



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Curso de Graduação em Odontologia

Monografia de Final de Curso

Aluno: Ricardo Bonfante

Orientadora: Juliana Trindade Clemente Napimoga

Ano de Conclusão do Curso: 2013

Ricardo Bonfante

Avaliação da hiperalgesia inflamatória na progressão da artrite reumatóide experimentalmente induzida na articulação temporomandibular de ratos.

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, para obtenção do Diploma de Cirurgião - dentista.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Juliana Trindade Clemente Napimoga

Piracicaba

2013

CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Ricardo Bonfante RA 105642 esteve sob minha orientação para realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Avaliação da hiperalgesia inflamatória na progressão da artrite reumatóide experimentalmente induzida na articulação temporomandibular de ratos" no ano de 2013.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso

Piracicaba, 21 de setembro de 2013

Juliana Trindade Clemente Napimoga

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

B641a	Bonfante, Ricardo, 1991- Avaliação da hiperalgesia inflamatória na progressão da artrite reumatóide experimentalmente induzida na articulação temporomandibular de ratos / Ricardo Bonfante. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2013. Orientador: Juliana Trindade Clemente Napimoga. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Inflamação. 2. Artrite reumatoide. 3. Hiperalgesia. 4. Articulação temporomandibular. I. Napimoga, Juliana Trindade Clemente, 1978- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
-------	---

*Dedico este trabalho à todos que,
de alguma forma, contribuíram para sua
execução.*

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha Família, pelo apoio e carinho dedicados.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Juliana Trindade Clemente Napimoga, pela dedicação e empenho durante a execução do projeto.

À minha co-orientadora Cristina Gomes de Macedo pelo apoio, amizade e, principalmente, paciência.

À agencia FAPESP, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

À todos os amigos, os quais compartilham as mesmas dificuldades e felicidades nesses anos juntos.

RESUMO

A inflamação da articulação temporomandibular (ATM) induzida por Artrite Reumatóide (AR) é conhecida por causar dor persistente e desconforto. Este estudo teve como objetivo avaliar a hipernocicepção inflamatória persistente induzida pela artrite reumatóide na ATM de ratos. Ratos machos da raça Wistar foram sensibilizados com uma injeção subcutânea de albumina de soro bovino metilado (mBSA, 500 ug) na região cervical, em uma emulsão contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS) e CFA (Complete Freund's Adjuvant). Posteriormente foi injetado mBSA dissolvido em uma emulsão de PBS e IFA (Incomplete Freund's Adjuvant) em locais diferentes na região do quadril do rato 7 e 14 dias após a primeira imunização. Vinte e um dias após a injeção inicial, a artrite reumatóide foi induzida na ATM dos animais imunizados através de uma injeção intra-articular de mBSA (10µg/ATM/semana) durante 3 semanas. A hipernocicepção induzida pela AR na ATM foi avaliada por um comportamento nociceptivo dos animais através de uma injeção intra-articular com dose sublimiar de formalina (0,5%) 24 horas, e 7 e 14 dias após a última injeção intra-articular de mBSA. Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados terminalmente e seus tecidos periarticulares removidos para análise de migração de leucócitos e análise bioquímica (Western blot e ELISA) para medir a liberação de IL-12, IL-18 e da expressão do ICAM-1. A hipernocicepção persistente foi induzida pela AR na ATM de ratos 24h e 7 e 14 dias após a última injeção intra-articular de mBSA ($p < 0,05$ ANOVA, teste de Tukey). A liberação de IL-12, IL-18 e a expressão de ICAM-1 nos tecidos periarticulares foram significativamente mais elevados no dia 14 quando comparada com a de 24 horas

após a última injeção intra-articular de mBSA ($p < 0,05$ ANOVA, teste de Tukey).
Este novo modelo permite estudar o mecanismo envolvido na iniciação e manutenção da dor induzida pela artrite reumatóide na ATM.

Palavras Chave: Inflamação, Artrite Reumatóide, Hiperalgisia, Articulação Temporomandibular

Abstract

Inflammation of the temporomandibular joint (TMJ) induced by Rheumatoid Arthritis (RA) is known to cause persistent pain and distress. This study aimed to evaluate persistent inflammatory RA-induced hypernociception into the TMJ of rats. Male Wistar rats were sensitized with an subcutaneously injection of Methylated Bovine Serum Albumin (mBSA, 500 μ g) in an emulsion containing phosphate buffered saline (PBS) and Freund's Complete Adjuvant (CFA). mBSA dissolved in Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) was injected in different sites in the back of the rat 7 and 14 days after the first immunization. Twenty-one days after the initial injection, TMJ-arthritis was induced in the immunized animals by an intra-articular injection of mBSA (10 μ g/TMJ/week) during 3 weeks. RA-induced TMJ hypernociception was assessed by the animals' nociceptive behavior induced by an intra-articular injection of a low dose of formalin (0.5%) 24h, and 7 and 14 days after the last intra-articular mBSA injection. After behavioral assays, animals were terminally anesthetized and their periarticular tissue removed for leukocytes migration analysis and to biochemical analysis (Western Blot and ELISA) to measure the release of IL-12, IL-18 and expression of the ICAM-1. RA induced hypernociception into TMJ of rats 24h and 7 and 14 days after the last intra-articular injection of mBSA ($p < 0.05$: ANOVA, Tukey's test). The release of IL-12, IL-18 and the expression of ICAM-1 in periarticular tissue were significantly higher at day 14 when compared to that at 24h after the last intra-articular injection of mBSA ($p < 0.05$: ANOVA, Tukey's test). This new model allows to study the mechanism involved in the initiation and maintenance of pain induced by Rheumatoid Arthritis in the TMJ.

Keywords: Rheumatoid Arthritis, Temporomandibular Joint, Hyperalgesia,
Inflammation

Sumário

	Pág.
Introdução.....	11
Proposição.....	13
Metodologia.....	13
Discussão.....	20
Resultados.....	21
Referências Bibliográficas.....	32

Introdução e Revisão de Literatura

A artrite reumatóide (AR) é uma desordem degenerativa das articulações de etiologia que se manifesta periféricamente e simetricamente em múltiplas articulações causando deformação e destruição articular devido à erosão de ossos e cartilagens (Cunha et al., 2007). Esta lesão ocorre inicialmente de forma simétrica nas articulações periféricas, mãos e pés, estendendo-se com probabilidade para articulações maiores, como joelhos, quadril, ombro, pescoço, punhos, cotovelos e tornozelos. O processo inflamatório inicia-se pela membrana sinovial e, devido ao seu caráter progressivo, estende-se até as superfícies articulares. Ainda que a etiologia da AR permaneça desconhecida, a literatura sugere que fatores genéticos, fatores ambientais, ação hormonal, desordens autoimunes e quadros infecciosos podem estar relacionados com o desenvolvimento da doença (Scott et al., 2010). É, portanto, uma afecção sistêmica do tecido conjuntivo, com origem desconhecida que se manifesta, predominantemente, com dano repetido e crônico das estruturas articulares, pararticulares e tendinosas, inflamando o substrato anatômico principalmente da membrana sinovial, que pode ocorrer em todas as idades. A AR está sempre associada com significativo estado de dor e, por isso, mostra-se como fator importante na limitação do dia-a-dia dos pacientes e em suas habilidades laborais. Neste sentido, as mulheres também sofrem mais que os homens, uma vez que, demonstram queda em sua produtividade no trabalho, declínio progressivo em sua funcionalidade, dor e estresse psicológico maior do que nos homens (Cunha et al., 2007).

Várias evidências indicam uma participação crucial de citocinas pró-inflamatórias em sua patogênese, particularmente o TNF- α . A IL-17 desempenha importante papel na inflamação sinovial, aumentando a formação do pannus (interface entre a cartilagem e o sítio com erosão ativa), e está associada à destruição de cartilagem osso, além de manter um mecanismo de autoregulação da expressão da IL-27, responsável pela regulação da resposta imune mediada por células T, devido a potencializar a expressão da IL-27 nos macrófagos sinoviais (Baek et al., 2012).

Os neutrófilos são abundantes no fluido sinovial, além de serem encontrados na cartilagem e no pannus de pacientes com AR, particularmente nos estágios iniciais da doença (Mohr et al., 1995). Estes polimorfonucleares são atraídos para as articulações por quimioatraentes freqüentemente detectado no fluido sinovial da AR, como o LTB₄, C5a, IL-8 e TGF- β . Uma vez recrutados para as articulações, os neutrófilos ficam expostos a uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α , GM-CSF e IL-6 (Feldman et al., 1998).

Evidências mais diretas do envolvimento dos neutrófilos na patogênese da AR têm sido demonstrado em modelo animal K/BxN (Wipke & Allen, 2001). Neste modelo, foi investigado o papel dos neutrófilos na resposta inflamatória em resposta ao soro de animais K/BxN transgênico. Os animais foram pré-tratados com um anticorpo monoclonal para a depleção de neutrófilos anteriormente a transferência do soro artritogênico, e avaliado as condições clínicas e de inflamação nas articulações. Na ausência dos neutrófilos, os animais se mostraram resistentes aos efeitos inflamatórios do soro de animais K/BxN. Interessante que a depleção dos neutrófilos após 5 dias da transferência do soro reverteu à reação inflamatória das

articulações. Estes resultados demonstram o papel fundamental que os neutrófilos possuem na iniciação e manutenção do processo inflamatório nas articulações.

Considerando que a severidade das disfunções temporomandibulares na AR pode levar a seqüelas graves e que a magnitude do envolvimento da ATM está relacionado à severidade da AR (Yoshida et al., 1998; Celiker et al., 1995; Liu et al., 2003), o desenvolvimento do trabalho proposto contribui para um melhor entendimento das alterações na ATM decorrentes do processo inflamatório induzido pela AR, auxiliando em diagnósticos mais precisos e condutas terapêuticas mais eficazes.

Proposição

O presente estudo teve como objetivos quantificar a hiperalgesia inflamatória induzida pela AR em diferentes intervalos de tempo através de análises comportamentais do teste da formalina na ATM, caracterizando o processo inflamatório induzido pela AR através da avaliação da migração de neutrófilos e extravasamento plasmático, expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) e análises histológicas para avaliação da degeneração tecidual.

Metodologia

Animais: Para realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar pesando entre 150 a 250 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos

claro/escuro de 12h) com alimentação e água, ad libitum. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos de ética em experimentação animal, e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – UNICAMP (#2731-1) (ANEXO 1).

Procedimentos gerais: Para administração de drogas na região das ATMs, uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 µl) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo.

Protocolo de imunização com mBSA: Os animais foram imunizados com mBSA por meio do seguinte protocolo: cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 0,2ml de uma emulsão contendo 100 µg de mBSA diluída em volumes iguais de PBS e CFA. Os animais receberam doses de reforço (100 µg de mBSA animal) sete e quatorze dias após o início da imunização, porém para isto foi utilizado IFA no lugar do CFA. Os animais controle receberam o mesmo tratamento aplicado aos demais, porém sem a administração de mBSA. Sete dias após a terceira imunização (21º dia), os animais receberam como desafio uma injeção intra-articular de mBSA.

Teste da formalina na ATM

Teste da formalina na ATM: Uma injeção intra-articular de formalina em concentração sublimiar (0.5%; Fisher et al., 2007) foi utilizada como recurso para demonstrar a hiperalgesia inflamatória induzida pela AR na ATM de ratos. As sessões de teste foram realizadas durante a fase clara entre 9h e

17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (Rosland, 1991). Durante o teste os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Para a realização das análises comportamentais uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (Abbott et al. 1986).

Injeções na região da ATM: Para administração de drogas na região da ATM direita os animais foram brevemente anestesiados por inalação de Isoflurano.

Teste comportamental: Imediatamente após a injeção intra-articular o animal já consciente, foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 min., divididos em 15 blocos de 3 min. O tempo em segundos que o animal permanecerá coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantar reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (Roveroni et al., 2001). Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse

comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (Roveroni et al., 2001).

Eletroforese e Western Blot para avaliação da expressão da molécula de adesão celular (ICAM): Amostras do homogeneizado do tecido periarticular foram trituradas em tampão PBS, pH 7.4, contendo inibidores de protease: etilenodiaminatetracetato de sódio (EDTA) 10 mM, Benzamidina 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,3 mM, Aprotinina 0,3 µM e β-mercaptoetanol 2 mM, em banho de gelo. Uma alíquota do homogeneizado foi separada para dosagem de proteínas. Em seguida as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas "overnight" a 4°C com tampão de bloqueio [PBS 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% Tween 20]. As membranas foram lavadas três vezes com PBS 0,1% Tween 20. Em seguida foram incubadas em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,1% Tween 20 contendo anticorpo anti-ICAM ou anti-α-tubulin (Santa Cruz). Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado HRP e novamente lavadas. As membranas foram então reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual de instruções. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário

ELISA: de acordo com instruções dos fabricantes foi utilizada para quantificação da liberação das citocinas IL12 e IL18 do tecido periarticular.

Extravasamento Plasmático:

Procedimentos Gerais: Os animais foram anestesiados com uma mistura de uretano e α -cloralose (100mg/kg e 50mg/kg, respectivamente), injetada intraperitonealmente. Uma dose de anestésico suplementar de uretano (metade da dose inicial) foi administrada quando necessário (Hu et al., 1990). Após a anestesia, o animal foi submetido à entubação da traquéia e canulação da veia femural esquerda.

Injeções na região da ATM: Para realização das injeções na região da ATM direita, uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 μ l) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo.

Averiguação da inflamação: Para averiguação da inflamação, todos os animais receberam 6mg/kg do corante Azul de Evans a 0,1% (Fiorentino et al., 1999), endovenosamente através da veia femural esquerda, vinte minutos antes do sacrifício do animal (tempo necessário para o efeito do corante). Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção foi identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado (Haas et al., 1992), permitindo assim remoção adequada dos tecidos periarticulares e posterior análise do extravasamento plasmático através de técnicas espectrofotométricas. O animal foi submetido à perfusão cardíaca com soro fisiológico, o tecido periarticular foi removido e armazenado a -20°C para posterior análise. Para a extração do corante, o tecido periarticular de cada animal foi pesado e imerso em diferentes tubos de

eppendorffs contendo 1 ml de formamida mantidos a 60°C por 24 h (Fiorentino et al., 1999). Após a extração, a quantidade de corante extravasada no tecido foi determinada em um leitor de microplacas que medirá a absorbância das diferentes soluções de formamida ($\lambda=620$ nm) simultaneamente. Os resultados dessas leituras foram posteriormente comparados com os resultados de leituras correspondentes a soluções com quantidades conhecidas do corante Azul de Evans (curva de calibração com 4 μ g, 2 μ g, 1 μ g e 0,5 μ g de corante por ml de formamida). Finalmente, a quantidade de corante extravasada (μ g) em cada solução foi dividida pelo peso (g) do respectivo tecido incubado. Dessa forma, o extravasamento foi calculado em micrograma de corante por grama de tecido dissecado.

Quantificação da migração leucocitária: Para a avaliação da migração de neutrófilos, os animais foram mortos e um lavado intra-articular (2x) com 5 μ l de PBS contendo EDTA (1 mM) foi realizado. Este lavado foi diluído em 90 μ L de PBS/EDTA e a partir deste, realizadas a contagem total e diferencial dos leucócitos.

Contagem total dos leucócitos: Alíquotas de 10 μ L do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:2, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual e expressa como número de células $\times 10^4$ /cavidade articular.

Contagem diferencial dos leucócitos: As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota do lavado intra-articular e coradas pelo corante panótico rápido. As células foram

examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade articular foi calculada pela porcentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^4$ /cavidade.

Análise histológica da degeneração tecidual induzida pela AR na ATM de ratos:

Foi realizada uma análise histológica dos tecidos articulares para avaliação da degeneração tecidual induzida pela artrite reumatóide na ATM de ratos. Para isto foram feitos cortes histológicos das ATMs os quais receberão coloração com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados de forma qualitativa de acordo com as células inflamatórias, intensidade do infiltrado e degeneração tecidual. As análises foram mensuradas por um examinador cego as condições experimentais.

Forma de análise dos resultados: Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Os dados foram apresentados pela média $\pm$ o Erro Padrão. O programa GraphPad Prism 4.0 foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos.

Discussão

A AR é uma doença inflamatória crônica e progressiva caracterizada por sinovite e destruição articular severa (Di Paola e Cuzzocrea, 2008). Particularmente, nos últimos anos, estudos tem demonstrado uma alta prevalência de disfunções temporomandibulares (DTMs) em pacientes com AR produzindo dor, rigidez articular e limitação de abertura comprometendo as funções estomatognáticas (Lin et al., 2007; Goupille et al., 1993; Akerman et al., 1988).

Sendo uma desordem sistêmica a qual pode envolver várias articulações do corpo incluindo a articulação temporomandibular (ATM). A ATM quando afetada pela artrite reumatóide pode produzir dor, rigidez articular e limitação de abertura comprometendo as funções estomatognáticas (Lin et al., 2007; Goupille et al., 1993; Akerman et al., 1988).

Estima-se que a prevalência global de adultos com AR está perto de 1%, sendo que as mulheres são afetadas de três a quatro vezes mais do que homens, apresentando os sintomas entre 35 a 50 anos de idade (Symmons et al., 2002). Apesar da severidade das DTMs na AR, estas são frequentemente ignoradas pelos reumatologistas ou pelos próprios pacientes, uma vez que, os tratamento são centrados em outras articulações, além das limitações das técnicas de diagnóstico (Arabshahi et al., 2006).

Apesar das discrepâncias relatadas nos estudos sobre a prevalência do envolvimento da ATM nas condições da AR (5 a 88%) (Twilt et al., 2008; Lin et al., 2007) é claro o envolvimento da ATM nesta patologia e suas complicações. Tem sido relatado que a incidência de rigidez muscular mastigatória é de 17,8%; ruídos

na ATM, 14,3%; dor de cabeça, 7,2%; dor no pescoço, 13,5%; bruxismo, 8,4%, e apertamento, 9,9%. Relatos de associação ao estresse ocorreram em 12,8% (Choi et al, 2002). A literatura justifica esta discrepância de resultados entre os estudos de prevalência devido a uma não padronização os critérios e técnicas de diagnóstico (Twilt et al., 2008; Lin et al., 2007).

O desenvolvimento do presente estudo viabilizou padronizar um novo modelo experimental de hiperalgesia inflamatória persistente induzida pela AR na ATM de ratos. Este novo protocolo experimental irá permitir uma série de estudos para melhor compreensão da progressão da doença e caracterizar as DTMs vinculadas a esta.

Resultados

Em um prévio com o modelo experimental de indução de AR na ATM de ratos proposto neste projeto foi demonstrado que 24 horas após a injeção intra-articular de diferentes doses do desafio (mBSA 1, 3 e 10 µg/ATM) ou solução controle (PBS), os animais imunizados receberam uma injeção intra-articular de uma dose sublimiar de formalina (0.5%, Fisher et al., 2007) para avaliar a hiperalgesia inflamatória induzida pela AR. Os resultados demonstraram que a injeção intra-articular de mBSA (10, mas não 0, 1 e 3µg/ATM; Fig. 1) induziu uma resposta nociceptiva significativamente maior ($p<0.05$) em relação aos demais grupos (Quinteiro et al., 2012). Estes resultados sugerem que a AR na ATM induz a um processo de hiperalgesia inflamatória. Para confirmar o pico de ação desta resposta inflamatória os experimentos foram refeitos em diferentes tempos após a injeção do desafio (mBSA

10 $\mu\text{g}/\text{ATM}$). O desafio com mBSA (10 $\mu\text{g}/\text{ATM}$) induziu resposta comportamental nociceptiva significativamente maior que o grupo controle a partir de 12 horas ($p<0.05$), mantendo um patamar de respostas até 24 horas e mostrando um declínio na resposta nociceptiva com 48 horas (Fig. 1).

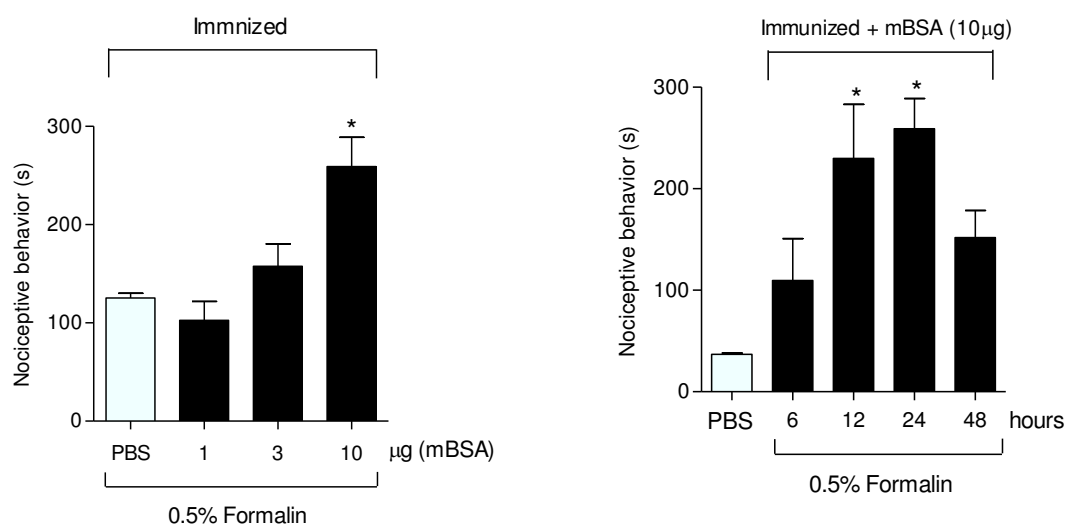
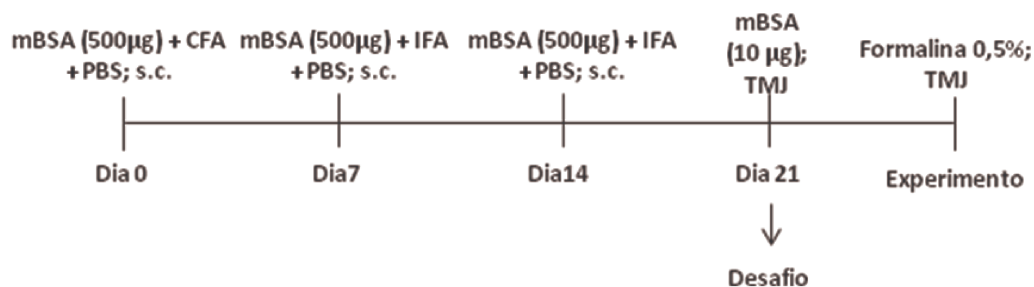


Figura 1. Hiperalgesia inflamatória induzida pela artrite reumatóide na ATM – (A) Injeção intra-articular de Albumina Bovina (mBSA; 10 μg) induziu resposta nociceptiva significativamente maior que os demais grupos ($p<0,05$: ANOVA, Tukey test). **(B)** Injeção intra-articular de mBSA (10 μg) induziu resposta nociceptiva significativamente maior que o grupo controle (PBS) entre 12 e 24 horas ($p<0,05$: ANOVA, Tukey test) apresentando um declínio depois de 48 horas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ EPM. O símbolo (*) indica resposta nociceptiva significativamente maior em relação ao grupo controle (PBS).

Baseados nestes resultados, o presente estudo avaliou as características e a progressão do processo inflamatório induzido pela AR na ATM de ratos. Sendo assim, todos os animais foram submetidos ao seguinte protocolo experimental:



Nos dias 1, 3, 7, 14, 21 ou 30 dias após o **desafio**, os animais receberam uma injeção intra-articular de uma dose sublimiar de formalina 0,5% e submetidos à análise comportamental para avaliação da hiperalgesia inflamatória. A hiperalgesia inflamatória foi observada apenas 1 dia após o desafio (Figura 2), conforme previamente observado (Quinteiro et al., 2012). Não foi observada hiperalgesia inflamatória nos demais tempos testados após o desafio.

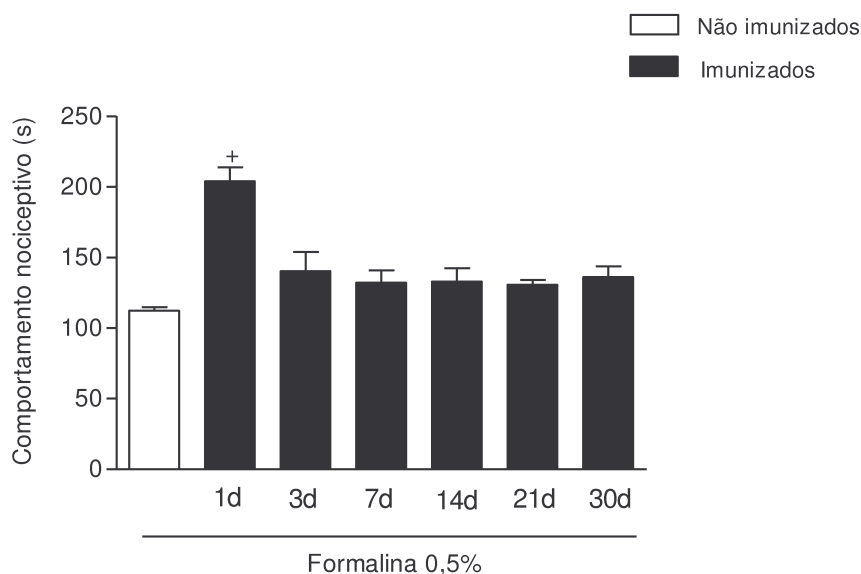
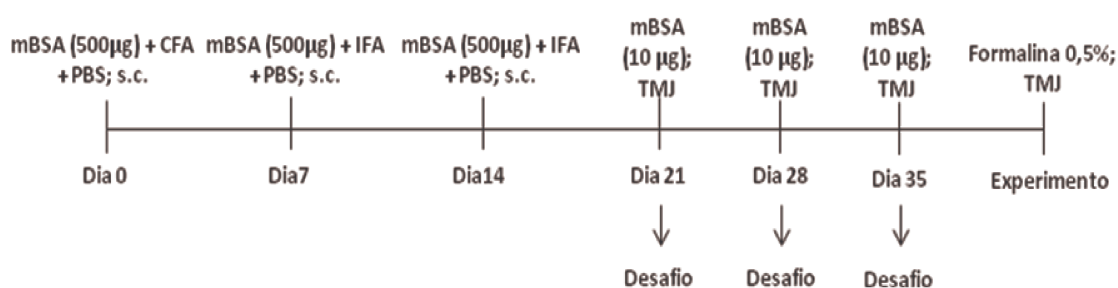


Figura 2. Avaliação da progressão da hiperalgesia inflamatória induzida pela artrite reumatóide na ATM – Injeção intra-articular de mBSA (10 µg) induziu resposta nociceptiva significativamente maior que o grupo controle (não imunizados) apenas 01 dia após o desafio ($p < 0,05$, ANOVA: Tukey test). Não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos os demais grupos ($p > 0,05$: ANOVA, Tukey test). Os valores estão expressos pela

Média $\pm$ EPM. O símbolo (*) indica resposta nociceptiva significativamente maior em relação ao grupo controle.

Estes resultados sugerem que o modelo utilizado é apropriado apenas para o estudo da indução da hiperalgesia inflamatória induzida pela AR. Apenas um desafio na ATM gera a hiperalgesia inflamatória, no entanto, o organismo consegue reverter este quadro. Sendo assim, propomos uma adequação no modelo. Os animais foram imunizados conforme previamente previsto, porém, receberam injeções intra-articulares do desafio (mBSA 10 μ g/ATM/ semana) durante 3 semanas. O objetivo foi utilizar o desafio mimetizando microtraumas para induzir no animal uma hiperalgesia inflamatória persistente e assim viabilizar a progressão da doença na ATM. Sendo assim, em uma nova etapa do projeto todos os animais foram submetidos ao seguinte protocolo experimental:



A análise da hiperalgesia inflamatória persistente, considerando este novo modelo experimental foi realizada 7 e 14 dias após o último desafio na ATM. Os resultados demonstraram que sendo realizadas 03 injeções de mBSA (10 μ g/ATM/semana) durante 03 semanas, foi possível induzir uma hiperalgeisa

inflamatória persistente observada 7 e 14 dias após a última injeção (desafio) (Figura 3).

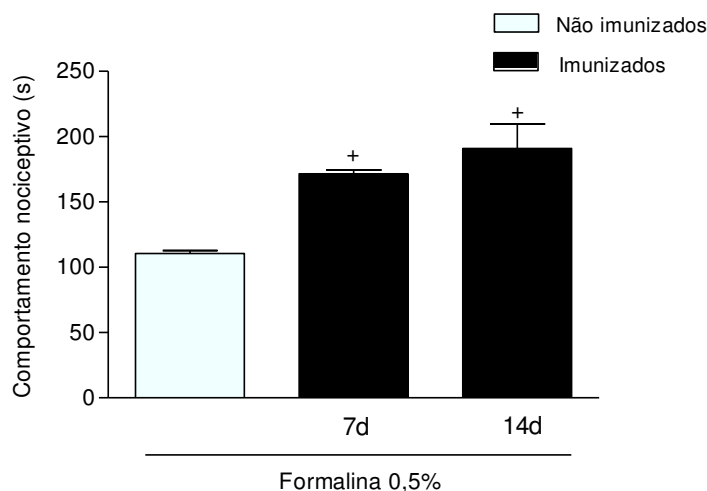
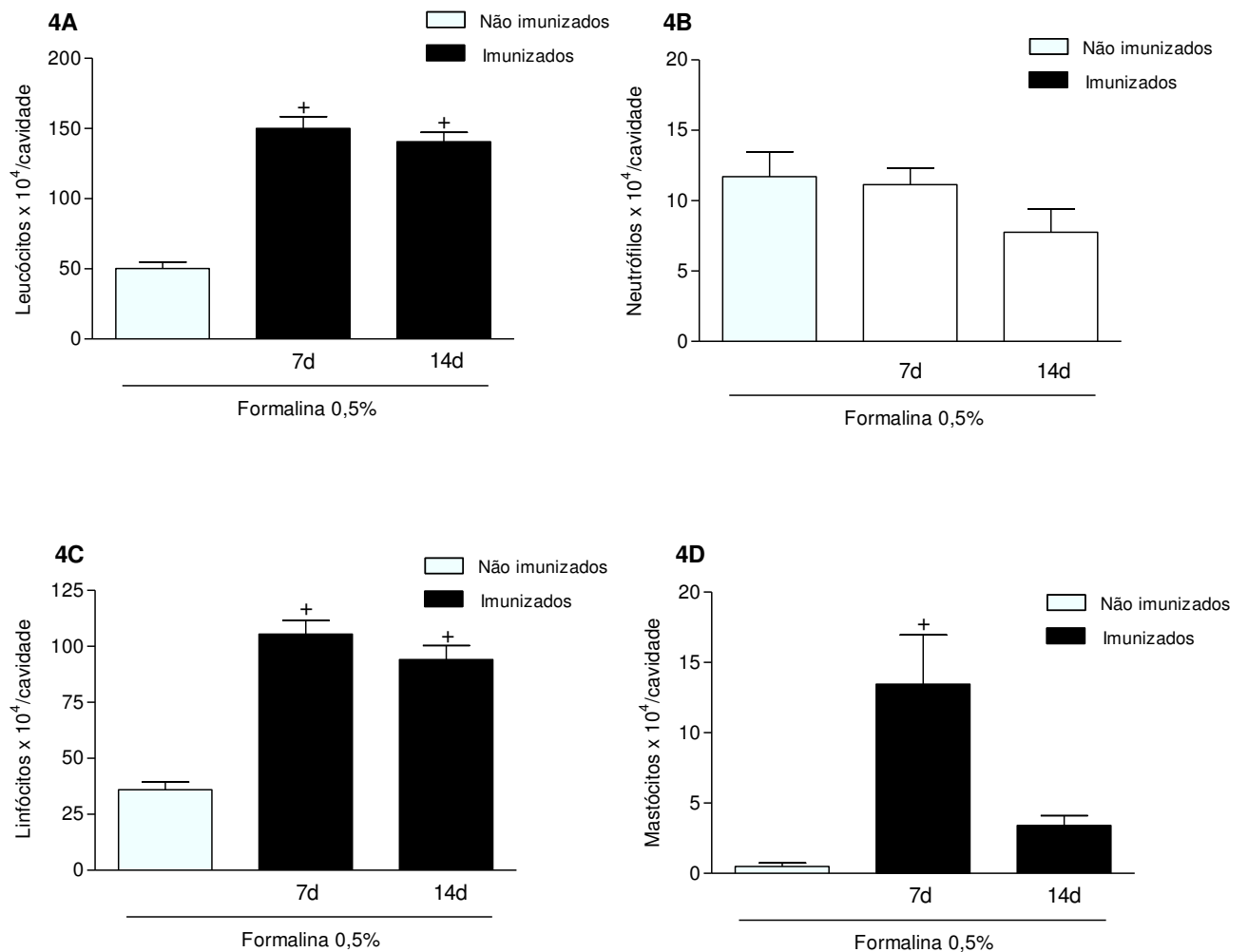


Figura 3. Hiperálgia inflamatória persistente induzida pela artrite reumatóide na ATM.

O desafio com 03 injeções de mBSA (10 µg) induziu uma hiperálgia inflamatória persistente observada 07 e 14 dias após o último desafio quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey test). Os valores estão expressos pela Média $\pm$ EPM. O símbolo (+) indica resposta nociceptiva significativamente maior em relação ao grupo controle.

Para confirmar se esta a hiperálgia inflamatória persistente é decorrente da progressão do processo inflamatório induzido pela AR na ATM, foi realizado a contagem total e diferencial de leucócitos do lavado intra-articular (Figura 4), assim como a quantificação de proteínas plasmáticas extravasadas no tecido periarticular (Figura 5), liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-18 (Figura 6) e a expressão da molécula de adesão celular ICAM 1 (Figura 7).

Os resultados demonstraram que o protocolo utilizado induziu uma migração de células inflamatórias significativamente maior em relação ao grupo controle que se manteve até 14 dias após os tratamentos. Através da contagem diferencial foi possível demonstrar que este aumento de leucócitos presente 7 e 14 dias após os tratamentos se deve principalmente a linfócitos (Fig. C) e macrófagos (Fig. E).



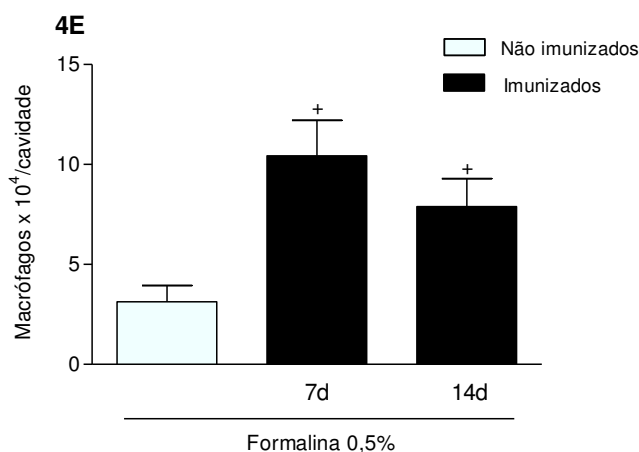


Figura 4. Avaliação da migração leucocitária na hiperalgesia inflamatória induzida pela AR na ATM. (A) O desafio com 03 injeções de mBSA (10 µg; animais imunizados) induziu uma migração leucocitária observada 07 e 14 dias após o último desafio significativamente maior quando comparado ao do grupo controle (não imunizados) ($p < 0,05$: ANOVA; Tukey test). **(B)** Não houve diferença estatística ($p > 0,05$: ANOVA, Tukey test) entre os grupos imunizados e controle em relação a migração de neutrófilos. **(C)** Os animais imunizados apresentaram uma migração de linfócitos significativamente maior em relação ao grupo controle ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test) 07 e 14 dias após os tratamentos. **(D)** Os animais imunizados apresentaram uma migração de mastócitos significativamente maior em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test) apenas 07 dias após os tratamentos. **(E)** Os animais imunizados apresentaram uma migração de macrófagos significativamente maior em relação ao grupo controle ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test) 07 e 14 dias após os tratamentos. Para todos os gráficos, os valores estão expressos pela Média $\pm$ EPM. O símbolo (+) indica resposta nociceptiva significativamente maior em relação ao grupo controle.

A análise do extravasamento de proteínas plasmáticas demonstrou que os animais imunizados apresentam um maior extravasamento de proteínas plasmáticas em relação ao grupo controle que se mantém até 14 dias após os tratamentos (Figura 5).

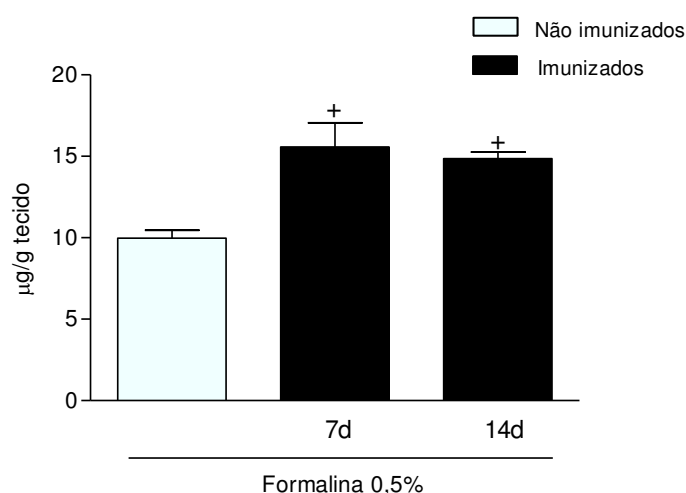
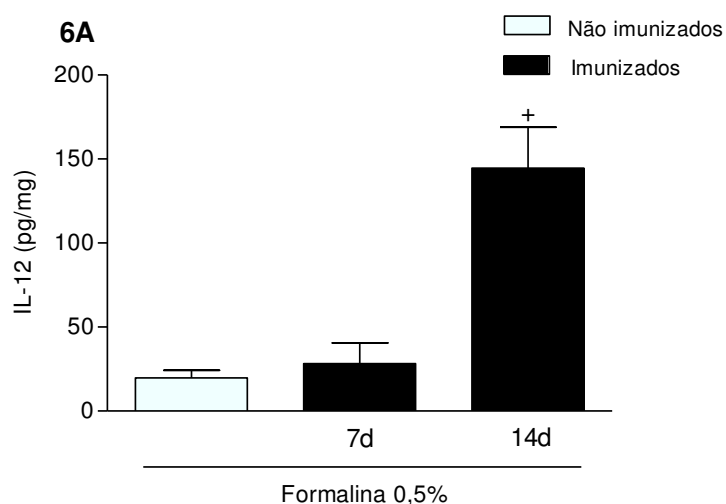


Figura 5. Avaliação do extravasamento de proteínas plasmáticas na hiperalgesia inflamatória induzida pela AR na ATM. O desafio com 03 injeções de mBSA (10 µg) induziu um extravasamento de proteínas plasmáticas observado 07 e 14 dias após o último desafio significativamente maior quando comparado ao grupo controle (não imunizados) ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey test). Os valores estão expressos pela Média $\pm$ EPM. O símbolo (+) indica resposta nociceptiva significativamente maior em relação ao grupo controle.

Tendo em vista que a hiperalgesia persistente no modelo proposto de indução de artrite está vinculada a um aumento expressivo de linfócitos, foi realizado a quantificação das Interleucinas IL-18 e IL-12 através do método ELISA. A IL-12 está envolvida no favorecimento da diferenciação de células T helper 1 (T (H) 1) em um modo de amadurecimento de ambas as células T CD8 + CD4 + além de formar um elo entre a resistência inata e imunidade adaptativa. As células dendríticas (DCs) e fagócitos produzem IL-12 em resposta a patógenos durante a infecção (Trinchieri

G., 2003). Já a IL-18, na artrite reumatóide, tem sua expressão relacionada a IL-1 β e TNF- α e está correlacionada com a resposta da fase aguda, indicando que a IL-18 é uma importante citocina que conduz a produção de IL-1 β e TNF- α (Joosten et al., 2003) e também contribui para o desenvolvimento e manutenção da resposta imune adquirida na AR pela promoção da diferenciação de células T (Dai et al., 2007). A IL-1 β e TNF- α estão são considerado as citocinas principais do desenvolvimento da cascata da hiperalgesia inflamatória (Verri et al., 2009). Corroborando estes estudos, os resultados demonstraram a hiperalgesia inflamatória persistente está envolvida com o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-18 (Figura 5).



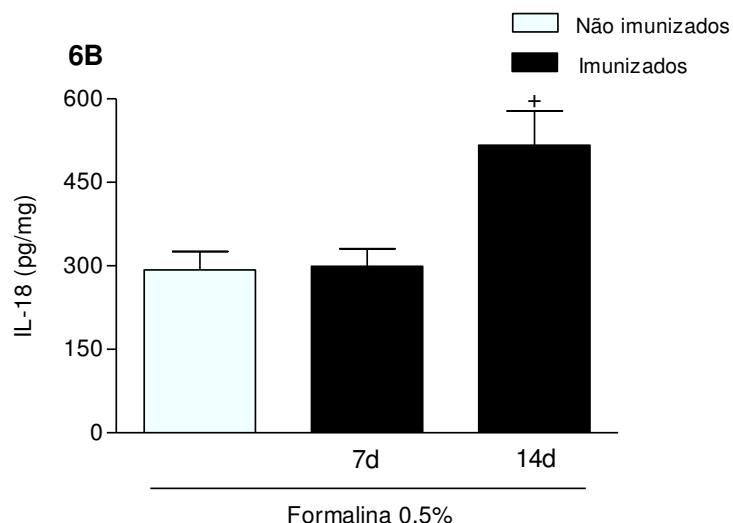


Figura 6. Quantificação da liberação das citocinas IL-12 e IL-18 do tecido periarticular. O desafio com 03 injeções de mBSA (10 µg) induziu uma liberação da citocina IL-12 (Fig. 5A) e IL-18 (Fig. 5B) significativamente maior 14 dias após os tratamentos quando comparado ao grupo controle (não imunizados) ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). Os valores estão expressos pela Média $\pm$ EPM. O símbolo (+) indica resposta nociceptiva significativamente maior em relação ao grupo controle.

As interações adesivas entre leucócitos e células endoteliais são desencadeadas e moduladas por moléculas de adesão. A aderência leucocitária ocorre após a ligação de integrinas leucocitárias a membros da superfamília de imunoglobulinas, dentre eles destaca-se proteína transmembrana denominada de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) expressa em células endoteliais (Campbell et al., 1996, 1998). Considerando que o mecanismo do processo inflamatório envolve adesão de leucócitos e sua transmigração mediados pelas integrinas do tipo $\beta 2$, os quais se interagem com a ICAM, foi avaliado a expressão desta molécula. Corroborando os dados demonstrados referente a migração de células inflamatórias, a expressão da ICAM-1 aumentou significativamente nos animais imunizados quando comparados ao grupo controle (Figura 7).

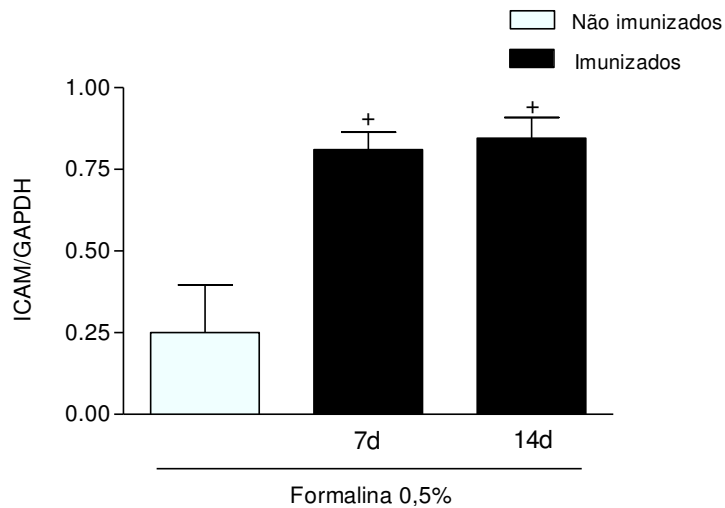


Figura 7. Expressão da ICAM-1 no tecido periarticular. O desafio com 03 injeções de mBSA (10 µg) induziu uma expressão da ICAM-1 significativamente maior 07 e 14 dias depois dos tratamentos quando comparado ao grupo controle (não imunizados) ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). Os valores estão expressos pela Média $\pm$ EPM. O símbolo (+) indica resposta nociceptiva significativamente maior em relação ao grupo controle.

Referências Bibliográficas:

- Abbott F.V., Franklin, K.B. and Connell, B. Eur J Pharmacol. 1986; 126: 141-4.
- Akerman S, Kopp S, Nilner M, Petersson A, Rohlin M. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988; 66:639-43.
- Arabshahi B, Cron RQ. Curr Opin Rheumatol. 2006 Sep; 18(5): 490-5.
- Baek SH, Lee SG, Park YE, Kim GT, Kim CD, Park SY. Inflamm Res. 2012 Jul 24
- Baharav E, Bar M, Taler M, Gil-Ad I, Karp L, Weinberger A, Weizman A. Neuroimmunomodulation. 2012 Jul 12;19(5):309-318.
- Campbell, J.J.; Hedrick, J., Zlotnik, A.; Siani, M. A.; Thompson, D. A.; Butcher, E.C. Science 1998; 279(5349):381-384.
- Campbell, J.J.; Qin, S.; Bacon, K. B.; Mackay, C. R.; Butcher, E. C. J. Cell Biol 1996; 134(1):255-266.
- Celiker R, Gökçe-Kutsal Y, Eryilmaz M. Scand J Rheumatol. 1995; 24(1): 22-5.
- Choung PH, Moon HS, Kim SGJ. Oral Maxillofac Surg. 2002 Jul;60(7):797-803
- Cunha SC, Nogueira RV, Duarte AP, Vasconcelos BC, Almeida Rde A. 2007 Jan-Feb;73 (1):19-26.
- Dai, S.M., Shan Z.Z., Xu, H., Nishioka, K., 2007. Cellular targets of interleukin-18 in rheumatoid arthritis. Ann Rheum. Dis. 66, 1411-1418
- Feldman M, Taylor P, Paleolog E, Brennan FM, Maini RN. Transplant Proc. 1998 Dec; 30(8): 4126-7.
- Fiorentino, P.M., Cairns, B.E. and Hu, J.W., Arch Oral Biol. 1999; 44: 27-32.

- Fischer L, Clemente JT, Tambeli CH. *J Pain*. 2007 May; 8(5): 437-42.
- Goupille P, Fouquet B, Goga D, Cotty P, Valat JP. *J Dent*. 1993; 21:141–6.
- Haas D.A., Nakanishi, O., MacMillan, R.E., Jordan, R.C. and Hu, J.W. *Arch Oral Biol*. 1992; 37.
- Hu, J.W., *Pain*. 1990; 41: 331-45.
- Joosten LA, Radstake TR, Lubberts E, van den Bersselaar LA, van Riel PL, van Lent PL, Barrera P, van den Berg WB. *Arthritis Rheum*. 2003 Feb;48(2):339-47.
- Kapoor SR, Hider SL, Brownfield A, Matthey DL, Packham JC. *Clin Exp Rheumatol*. 2011 Nov-Dec;29(6 Suppl 69):S88-91
- Lin YC, Hsu ML, Yang JS, Liang TH, Chou SL, Lin HY. *J Chin Med Assoc*. 2007 Dec; 70(12): 527-34.
- Liu HT, Chiu FY, Chen CM, Chen TH. *JChin Med Assoc*. 2003; 66:533-6.
- Mohr W. *J Rheumatol*. 1995; 22:1436–1437.
- Quinteiro MS, Napimoga MH, Mesquita KP, Clemente-Napimoga JT. *European Journal of Pain*. 2012; 16:1106-1115.
- Rosland J.H. *Pain*. 1991; 45: 211-6.
- Roveroni, R.C., Parada, C.A., Cecilia, M., Veiga, F.A. and Tambeli, C.H., *Pain*. 2001; 94: 185-91.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. *Lancet*. 2010; 376 (9743):1094-108.
- Symmons D, Turner G, Webb R, et al. *Rheumatology (Oxford)*. 2002; 41: 793–800.
- Trinchieri G., *Nat Rev Immunol.*, 2003 Feb;3(2):133-46.
- Twilt M, Schulten AJ, Verschure F, Wisse L, Prahl-Andersen B, van Suijlekom-Smit LW. 2008 Apr 15; 59(4): 546-52.

- Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Pharmacol Ther. 2006; 112(1): 116-138.
- Wipke BT, Allen PM. J Immunol. 2001; 167:1601–1608.
- Yoshida A, Higuchi Y, Kondo M, Tabata O, Ohishi M. Cranio. 1998; 16: 162–7.