS Page revelaram uma banda menos evidente de colágeno quando comparado aos demais grupos, indicando a degradação deste componente da MEC. A degradação de componentes constituintes de matriz do disco articular é um dos principais sinais evidenciados no indivíduo com DTM, conforme Tanaka e Van Eijden, (2003).

Acreditamos que todo processo de dano ocasionado ao disco articular da ATM provocou mudanças na conformação e composição bioquímica, gerando um aumento

de GAGs. Possivelmente este fato tenha ocorrido em resposta ao estresse mecânico, de maneira a conferir reforço às regiões desprovidas de colágeno do disco articular.

Os dados estatísticos referentes à dosagem de proteínas não colagênicas revelaram que o conteúdo das mesmas não foi estatisticamente diferente quando comparado aos demais grupos, inclusive o controle. Tal achado pode ser explicado pelo fato de que, o tecido submetido à lesão sofreu uma degradação intensa de colágeno tipo I, seu componente mais abundante e que confere reforço ao mesmo, enquanto proteínas de natureza não colagênica, como as próprias proteoglicanas, que apresentaram um aparente aumento de concentração, ou mesmo proteínas expressas em processos inflamatórios decorrentes da lesão, podem ter contribuído com este resultado.

Tais achados nos permitem concluir que o modelo de DTM proposto para o estudo do disco articular atendeu às nossas expectativas e mostrou-se fidedigno para o estudo desta doença, visto que tecidos de natureza cartilaginosa, como a fibrocartilagem característica do disco articular da ATM possuem limitada capacidade regenerativa (WONG, 2005) e uma das causas das DTM é a degeneração que ocorre no disco articular.

O laser de baixa potência (LBP) vem sendo amplamente utilizado como tratamento analgésico em indivíduos portadores de DTM (TULLBERG, 2003; ZEREDO 2003; TUNER, 2004; DEMEDEIROS, 2005; NUNEZ, 2006; GU, 2006; FIKÁCKOVA, 2007; MAZZETO, 2007), e têm-se obtido resultados positivos na melhora da dor relatada pelos pacientes.

Como é sabido, o LBP oferece uma intensidade de energia que respeita o limiar fisiológico das células do tecido em questão (LOPES, 2003). A fim de avaliar seus efeitos sobre o tecido do disco articular, optamos pela utilização do referido aparelho.

Os resultados do GL observados nas lâminas coradas em HE, não revelaram nenhuma diferença aparente quando comparado ao GC, a MEC bem como as células do disco encontraram-se orientados ao longo de um eixo. Sob a coloração em AT também não foi observada nenhuma diferença aparente entre GL e GC. A irradiação com o LBP não foi capaz de provocar no tecido íntegro do disco articular nenhuma mudança aparente em seus componentes, no que diz respeito a estas colorações utilizadas.

Nas lâminas coradas com picrossirius ocorreram modificações em relação à organização do colágeno do disco. Quando comparados às do GC foi observada uma desorganização estrutural do arranjo característico das fibras de colágeno tipo I, possivelmente devido à estimulação do LBP, porém nenhuma modificação quanto ao grau de compactação das fibras.

Os resultados referentes ao gel SDS Page revelaram uma menor expressibilidade da banda de colágeno do GL quando comparado ao GC e ao GDL, indicando que, o LBP além de provocar modificações estruturais, ainda diminuiu, aparentemente, o conteúdo de colágeno dos discos analisados, resultado semelhante ao encontrado nos cortes corados com picrossirius, apesar do mesmo apresentar uma banda mais expressiva quando comparado ao GD.

Quanto à dosagem de proteínas não colagênicas, o GL foi o que apresentou menor quantidade e, quando submetido à análise estatística revelou-se

significativamente menor que o GC e que o GDL, indicando que o LBP inibiu a síntese destas proteínas pelas células do disco.

Os discos articulares da ATM dos animais do grupo modelo de disfunção que foi submetido ao tratamento com o LBP (GDL), foram observados ao ML e revelaram um aumento aparente da quantidade de matriz extracelular quando comparados aos demais grupos, inclusive o GL. Por sua vez, a MEC juntamente com os fibroblastos presentes no disco articular, encontraram-se dispostos de maneira orientada, restituindo esta característica peculiar ao disco articular normal, nos discos articulares dos animais com DTM.

O conteúdo de GAGs revelou-se equivalente ao que foi observado nos cortes corados em AT do GD, porém aparentemente maior que GC e GL. Em GDL observou-se hipertrofia dos fibroblastos e citosol fortemente corado, indicando uma elevada concentração dos ribossomos, associados à síntese de proteoglicanos. Tais achados sugerem que a terapia com o LBP não foi eficaz neste quesito a ponto de restituir as características do tecido.

As lâminas coradas com picrossirius não apresentaram uma coloração esverdeada, como observado nos espécimes do GD, e sim uma coloração vermelho-alaranjada, indicando o maior grau de compactação destas fibras. Tal fato nos permite sugerir que a terapia com o LBP impediu que continuasse ocorrendo degradação deste componente do disco, porém não foi capaz de restituir o arranjo orientado característico dos discos articulares íntegros.

Os dados bioquímicos expressos no gel SDS Page estão de acordo com os morfológicos e indicam um aumento de colágeno do GDL quando comparado ao GD e

GL apesar de ser uma banda menos evidente quando comparada ao GC. Pode-se observar características interessantes no que diz respeito a uma banda de aproximadamente 60 kDa. Esta banda mostrou-se mais expressiva no GDL e GC que nos grupos GL e GD. Pode-se sugerir que esta banda corresponda a um pequeno proteoglicano, possivelmente o fibromodulim, que possui papel complementar à decorim modulando a fibrilogênese do colágeno (COMPER, 1996; CARVALHO, RECCO-PIMENTEL, 2001).

Não houve diferenças estatísticas quanto aos valores para a dosagem de proteínas não colagênicas não se revelou estatisticamente diferente quando comparada aos grupos GD e GC, porém mostrou-se estatisticamente maior quando comparada ao GL. Este fato pode ser explicado pela produção de proteínas ocasionada pelo estresse mecânico da articulação pela DTM induzida pré-tratamento.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, o modelo experimental proposto de DTM apresentou características peculiares ao disco articular de indivíduos portadores dessa doença (AXELSSON et al., 1992; HUANG et al., 2002; PAEGLE ET AL., 2003) compatíveis com as já descritas na literatura como: diminuição no número de células, desorganização geral da orientação das células e MEC, aumento no conteúdo de GAGs, degradação do colágeno presente no tecido. Acreditamos então, que se trata de um modelo fidedigno para o estudo do tecido do disco articular de indivíduos com DTM, bem como do efeito de terapias sobre o mesmo.

A terapia com o LBP quando realizada sob o tecido íntegro não apresentou modificações do que diz respeito ao conteúdo de GAGs, fibroblastos e orientação de MEC, porém provocou aparente diminuição do conteúdo de colágeno, além de

desorganização do arranjo das fibras. Houve também diminuição do conteúdo de proteínas não colagênicas quando comparado aos grupos GC e GDL. Sugerimos que tais eventos possam ter ocorrido pelo fato do estímulo do *laser*, na dosagem utilizada e, no tecido íntegro, ter prejudicado o funcionamento normal das células do tecido irradiado, alterando assim a síntese de componentes importantes, em especial o colágeno I.

Em tecidos submetidos à DTM experimental a terapia com o LBP teve resultados díspares. Houve um aumento do conteúdo de MEC em comparação com os demais grupos, e os componentes (células e ME) encontraram-se orientados. O conteúdo de GAGs foi semelhante ao GL, provando que tal característica não pode ser solucionada com a terapia. Quanto ao colágeno, o GDL apresentou características semelhantes ao GL indicando que o *laser* age sobre as propriedades de síntese do colágeno, modificando seu aspecto organizacional, porém não permitiu que o processo de dano e degradação deste componente continuasse. Concomitantemente, houve o aumento na quantidade do proteoglicano fibromodulim, responsável pela modulação da síntese do componente colagênico.

Quanto às proteínas não colagênicas o GDL apresentou valores semelhantes ao GC e GD, porém maiores que o GL, reforçando a hipótese de que o LBP inibe a síntese destas proteínas. Todavia, o processo de dano ocasionado no disco, bem como o aumento do conteúdo de GAGs contribuem para resultados semelhantes aos grupos GC e GD.

Cabe ressaltar que, o tempo de exposição do animal à terapia, que consistiu de 10 J/dia, durante sete dias ininterruptos, totalizando um tratamento de 70 J/cm²,

conforme protocolo proposto por Lizarelli, (2007) e Fikácková et al., (2007), deve ser revisto. Sugerimos que outros protocolos sejam testados, pois como foi observada, a referida terapia teve a capacidade de promover modificações teciduais, e estudos que adéqüem os protocolos de tratamento podem ser de grande benefício para portadores de DTM e outras doenças degenerativas das articulações.

7. FIGURAS

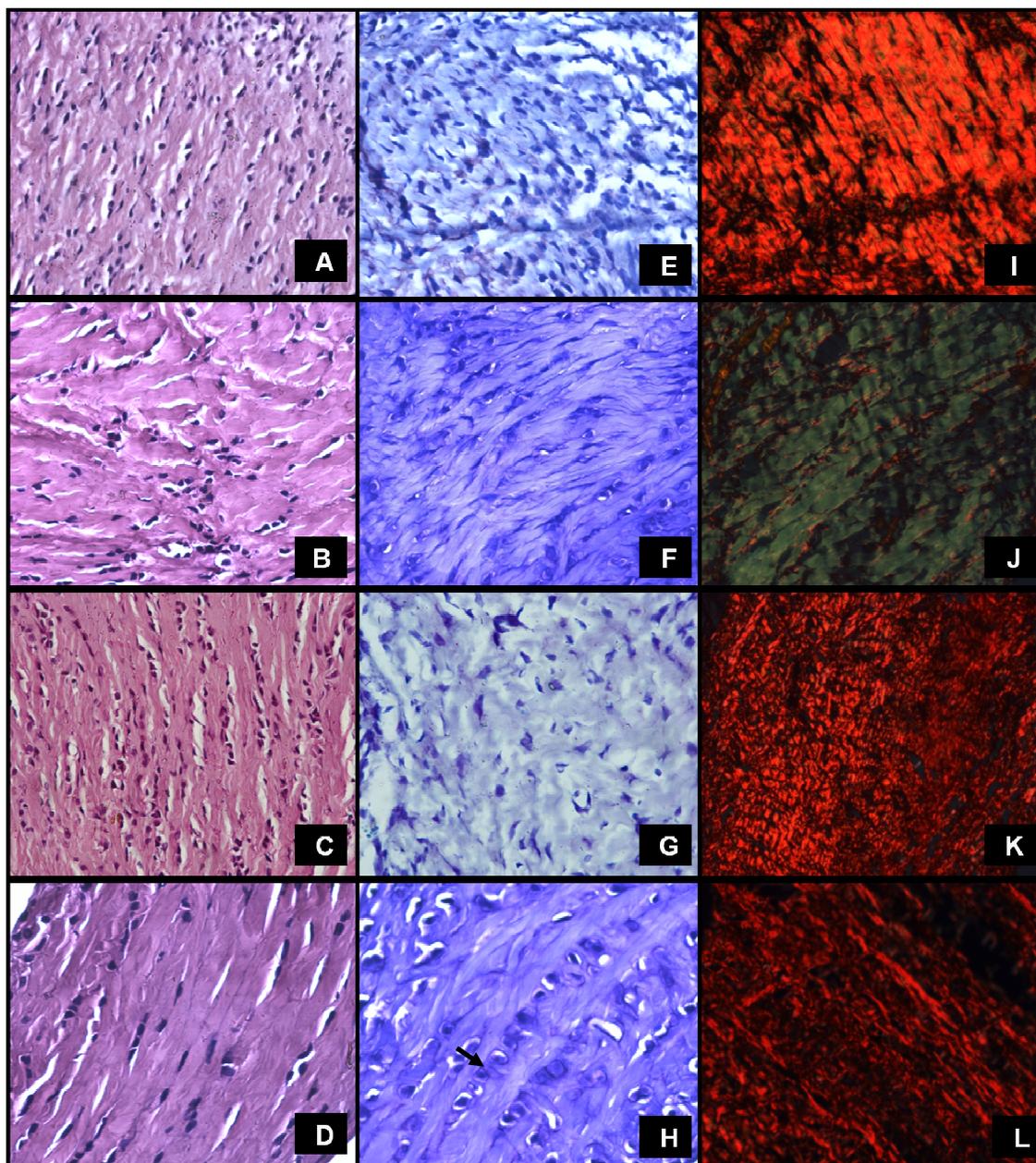


Fig. 1: Histological views of the TMJ articular disk of male Lewis rats. Coloração em HE, onde: A:GC, B:GD, C:GL e D:GDL. Coloração em AT, onde: E:GC, F:GD, G:GL e H:GDL. Em 2H observa-se o citosol fortemente corado indicando a atividade intensa de ribossomos, associados à síntese de proteoglicanos (seta). Coloração em Picrosirius, onde: I:GC, J:GD, K:GL e L:GDL. Aumento 400X.

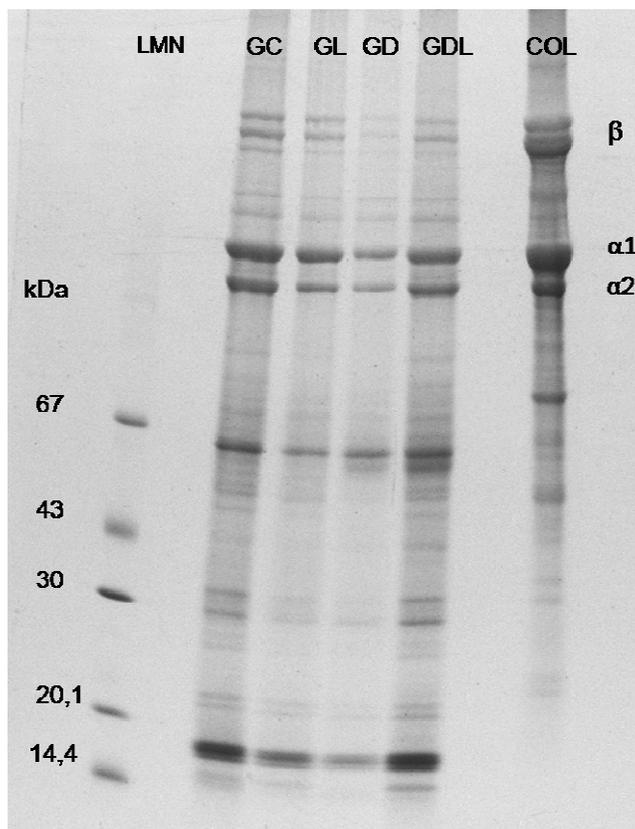


Fig.2: Gel SDS PAGE representando no centro as amostras dos grupos GC: Grupo controle; GL: Grupo laser; GD: Grupo disfunção; GDL: Grupo disfunção e laser, respectivamente.

Col: Amostra padrão de colágeno tipo I

β : Banda resultante de duas cadeias α .

$\alpha 1$ e $\alpha 2$: Cadeias α de colágeno.

LMN: Amostra padrão de proteínas de baixo peso molecular medidos em kDa (Kilodáltons)

8. TABELAS

Tabela 1: Valores das médias das concentrações de proteínas não colagênicas, obtidos pelo método de Bradford.

| Grupos | Valores das médias |
|---------------|---------------------------|
| GC | 25,688 |
| GD | 20,705 |
| GL | 14,853 |
| GDL | 20,705 |

Tabela 2: Comparações estatísticas entre as médias das concentrações de proteínas não colagênicas, onde $p < 0,05$.

| Grupos | Valores de p |
|---------------|---------------------|
| GC x GL | 0,012 * |
| GC x GD | 0,202 |
| GC x GDL | 0,846 |
| GD x GDL | 0,194 |
| GD x GL | 0,084 |
| GL x GDL | 0,007* |

* Estatisticamente significativo

9. CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais e nos resultados obtidos podemos concluir que:

- O modelo de DTM proposto atendeu às nossas expectativas e mostrou-se fidedigno para o estudo desta doença, o que nos permite sugerir um novo protocolo de indução de DTM em ratos;

- Sob o ponto de vista morfológico e bioquímico, ocorreram modificações celulares e de matriz extracelular do disco articular nos animais com DTM, tanto no que diz respeito ao conteúdo quanto ao arranjo dos mesmos, em resposta ao estresse mecânico provocado;

- A terapia com o LBP nos discos articulares íntegros da ATM demonstrou modificação no arranjo estrutural das fibras de colágeno tipo I, além da diminuição considerável na concentração de proteínas não colagênicas;

- Em discos articulares submetidos à DTM experimental, o LBP promoveu um desarranjo das fibras colágenas tipo I, semelhante ao encontrado nos animais do GL, porém, foi capaz de impedir a degeneração do colágeno presente no disco e estimulou a síntese deste importante componente de MEC;

- A terapia com o LBP teve a capacidade de promover modificações teciduais importantes, porém são necessárias novas investigações, de maneira a adequar os protocolos de tratamento que podem ser de grande benefício para portadores de DTM e outras doenças degenerativas das articulações.

10. REFERÊNCIAS

ALLEN, K.D.; ATHANASIOU, K.A. Tissue engineering of the TMJ disc: A Review. **Tissue Engineering**, v.12, n.5, p.1183-1196, 2006.

AXELSSON, S.; HOLMLUND, A.; HJERPE, A. Glycosaminoglycans in normal and osteoarthrotic human temporomandibular joint disks. **Acta Odontol Scand**, v.50, n.2, p.113-119, 1992.

BAKKE, M.; MOLLER, E.; WERDELIN, L.M.; et. al. Treatment of severe temporomandibular joint clicking with botulinum toxin in the lateral pterygoid muscle in two cases of anterior disc displacement. **Oral. Surg. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.100, n.6, p.693-700, 2005.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. **Lasers Surg. Med.**, v.16, p.331-342, 1995, apud DAMANTE, C.A. **Avaliação clínica e histological dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAIs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos**. Bauru: Ed. USP, 2003. 92p.

BERKOVITZ, B.K.B.; PACY, J. Age changes in the cells of the intra-articular disc of the temporomandibular joints of rats and marmosets. **Archives of Oral Biology**, v.45, p.987-995, 2000.

BERMEJO-FENOLL, A.; SÁEZ-YUGUERO. Diagnóstico diferencial de los desórdenes temporomandibulares (DTM). **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.10, p.468-469, 2005.

BHIDAYASIRI, R., TRUONG, D.D. Expanding use of botulinum toxin. **Neurol. Sci.**, v.235, n.1-2, p.1-9, 2005.

BHUTADA, M.K. Functions of the lateral pterygoide muscle. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, v.17, p.68-69, 2004.

BOOTH, F.W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.52, p.1113-1118, 1982.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

CARRUTHERS, J., CARRUTHERS A. Aesthetic botulinum A toxin in the mid and lower face and neck. **Dermatol Surg**, v.29, p.468-476, 2003.

- CARVALHO, H.F., RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula 2001**. 1ed. Editora Manole Ltda, p. 217-227, 2001.
- CETINER, S., KAHRAMAN, S.A. YÜCETAS, S. Evaluation of low level laser therapy in the treatment of temporomandibular disorders. **Photomed Laser Surg.** v.24, n. 5, p.637-641, 2006.
- CHERINGTON, M. Botulism: update review. **Semin Neurol**, v.24, n.2, p.155-163, 2004.
- CHILDERS, M.K. Targeting the neuromuscular junction in skeletal muscles. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.**, v.83, p.38-44, 2004.
- CHOI, W.H.; SONG, C.W.; KIM, Y.B.; et. al. Skeletal muscle atrophy induced by intramuscular repeated dose of botulinum toxin type A in rats. **Drug Chem. Toxicol**, v.30, n. 3, p.217-227, 2007.
- COMPER, W.D. **Extracellular Matrix: Molecular Components and Interactions**. 1ed. Harwood Academic Publishers, v.2, p. 200-229, 1996.
- COOPER, B.C., KLEINBERG, I. Examination of a large patient population for the presence of symptoms and signs of temporomandibular disorders. **Cranio**. v. 25, n.2, p.114-126, 2007.
- DAMANTE, C.A. Avaliação clínica e histológica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de São Paulo (Faculdade de Odontologia de Bauru), Bauru, SP, 2003.
- De MEDEIROS, J.S.; VIEIRA, G.F.; NISHIMURA, P.Y. Laser application effects on the bite strength of the masseter muscle, as an orofacial pain treatment. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.4, p.373-376, 2005.
- DENG, Y.M., FU, M.K., HÄGG, U. Prevalence of temporomandibular joint dysfunction (TMJD) in Chinese children and adolescents. A cross-sectional epidemiological study. **Eur. J. Orthod**. v. 17, n.4, p.305-309, 1995.
- DETAMORE, M.S.; ATHANASIOU, K.A. Motivation, Characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. **Tissue Engineering**, v.9, n.6, p.1065-1087, 2003.
- DETAMORE, M.S.; ORFANOS, J.G.; ALMARZA A.J. et al. Quantitative analysis and comparative regional investigation of the extracellular matrix of the porcine temporomandibular joint disc. **Matrix Biology**, v.24, p.45-57, 2005.

DETAMORE, M.S.; HEGDE, J.N.; WAGLE, R.R. et al. Cell type and distribution in the porcine temporomandibular joint disc. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.64, p.243-248, 2006.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Eletrophoretic behavior of acid mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal Biochem**, v.70, p.645-647, 1976.

ELEOPRA, L., TUGNOLI, V., DE GRANDIS, D. The variability in the clinical effect induced by botulinum toxin type A: the role of muscle activity in humans. **Mov. Disord.**, v.12, n.1, p.89-94, 1997.

FIKÁCKOVÁ, H., DOSTÁLOVÁ, T., NAVRÁTIL, L., KLASCHKA, J. Effectiveness of low level laser therapy in temporomandibular joint disorders: a placebo-controlled study. **Photomed Laser Surg**. v. 25, n.4, p.297-303, 2007.

FINK, B., EGL, M., SINGER, J., FUERST, M., BUBENHEIM, M., NEUEN-JACOB, E. Morphologic changes in the vastus medialis muscle in patients with osteoarthritis of the knee. **Arthritis Rheum**. V.56, n.11, p.3626-3633, 2007.

FISCHER, L., CLEMENTE, .T., TAMBELI, C.H. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. **The Journal of Pain**. v. 8, n.5, p.437-442, 2007.

FLAKE, N.M., HERMANSTYNE, T.O., GOLD, M.S. Testosterone and estrogen have opposing actions on inflammation-induced plasma extravasation in the rat temporomandibular joint. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. v. 291, p.R343-R348, 2006.

FUJITA, S.; HOSHINO, K. Histochemical and immunohistochemical studies of the articular disk of the temporomandibular joint in rats. **Acta Anat (Basel)**, v.134, n.1, p.26-30, 1989.

GARDNER, E., GRAY D.J., O'RAHILLY, R. **Anatomia**. 3ed. Editora Guanabara Koogan S.A., p.684-687, 1971.

GLAROS, A.G.; WILLIAMS, K.; LAUSTEN, L. et al. Tooth contact in patients with temporomandibular disorders. **Cranio**. v.23, n.3, p.188-193, 2005.

GODOY, F., ROSENBLATT, A., GODOY-BEZERRA, J. Temporomandibular disorders and associated factors in brazilian teenagers: a cross-sectional study. **Int. J. Prosthodont**. v. 20, n.6, p.599-604, 2007.

GOMES, M.P.M. **Botox®: toxina botulínica tipo A**. Guarulhos: Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.; 2002.

GOMES, P.A. **Alterações posturais e desordens temporomandibulares, artigo de revisão**. 2005. Disponível em: <<http://www.wgate.com.br/fisioweb>>. Acessado em: 10/12/2006.

GRACIES, J.M., SIMPSON DM. Botulinum toxin therapy. **Neurologist**. v.6, p.98-115, 2000.

GRAY, H.F.R.S. **Gray Anatomia**. 29ed. Editora Guanabara Koogan S.A., p.242-243, 1988.

GU, Z.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y. et al. An animal model for inducing anterior disc displacement of the temporomandibular joint. **J. Orofac Pain**. v.20, n.2, p.166-173, 2006.

HANAOKA, K.; TANAKA, E.; TAKATA T. et al. Platelet-derived Growth Factor Enhances Proliferation and Matrix Synthesis of Temporomandibular Joint Disc-derived Cells. **The Angle Orthodontist**, v.76, n.3, p.486-492, 2005.

HAMBLETON, P. Clostridium botulinum toxins: a general review of involvement in disease, structure, mode of action and preparation for clinical use. **J. Neurol.**, v.239, n.1, p.16-20, 1992.

HARDINGHAM, T.E.; FOSANG, A.J. Proteoglycans: Many forms and many functions. **The Faseb Journal**, v.6, p.861-870, 1992.

HERZOG, W., LONGINO, D., CLARK, A. The role of muscles in joint adaptation and degeneration. **Langenbecks Arch. Surg.**, v.233, n.5, p.305-315, 2003.

HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, I. Proteoglycans: an overview. **Methods in Enzymol**, v.144, p.305-372, 1987.

HERMAN, J.H.; KHOSLA, R.C. In vitro effects of Nd:YAG laser radiation on cartilage metabolism. **J. Rheumatol**, v.15, n.12, p.1818-1826, 1988.

HOLMLUND, A. Disc derangements of the temporomandibular joint. A tissue-based characterization and implications for surgical treatment. **International J. Oral Maxillofacial Surg**. v.36, p.571-576, 2007.

HUANG, K.; OLPSTELTEN, D.; SAMMAN, N. et al. Experimentally induced unilateral tooth loss: histochemical studies of the temporomandibular joint. **J. Dent Res**, v.81, n.3, p.219-213, 2002.

HUANG, G.J., RUE, T.C. Third-molar extraction as a risk of factor for temporomandibular disorder. **JADA**. v.137, n.11, p.1547-1554, 2006.

- HUNZIKER, E.B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.10, p.432-463, 2001.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de Citologia e Histologia**. 1ed, p.72-73, 1983.
- KAMALI, F., BAYAT, M., TORKAMAN, G. et al. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **Photochem Photobiol. B.** v.88, n.1, p.11-15, 2007.
- KAVUNKU, V.; SAHIN, S.; KAMANLI, A. et al. The role of systemic hypermobility in temporomandibular joint dysfunction syndrome. **Rheumatol Int**, v.26, p.257-260, 2006.
- KIERNAN, J.A. **Histological and histochemical methods**. Theory and practice. 3 ed. Oxford: Pergamo Press, p.81-82, 1981.
- KIM, J.Y., KIM, S.T., CHO, S.W., et. al. Growth effects of botulinum tixin type A injected into masseter muscle on a developing rat mandible. **Oral Dis.**, 2008.
- KLEIN, A.W. Complications, adverse reactions, and insights with the use of botulinum toxin. **Dermatol Surg.**, v.29, p.549-556, 2003.
- KONDOH, T.; HAMADA, Y.; LINO, M. et al. Regional differences of type II collagen synthesis in the human temporomandibular joint disc: immunolocalization study of carboxy-terminal type II procollagen peptide (chondrocalcin). **Archives of Oral Biology**, v.48, p.621-625, 2003.
- KUWABARA, M.; TAKUMA, T.; SCOTT, P.G. et al. Biochemical and immunohistochemical studies of the protein expression and localization of decorin and biglycan in the temporomandibular joint disc of growing rats. **Arch Oral Biol**, v.47, n.6, p.473-480, 2002.
- KWON, T.G., PARK, H.S., LEE, S.H., et. al. Influence of Unilateral Masseter Muscle Atrophy on Craniofacial Morphology in Growing Rabbits. **Oral Maxillofac Surg.**, v.65, p.1530-1537, 2007.
- LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage Ty. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEONARDI, R., VILLARI, L., BERNASCONI, G. et. al. Histochemical study of the elastic fibers in pathologic human temporomandibular joint discs. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.59, n.10, p.1186-1192, 2001.

LIZARELLI, R.F.Z. **Protocolos odontológicos: Uso do laser de baixa potência**. MM Optics. 3 ed. p.32-33, 2007.

LONGUINO, D., FRANK, C., LEONARDI, T.R., VAZ, M.A., HERZOG, W. Proposed modelo of botulinum toxin-induced muscle weakness in the rabbit. **J. Orthop. Res.**, v.23, n.6, p.1411-8, 2005.

LOPES, L.A. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação. **Dissertação de doutorado** – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2003.

MATIC, D.B., YAZDANI, A., WELLS, R.G., et. al. The effects off masseter muscle paralysis on facial bone growth. **J. Surg. Res.**, v.139, n.2, p.243-252, 2007.

MAZZETTO, M.O., CARRASCO, T.G., BIDINELO, E.F. et al. Low intensity laser application in têporomandibular disorders: a phase I double-blind study. **Crânio**. v.25, n.3, p.186-192, 2007.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo: Funcamp, p.71, 1980.

MICHELACCI, Y.M.; HORTON, D.S.P.Q. Proteoglycans from thwe cartilage of yong hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **Comp Biochem Phisiol**, v.92, p.651-658, 1989.

MINAMOTO, V.B., HULST, J.B., LIM, M., et. al. Increased efficacy and decreased systemiceffects of botulinum toxin A injection after active or passive muscle manipulation. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v.49, p.907-914, 2007.

MISERENDINO, L.J.; PICK, R. **Lasers in dentistry**. Carol Strem, Quintessense Publishing, 1995c. 341p. apud DAMANTE, C.A. Avaliação clínica e histological dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAIAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de São Paulo (Faculdade de Odontologia de Bauru), Bauru, SP, 2003.

MIZOGUCHI, I.; TAKAHASHI, I.; NAKAMURA, M. et al. An himmunohistochemical study of regional differences in the distribution of type I and type II collagens in rat mandibular condylar cartilage. **Arch Oral Biol**, v.41, n.8-9, p.863-869, 1996.

MOHL, N.D.; ZARB, G.A.; CARLSSON, G.E. et al. **Fundamentos de Oclusão**. 2 ed. Quintessense Editora LTDA. p.17-36; 89-99; 237-253, 1991.

MORBIATO, L.; CARLI, L.; JOHNSON, E.A.; et. al. Neuromuscular paralysis and recovery in mice injected with botulinum neurotoxins A and C. **European Journal of Neuroscience**, v.25, p. 2697-2704, 2007.

MUIR, H.; MAROUDAS, A.; WIGHAM, J. The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. **Biochem Biophys Acta**, v.177, p.492-500, 1969; apud PAEGLE, D.I.; HOLMLUND, A.B.; HJERPE, A. Matrix glycosaminoglycans in the temporomandibular joint in patients with painful clicking and chronic closed lock. **Int. J. Oral Maxillofac Surg**, v.32, p.397-400, 2003.

NUNEZ, S.C.; GARCEZ, A.S.; SUZUKI, S.S. et al. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.1, p.45-49, 2006.

OKESON, J.P. **Fundamentos de Oclusão e Desordens Temporomandibulares**. 2 ed. Livraria Editora Artes Médicas LTDA. p. 220-242, 1992.

PAEGLE, D.I.; HOLMLUND, A.B.; HJERPE, A. Matrix glycosaminoglycans in the temporomandibular joint in patients with painful clicking and chronic closed lock. **Int. J. Oral Maxillofac Surg**, v.32, p.397-400, 2003.

PHILLIPS, J.T. What skeletal and dental characteristics do TMD patients have in common? **Funct. Orthod**. v. 21, n.1, p.24-26, 2007.

PICOSSE, M. **Anatomia Dentária**. 1ed. Sarvier. p.251-276, 1971.

PULLIN, J.G.; COLLIER, M.A.; DAS, P. et al. Effects of holmium: YAG laser energy on cartilage metabolism, healing, and biochemical properties of lesional and perilesional tissue in a weight-bearing model. **Arthroscopy**, v.12, n.1, p.15-25, 1996.

RAMÍREZ, L.M.; SANDOVAL, P.G.; BALLESTEROS, L.E. Los desordenes temporomandibulares: clinica craneo-cervicofacial referida. **Medicina y Patología Oral**, v.10, p.E18-E26, 2005.

RODA, R.P., BAGÁN, J.V., FERNÁNDEZ, J.M.D., BAZÁN, S.H., SORIANO, Y.J. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: Classification, epidemiology and risk factors. **Med. Oral Patol. Cir. Bucal**. v.12, p.E292-E298, 2007.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J.F.; MÉRIDA-VELASCO, J.R.; JIMÉNEZ-COLLADO, J. Anatomical consideration on the discomalleolar ligament. **J. Anat**, v.192, p.617-621, 1998.

SCAPINO, R.P.; OBREZ, A.; GREISING D. Organization and function of the collagen fiber system in the human temporomandibular joint disk and its attachments. **Cells Tissues Organs**, v.182, p.201-225, 2006.

SHEETS Jr, D.W.; OKAMOTO, T.; DIJKGRAAF, L.C. et al. Free radical damage in facsimile synovium: correlation with adhesion formation in osteoarthritic TMJs. **Journal of Prosthodontics**, v.15. n.1, p.9-19, 2006.

SHEN, J., MA, J., LEE, C. et. al. How muscles recover from paresis and atrophy after intramuscular injection of botulinum toxin A: Study in juvenile rats. **J. of Orthopaedic Research**, p.1128-1135, 2006.

SICHER, H.; TANDLER, J. **Anatomia para Dentistas**. 1ed. Atheneu Editora São Paulo LTDA. p.192-212, 1981.

SPIVAK, J.M.; GRANDE, D.A.; BEN-YISHAY, A. et al. The effect of low-level Nd:YAG laser energy on adult articular cartilage in vitro. **Arthroscopy**, v.8, n.1, p.36-43, 1992.

SUN, G.; TUNER, J. Low-level laser therapy in dentistry. **Dent. Clin. North Am**, v.48, n.4, p.1061-1076, 2004.

TABER, L.A. Biomechanics of growth, remodeling, and morphogenesis. **Appl Mech Rev**. v.48, p.487-545, 1995.

TANAKA, E.; EIJDEN, T.V., Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14, n.2, p.138-150, 2003.

TESTUT, L., JACOB, O. **Tratado de Anatomia Topográfica**. 5ed. Salvat Editores S.A. Barcelona. p. 241-245, 1932.

TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; FINI, M. et al. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. **Biomed Pharmacother**, v.55, n.2, p.117-120, 2001.

TULLBERG, M.; ALSTERGREN, P.J.; ERNBERG, M.M. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. **Pain**, v.105, n.1-2, p.89-96, 2003.

URBAN, J.P.; MCMULLIN, J.F. Swelling pressure of the intervertebral disc: Influence of proteoglycan and collagen contents. **Bioheology**, v.22, n.2, p.145-157, 1985.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L., PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. **Histochemical Journal**, v.14, p.000-000, 1982.

VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. **Biologia Celular**. Ed atheneu, 348p p.05-34, 1987.

WARNER, S.E., SANFORD, D.A., BECKER, B.A., et. al. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. **Bone**, v.38, n.2, p.257-264, 2006.

WONG, B.J.F.; PANDHOH, N.; TRUONG, M.T. et al. Identification of chondrocyte proliferation following laser irradiation, thermal injury, and mechanical trauma. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.37, p.89-96, 2005.

YOSHIDA, K.; IIZUKA, T. Botulinum toxin treatment for upper airway collapse resulting from temporomandibular joint dislocation due to jaw-opening dystonia. **Cranio**, v.24, n.3, p. 217-222.

ZANG, F.; WANG, J.; LI, X. Effect of unilateral mastication on the remodeling of the glenoid fossae in Wistar rats. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v.21, n.2, p.155-157, 2003.

ZEREDO, J.L.; SASAKI, K.M.; FUJIYAMA, R. et al. Effects of low power Er:YAG laser on the tooth pulp-evoked jaw-opening reflex. **Lasers Surg Med**, v.33, n.3, p.169-172, 2003.

ZEZELL, D.M. **Curso clínico de laser em odontologia**. Apostila de curso FUNDECTO-USP, São Paulo, 2001. apud DAMANTE, C.A. Avaliação clínica e histológica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de São Paulo (Faculdade de Odontologia de Bauru), Bauru, SP, 2003.

ZINGALES, B. Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Genes and Antigens of Parasites**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.357-363, 1984.

11. ARTIGO SUBMETIDO AO J. OF DENTISTRY

Title of Paper: Morphological and biochemical evaluation of the articular disk of the TMJ of rats with temporomandibular dysfunction subjected to low-level laser therapy.

Short title: LLLT Effects on the articular disk of animals with TMD.

Name and address of authors

Flávia Da Ré Guerra; Department of Anatomy, Biology Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Ivan Luiz de Souza Pires; Department of Anatomy, Biology Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Andréa de Aro; Department of Cellular Biology, Biology Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Fabiano Politti. Department of Anatomy, Biology Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Edson Rosa Pimentel; Department of Cellular Biology, Biology Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Evanisi Teresa Palomari; Department of Anatomy, Biology Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding Author

Name: Flávia Da Ré Guerra

Address: State University of Campinas

Department of Anatomy – Biology Institute

Av. Bertrand Russel

P.O. Box: 6109

CEP: 13083-865

Campinas, SP - Brazil

Telephone: 55 (19) 3521-6732 / 55 (19) 3521-6105

Fax: 55(19) 3521-6101

E-mail: dgflavia@yahoo.com.br

Key words: Temporomandibular joint disorders; Lasers; Anatomy and Histology; Lesion.

Introduction

Temporomandibular dysfunctions (TMD) are conditions that affect the form and function of the temporomandibular joint (TMJ), the masticatory muscles, and the dental apparatus¹ and include myopathies and arthropathies of the cranio-mandibular system. Studies reveal that around seventy-five percent of the world's adult population display at least one symptom related to temporomandibular dysfunction². It is nine times more prevalent among women³, affecting those in the reproductive phase or those using exogenous estrogen⁴.

The most frequent complaint from an individual with TMD is muscle pain. This is generally associated with functional activities, aggravated by normal palpation or functional muscle manipulation. Dissonances of this nature can cause articular disk disorders, through muscle hyperactivity generating a micro-trauma of the disk⁵.

Findings in literature indicate that the articular disk is an oval plate comprised of conjunctive tissue basically composed of elastic and collagen fibers, proteoglycan, chondroitin, high molecular weight sulphate and water. The dominant type by volume is collagen type I^{6,7,8,9}. Proteoglycans and glycosaminoglycans serve to make the disk highly resistant to compression forces⁷, and are responsible for the biosynthetic secretory pathway, in such a way as to present specific influences on the molecule, permitting interaction with other sugars, cell membranes or proteins such as collagen¹⁰.

The biochemical properties of the articular disk show alterations as a consequence of TMJ trauma or disease. Every injury to that structure can provoke changes in the conformation and biochemical composition¹¹. In turn, these changes can imply modification in the articular disk's mechanical properties⁷.

To ease the resulting symptoms of such condition, various therapeutic interventions are used for individuals with TMD. The treatment generally involves a combination of both speech and physical therapies and drugs and, if conservative therapies are not effective, surgical techniques are used. Among current therapies, low-level laser (LLL) has presented effective therapeutic results with respect to pain and proliferation of the cartilage tissue^{1,12,13,14,15,16}.

It is known that cartilage tissue has limited regenerative capacity, due to the fact that the tissue presents few cells and reduced vascularization¹⁷. The main effects generated by LLL are of a stimulatory nature. There is no total comprehension of the analgesic effect of LLL, although it has been extensively studied. Thus, the development of methods capable of increasing the potential regeneration or proliferation of cartilage cells will be of great value in the treatment of articular diseases.

Materials and Methods

This study was designed in accordance with the ethical principals of animal experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Twenty-four Lewis/Uni, male mice, average age of 60.

The test animals were divided into four groups: CG, control group; DG, animals with experimental TMD; LG, whose animals were subjected to treatment with low-level laser; DLG, animals with experimental TMD followed by treatment with low-level laser.

Experimental TMD

The animals were anesthetized by an intra-peritoneal injection containing a 1:1 solution of Ketamine (70 mg/Kg) and Xylazine (10 mg/Kg). A flask containing 100 units of lyophilized botulinic toxin (Prosigne®) was reconstituted by instilling a 2-ml normal saline solution (50 units/ml)^{18,19}. After being anesthetized, the animals received a dose of 6 units / Kg weight, which conferred an injection volume of 20 µl per animal¹⁸. A Hamilton 25µl syringe was used for unilateral drug administration in the animals' left masseter muscle promoting a deficit in the masticatory movements in the left region of TMJ, leading to a hyper-function of the right portion and an injury of the articular disk sufficient to reproduce the characteristics of an articular disk displayed by carriers of TMD.

Laser Therapy

The *laser* equipment used was Twin Flex brand from MM Optics. The GaA1As Laser has a 780 nm wavelength and was programmed at 50 mW of power.

For a seven-day period, the animals received a 10 J laser application unilaterally for 8 seconds on the right masseter muscle opposite to the botulinic toxin injection. The same equipment, accessories and schedule were maintained throughout this period. By

the end of treatment, the recommended ideal dosage for TMD of 70 J/cm² had been reached^{20,21}.

Light Microscopy Analysis

The right TMJ disk was then removed and transferred to a recipient and fixed in a 4% paraformaldehyde solution, pH 7.4, for 24 hours at 4°C. Samples were then washed, ethanol dehydrated, diaphanized with xylol, and paraffin-embedded. Transversal serial sections of 7 µm were obtained for microscopy analysis. For the purpose of a comprehensive tissue observation, some of the sections were stained with hematoxylin-eosin. For observation of collagen bundles, sections were stained with picrosirius. Proteoglycans were detected after staining with toluidine blue (0.025%) in McIlvaine buffer (0.03M citric acid, 0.04M sodium phosphate, dibasic—pH 4.0). The tissue sections were observed under an Eclipse E800 Nikon light microscope.

Extracellular Matrix Extraction

After a rapid washing in PBS, consisting of 5 mM phosphate buffer, 15 M NaCl, and 50 mM EDTA, disk samples were cut into pieces, and the segments were immersed in 15 volumes of 4 M guanidine hydrochloride (Gu-HCl), supplemented with 0.05 M EDTA, and 1 mM PMSF in 0.05 M acetate buffer, pH 5.8²². The extraction mixture was gently stirred for 24 hr, at 4°C, followed by centrifugation at 27,000 × g for 50 min. The supernatant was used in the biochemical analyses.

Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed according to²³, using gradient gels (4–16%). The extracts (50 µL) of tension and compression regions of the tendon, from animals of the 5 experimental groups, were precipitated with 100 µL of 50 mM acetate buffer, pH 7.4, and 9 volumes of absolute ethanol, for 24 hr at 4°C. These samples were analyzed by SDS-PAGE. The relative molecular masses were estimated by comparisons with protein standard molecular mass markers²⁴. Gels were stained with coomassie brilliant blue R-250.

Non-collagenic Proteins Quantification

Protein analyses were performed according to the Bradford method²⁵ utilizing Coomassie Brilliant Blue G 250 and control solutions of bovine albumin (BSA) at

concentrations of 10, 20, 40, 80 and 100 µg/ml as a standard. A Spectrophotometer 8452 A Diode Array from HP at 595 nm was used for the readings of 4µl samples. Statistical analyses were carried out by the Minitab 12 program, using the variance analysis (ANOVA), at $p < 0.05$.

Results

Figure 1A refers to CG stained with hematoxylin-eosin; the tissue morphological aspects showed the existence of fibroblasts adhered to the extracellular matrix and oriented along the axis.

It is possible to note in DG (Fig. 1B) that disarrangement occurred in the fibroblasts organization as well as in the orientation of the extracellular matrix. An apparent decrease in the amount of fibroblasts in the tissue was also observed.

In LG (Fig. 1C), fibroblasts were found to be oriented and placed in parallel, just like the extracellular matrix, as observed in CG.

A histological cut from DLG, represented in Figure 1D, displays a large quantity of extracellular matrix interspersed among the cells, superior to quantities observed in CG, DG and LG; and an apparent decrease in the number of cells is also observed. Fibroblasts seem to display hypertrophy and are oriented in the same manner as the extracellular matrix.

Stained with toluidine blue (Fig. 1E) can be observed it can be verified that CG has a relatively small content of GAGs. When compared to CG in relation to the arrangement and apparent amount of GAGs (Fig. 1F), it can be concluded that DG presents stronger staining, which indicates an increase in production by tissue cells after an induced dysfunction. A comparison between LG (Fig. 1G) and CG (Fig. 1E) did not indicate differences regarding the degree of arrangement of GAGs in the extracellular matrix of the articular disk. When DLG (Fig. 1H) was compared to DG (Fig. 1F), no apparent differences in the content of GAGs in its extracellular matrix was detected. However, a greater content of GAGs was observed in relation to CG (Fig. 1E) and LG (Fig. 1G), in addition to accentuated cellular hypertrophy where cytosol was heavily stained, indicating a large amount of ribosomes associated with the synthesis of proteoglycans.

After examination under polarized light, slides stained with picosirius revealed the orientation and degree of compaction of the collagen components in the extracellular matrix of the articular disk.

Figure 1I depicts thick and oriented bundles of collagen type I, in which a red-orange coloration indicates a high degree of fiber compaction. In DG (Fig. 1J), the collagen fibers also show orientation in bundles along an axis but of greenish color indicating a lower degree of compaction in the type I collagen fibers of this tissue.

A different arrangement of the collagen type I was identified in LG matrix (Fig. 1K) which, when compared to CG (Fig. 1I) and DG (Fig. 1J), they seemed not to be oriented as fibers are, and to be present in lesser quantity. Strong red-colored fibers were observed in slides indicating a high degree of compaction in collagen type I, but at the same time, a lack of fibers organization, no longer oriented along an axis, was observed. Collagen fibers type I appeared in DLG in a disorganized manner but thicker and very tightly packed (Fig. 1L), similar to what was observed in LG (Fig. 1K).

The collected samples were analyzed in SDS polyacrylamide gel. The results are expressed in gel SDS PAGE as shown in Fig. 2.

Regarding the collagen, differences among those groups may be observed specially concerning $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains. LG showed a less evident band when compared to CG. The collagen band referring to DG was less evident than the corresponding bands from CG, LG and DLG. On the other hand, DLG displayed a collagen band which was less evident when compared to CG. However, when compared to LG and DG bands, the DLG collagen band was more evident. A band of approximately 60 kDa, possibly from fibromodulin, a proteoglycan of low molecular weight, was more evident in CG and DLG.

A decrease in low molecular proteins (between 14.4 and 20.1 kDa) was evident in GD when compared to the other groups. These are possibly smaller proteoglycans.

The results of non-collagen protein analysis can be seen in Table I where data referring to the average concentration of each researched group is displayed. The data was statistically analysed by the Minitab 12 program, using the analysis of variance (ANOVA) at $p < 0.05$. P values are expressed in Table 2. When compared to LG, CG

showed statistically significant differences. The data indicated a lesser amount of non-collagen protein for LG as compared to CG.

Comparisons between DG to DLG and CG to DG values did not show statistically significant differences. A similar pattern was found when comparing CG to DLG and LG to DG, all yielding very similar values. Comparison between DLG and LG showed a statistically greater amount of non-collagen proteins.

Discussion

It is well known that the articular disk is an oval plate composed of conjunctive tissue that contains elastic collagen fibers, proteoglycan, chondroitin, high molecular weight sulphate and water ⁶. Related directly to the required functional demand, the articular disk cells and extracellular matrix components will change to provide the required adaptations.

The GC was used as reference to the other experimental groups. Morphological studies using stained slides in hematoxylin-eosin showed the presence of fibroblasts in the whole articular disk. Additionally, these cells, which are responsible for the production of extracellular matrix, were adhered to the synthesized matrix in an arrangement oriented along an axis, thus reinforcing the articular disk, as observed in previously studies ⁸.

Toluidine blue staining was done to allow the observation of GAGs present in the tissue. The content of GAGs in the CG articular disks was inexpressive, typical of fibrocartilaginous tissues, which is in accordance with ⁹, who also observed an elevated proportion of collagen in these structures, also in line with the stained slides from this study which used picosirius. Collagen fibers are flexible but possess high resistance to traction, which make them vital to the biomechanic properties of this articulation, eventually allowing its proper functioning.

Picosirius staining was done to allow the observation of collagen fibers. CG disks have, as a primary extracellular matrix component, collagen type I, which appear as organized bundles with a high degree of structural compaction due to the reddish-orange coloration as also observed in previously studies ⁶.

DG staining in hematoxylin-eosin showed an apparent decrease in the number of fibroblasts as well as their disorganized distribution was observed in the TMJ articular disk of the animals subjected to induced TMD (DG) under light microscopy. In the ECM, lack of arrangement along an axis was also noted.

In toluidine blue-stained slides, an apparent proportional increase of GAGs in the tissue was observed. This observation would corroborate with some previously studies^{9,11}.

With picosirius-stained slides, collagen type I fibers appeared less compacted even though they maintained their orientation along an axis, indicating possible degradation of this tissue component in the articular disk of the DG animals. In accordance with this evidence, and when compared to the other groups, data from SDS-PAGE gel revealed a less evident band of collagen, thus suggesting degradation of this extracellular matrix component. Degradation of the articular disk matrix components is one of the primary signs in individuals with TMD according to previously findings⁷.

It is believed that the entire process of damage to the TMJ articular disk provokes changes in the conformation and biochemical composition, generating an increase in GAGs. This may have occurred in response to mechanical stress in such a way as to reinforce articular disk regions having less collagen.

The statistical data referent to non-collagen protein analysis showed no statistical difference compared to the other groups, including CG. This finding can be explained by the fact that injured tissues display intense degradation of Type I collagen, the most abundant and strength-conferring component, while non-collagen proteins, such as proteoglycans, show apparent increase in concentration. Proteins from inflammation provoked by the injury may have contributed to this result.

Low-level laser (LLL) is widely used for analgesic treatment of individuals with TMD^{1,12,21}, and has had positive results in alleviating patient-reported pain.

LLL was the technique chosen to evaluate its effect on articular disk tissue, as it offers energy intensity that respects the physiological threshold of the tissue cells in question¹⁵.

LG results as seen on the hematoxylin-eosin-stained slides showed no difference from CG; extracellular matrix as well as disk cells were aligned along an axis. Stained with toluidine blue, LG and CG cell slides showed no apparent difference. Irradiation with LLL was not able to produce any changes in the intact tissue of the articular disk.

Changes regarding the organization of the collagen disk were detected in slides stained with picosirius. Comparisons with CG showed a structural disorganization of the arrangement, which is characteristic of collagen type I fibers, probably due to the stimulation from LLL. No changes occurred regarding the fibers' degree of compaction.

Results related to the gel SDS Page exposed a lower degree in expressiveness of the LG collagen band when compared to CG and LDG, which indicates that besides promoting structural changes, LLL also apparently decreased the collagen content in disks, whose result is similar to that found in cuts stained with picosirius, even though the latter presented a less expressive band when compared to DG.

LG presented the lowest amount of non-collagenic proteins and when analyzed statistically, it proved to be significantly lower than both CG and LDG, which indicates that LLL inhibited the synthesis of these proteins by the disk cells.

The TMJ articular disks of animals from LDG were observed under light microscopy and showed an apparent increase in the amount of extracellular matrix when compared to the other groups, including LG. On the other hand, extracellular matrix along with the fibroblasts present in the articular disk were positioned in an oriented manner, restoring this peculiar characteristic of the normal articular disk, in the articular disks of animals suffering from TMD.

The content of GAGs was equivalent to that observed on the stained cuts in toluidine blue from GD, however despite being apparently greater than CG and LG. In DLG a hypertrophy of the fibroblasts was observed as well as heavily stained cytosol were observed, indicating a high concentration of ribosomes associated to with the synthesis of proteoglycans. Such findings suggest that the therapy with LLL was not efficacious on this subject to the point of restoring the characteristics of the tissue.

Slides from LDG animals from LDG stained with picosirius did not show a greenish coloration as observed in the DG specimens but rather, a reddish-orange

coloration, indicating a higher degree of fiber compactness. From this observation it is possible to suggest that LLL therapy prevented the continuing degradation of this component in the disk, however, it was not capable of restoring the characteristic oriented arrangement of the intact articular disks.

Biochemical and morphological data expressed by gel SDS-PAGE are in agreement, which indicates an increase of collagen in LDG when compared to DG and LG in spite of being a less evident band when compared to CG. With respect to one a band of approximately 60 kDa, more expressive characteristics are observed in DLG and CG than in LG and DG, suggesting that this band corresponds to a small proteoglycan, possibly fibromodulin. Fibromodulin has a complementary role to decorin in collagen fibrillogenesis¹⁰.

Statistical analysis of the non-collagenic protein analysis values were not statistically different compared to CG and DG groups, although statistically greater when compared to LG. This fact can be explained by pre-treatment protein production due to the mechanical stress of the articulation in induced TMD.

According to the result obtained in this study, we observed that LLL therapy used on intact tissue presented no modification with respect to GAG content, fibroblasts and extracellular matrix orientation, but caused apparent collagen content decrease as well as disorganization of fiber arrangement. There was also a decrease in non-collagen protein content when compared to CG and DLG groups, which suggests that this possibly occurred due to laser stimulation, at the level used and on intact tissue, impairing normal functioning of the irradiated tissue cells and altering the synthesis of important components, especially collagen I.

In tissues subjected to experimental TMD, LLL therapy had unequal results. There was an increase in extracellular matrix content compared to the other groups, and the components (cells and extracellular matrix) were oriented. The GAG content was similar to the LG, indicating that this characteristic cannot be resolved with the therapy. With respect to collagen, the DLG presented characteristics similar to LG, indicating that the laser acts on the collagen synthesis properties, modifying their organizational aspect, yet not permitting the continued harm and degradation of this that component,

concomitantly promoting an increase of proteoglycan fibromodulin, responsible for variation in collagen component synthesis.

With respect to non-collagenic proteins, the DLG presented values similar to the CG and DG, but greater than the LG, reinforcing reinforcing the hypothesis that LLL inhibits synthesis of these proteins synthesis. However, the process of damage occurred in the discdisk, as well as the increase of GAG content, contribute contributing to the similar numbers of these proteins in groups CG and DG.

It should be pointed out that the time during which the animal was exposed to therapy, 10 J per day during for 7 days without interruption, totaling a treatment of 70 J/cm², according to a protocol proposed ^{20,21} should be reviewed. Other protocols should be tested, due to the fact that, as was observed, the referred therapy had the capacity towas able to promote tissue modifications. Studies conforming to the treatment protocols can be of great benefit to carriers of TMD and other degenerative articular conditions.

Conclusions

Based on the experimental conditions and the results obtained, it can be concluded that:

- LLL therapy on intact articular discdisks of the TMJ demonstrated structural arrangement modifications of the collagen type I fibers, as well as a considerable decrease in non-collagenic protein concentration.
- In articular discdisks subjected to experimental TMD, LLL promoted a breakdown of collagen type I fibers, similar to that found in animals of LG. N, nevertheless, it impededprevented degeneration of the collagen present in the discdisk and stimulated synthesis of this important matrix component.
- Although new investigations are necessary in order to adjust treatment protocols, therapytherapy with LLL had the capacitywas able to promote important tissue modifications, from which could benefit greatly carriers of TMD and other degenerative articular diseases could benefit greatly.

References

1. Nunez SC, Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2006; **24**(1):45-49.
2. Roda RP, Bagán JV, Fernández JMD, Bazán SH, Soriano VJ. Review of temporomandibular joint pathology. part i: classification, epidemiology and risk factors. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2007; **12**:e292-e298.
3. Bermejo-Fenoll A, Sáez-Yuguero. Diagnóstico diferencial de los desórdenes temporomandibulares (DTM). *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2005; **10**:468-469.
4. Fischer L, Clemente T, Tambeli CH. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. *The Journal of Pain*, 2007; **8**(5):437-442.
5. Okeson JP. **Fundamentos de oclusão e desordens temporo-mandibulares**. 2nd ed. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda; 1992.
6. Fujita S, Hoshino K. Histochemical and immunohistochemical studies of the articular disk of the temporomandibular joint in rats. *Acta Anatomica (basel)*, 1989; **134**(1):26-30.
7. Tanaka E, Eijden TV. Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2003; **14**(2):138-150.
8. Detamore MS, Athanasiou KA. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Engineering*, 2003; **9**(6):1065-1087.
9. Paegle DI, Holmlund AB, Hjerpe A. Matrix glycosaminoglycans in the temporomandibular joint in patients with painful clicking and chronic closed lock. *Int.J. Oral Maxillofacial Surgery*, 2003; **32**:397-400.
10. Comper WD. Extracellular matrix: molecular components and interactions. 1st ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2003.
11. Huang Q, Opstelten D, Samman N, Tideman H. Experimentally induced unilateral tooth loss: histochemical studies of the temporomandibular joint. *Journal of Dental Research*, 2002; **81**(3):219-213.

12. Zeredo JL, Sasaki KM, Fujiyama R, Okada Y, Toda K. Effects of low power er:yag laser on the tooth pulp-evoked jaw-opening reflex. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2003; **33**(3):169-172.
13. Herman JH, Khosla RC. In vitro effects of nd: Yag laser radiation on cartilage metabolism. *Journal of Rheumatology*, 1988; **15**(12):1818-1826.
14. Spivak JM, Grande DA, Ben-Yishay A, Menche DS, Pitman MI. The effect of low-level nd:yag laser energy on adult articular cartilage in vitro. *Arthroscopy*, 1992; **8**(1):36-43.
15. Torricelli P, Giavaresi G, Fini M, Guzzardella GA, Morrone G, Carpi A, et al. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2001; **55**(2):117-120.
16. Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, Salavati M.. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *Photochemistry and Photobiology*, 2007; **88**(1):11-15.
17. Wong BJ, Pandhoh N, Truong MT, Diaz S, Chao K, Hou S, et al. Identification of chondrocyte proliferation following laser irradiation, thermal injury, and mechanical trauma. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2005; **37**:89-96.
18. Shen J, Ma J, Lee C, Smith BP, Smith TL, Tan KH, et al.. How muscles recover from paresis and atrophy after intramuscular injection of botulinum toxin a: study in juvenile rats. *J. Of Orthopaedic Research*, 2006; **24**(5):1128-1135.
19. Kim JY, Kim ST, Cho SW, Jung HS, Park KT, Son HK.. Growth effects of botulinum tixin type a injected into masseter muscle on a developing rat mandible. *Oral Disease*, 2008; **14**(7):626-632.
20. Lizarelli RFZ. Protocolos odontológicos: uso do laser de baixa potência. 3rd ed. São Carlos: MM Optics; 2007.
21. Fikácková H, Dostálová T, Navrátil L, Klaschka J. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular joint disorders: a placebo-controlled study. *Photomedical Laser Surgery*, 2007; **25**(4):297-303.
22. Heinegård D, Sommarin I. Proteoglycans: an overview. *Methods in Enzymology*, 1987; **144**:305-372.
23. Zingales B. Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Genes and Antigens of Parasites*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1984. p.357-363.

24. Weber K, Osborni M. The reliability of molecular weight determination by sds-polyacrylamide gel eletrophoresis. *Journal of Biological Chemistry : JBC*, 1969; **244**(16):4406–4412.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; **72**:248-254.

12. ANEXO 1

DECLARAÇÃO

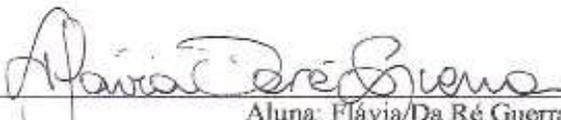
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada "Avaliação morfológica e bioquímica do disco articular da ATM de ratos submetidos à terapia com o laser de baixa potência: Estudo experimental em animais portadores de disfunção temporomandibular.":

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1554-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



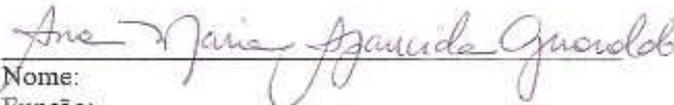
 Aluna: Flávia Da Ré Guerra



 Orientadora: Prof. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


 Nome: _____
 Função: _____

Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
 Presidente
 Comissão de Ética na Experimentação Animal
 CEEA/IB - UNICAMP