



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

BEATRIZ HIDALGO CEOTTO

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO
COM ÔMEGA 3 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
INDUZIDO POR CFA EM RATOS: ESTUDO PILOTO**

PIRACICABA

2019

BEATRIZ HIDALGO CEOTTO

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO
COM ÔMEGA 3 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
INDUZIDO POR CFA EM RATOS: ESTUDO PILOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
APRESENTADO PELA ALUNA BEATRIZ HIDALGO
CEOTTO E ORIENTADA PELO PROF. DR. SIDNEY
FIGUEROBA RAIMUNDO

PIRACICABA
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

C333e Ceotto, Beatriz Hidalgo, 1995-
Efeito da associação do ácido acetilsalicílico com ômega 3 no processo inflamatório induzido por CFA em ratos : estudo piloto / Beatriz Hidalgo Ceotto. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Sidney Figueroba Raimundo.

Coorientador: Francisco Carlos Groppo.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Articulação temporomandibular - Doenças. 2. Ácidos graxos insaturados. 3. Citocinas. 4. Inflamação. 5. Aspirina. I. Figueroba Raimundo, Sidney, 1963-. II. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: The effect of association of aspirin and omega 3 in a CFA-induced inflammatory process in the temporomandibular joint (TMJ) of rats: a pilot study

Palavras-chave em inglês:

Temporomandibular joint - Diseases

Unsaturated fatty acids

Cytokines

Inflammation

Aspirin

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Milton e Aida e aos meus irmãos Giovani e Milton que são a minha base e espelho nessa vida.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPESP , processo nº 2017/17472-3.

Agradeço a Faculdade Estadual de Campinas e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba , por todo o suporte necessário.

Agradeço a todos que contribuíram no decorrer desta jornada, em especialmente:

A minha família que sempre me apoiou.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e pelo conhecimento transmitido e pelo papel fundamental neste trabalho.

Aos meus amigos pelo companherismo e disponibilidade Beatriz Martins , Fernanda Murrad , Maria Julia Francisco , Dreyson Motta, Amicio Castro , Marina Tersi, por me auxiliarem em vários momentos. Agradeço o Thomas Barbin, boa parte do material foi do trabalho dele.

O pesquisador Luiz Eduardo Ferreira pela ajuda no Imunoensaio de Elisa

Aos Técnicos do Biotério e a Técnica do Laboratório de Farmacologia, pelo apoio com o trabalho.

,

RESUMO

As desordens temporomandibulares (DTM) cobrem um conjunto de alterações craniofaciais, que podem envolver a ATM, mastigando músculos e estruturas associadas. Ao contrário de outros inibidores da ciclooxigenase, o ácido acetilsalicílico (AAS) aumenta a formação de lipoxinas derivadas de ácido aracidônico, que ajudam na resolução da inflamação. As Resolvinas originárias de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o eicosapentaenóico tipo 3 (ômega-3 ou ω -3), são catalisadas por AAS e têm ação anti-inflamatória em doenças cardiovasculares e artrite reumatóide. Os objetivos deste estudo foram avaliar aspectos morfológicos e histoquímicos "in vivo" e imunoensaio ELISA em tecidos de ATM em animais com artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) associada ao colágeno bovino tipo II (IIC). 32 ratos machos adultos (*Rattus Norvegicus Albinus*, Wistar), distribuídos igualmente nos seguintes grupos, foram utilizados: G1 – injeção de 100 μ L de NaCl 0,89% na base da cauda; G2-100 μ L de CFA + IIC injetados na base da cauda; G3 - 100 ml CFA + injeção de IIC na base da cauda, com a administração intragástrica diária de 300 mg/kg de ω -3, por 7 dias; G4-100 ml CFA + IIC injeção na base da cauda, com administração intragástrica diária de 300 mg/kg de ω -3 + ácido acetilsalicílico 20 mg/kg/dia I.P. por 7 dias. Os animais foram mortos após sete dias de tratamento e a ATM em ambos os lados foi retirada. Uma das ATM foi submetida, após fixação e descalcificação, ao processamento histológico (Hematoxilina e Eosina HE, Azul de Toluidina e Picrossirius Vermelho-Hematoxilina). A ATM contralateral foi submetida à maceração e centrifugação em tampão de extração celular (tampão Tris-HCL 50mM, pH 7,5). O sobrenadante foi submetido à Imunoensaio (ELISA) para avaliação de citocinas pró-inflamatórias (IL1- β e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10). A leitura foi realizada por espectrofotometria. A análise dos dados foi feita pelos testes Kruskal-Wallis e de Dunn. Os resultados mostram que o tratamento com ômega-3 sozinho ou associado ao AAS aumentou ($p < 0.0001$) a espessura total da ATM em relação ao controle com CFA. Não houve efeito adicional do AAS ($p = 0.0698$) no efeito do ômega. Da mesma forma, não houve efeito adicional ($p > 0.05$) do AAS no efeito observado com o ômega em nenhuma das citocinas. Tanto o ômega sozinho quanto associado ao AAS diminuíram significativamente as concentrações das citocinas IL-1 β e TNF- α , além de aumentarem a concentração da IL-10. Concluímos que o ácido graxo ômega-3 exerce uma atividade anti-inflamatória na ATM de ratos com inflamação induzida, sendo que o ácido acetilsalicílico não ofereceu efeito adicional.

Palavras-chave. Disfunção temporomandibular. Ômega-3. Citocinas. Inflamação. Ácido acetilsalicílico.

ABSTRACT

Temporomandibular Disorders (TMD) cover a set of craniofacial alterations, which may involve TMJ, chewing muscles and associated structures. Unlike other cyclooxygenase inhibitors, acetylsalicylic acid (AAS) increases the formation of lipoxins derived from arachidonic acid, which help in the resolution of inflammation. The Resolvinas originating from polyunsaturated fatty acids, especially eicosapentaenoic type 3 (Omega-3 or ω -3), are catalysed by AAS and have anti-inflammatory action in cardiovascular diseases and rheumatoid arthritis. The objectives of this study were to evaluate "in vivo" morphological and histochemical aspects and ELISA immunoassay in TMJ tissues in animals with Freund complete adjuvant-induced arthritis (CFA) associated with bovine type II collagen (IIC). 32 adult male rats (*Rattus norvegicus* Albinus, Wistar), distributed equally in the following groups were used: G1 - injection of 100 μ l of 0.89% NaCl at the base of the tail; G2-100 μ l of CFA + IIC injected at the base of the tail; G3-100 ml CFA + IIC injection at the base of the tail, with daily intragastric administration of 300 mg/kg of ω -3, for 7 days; G4-100 ml CFA + IIC injection at the base of the tail, with daily intragastric administration of 300 mg/kg of ω -3 + Acetylsalicylic acid 20 mg/kg/day I.P. for 7 days. The animals were killed after seven days of treatment and the ATM on both sides was withdrawn. One of the TMJ was submitted, after fixation and decalcification, to histological processing (Hematoxylin and eosin HE, toluidine Blue and Hematoxylin-Picrossirius Red). The contralateral TMJ was subjected to maceration and centrifugation in a cell extraction buffer (tris-HCL 50mM buffer, pH 7.5). The supernatant underwent immunoassay (ELISA) to evaluate pro-inflammatory (IL1- β and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines. The reading was done by spectrophotometry. Results were evaluated by ANOVA and Kruskal-Wallis, depending on data distribution and homoscedasticity of variances. Results show that treatment with omega-3 alone or associated with ASA increased ($p < 0.0001$) the total thickness of the TMJ compared to control with CFA. There was no additional effect of ASA ($p = 0.0698$) on the effect of omega. Similarly, there was no additional effect ($p > 0.05$) of AAS on the effect observed with omega in any of the cytokines. Both omega alone and ASA-associated significantly decreased IL-1 β and TNF- α cytokine concentrations and increased IL-10 concentration. We conclude that omega-3 fatty acid exerts an anti-inflammatory activity in the TMJ of rats with induced inflammation, and acetylsalicylic acid had no additional effect.

Keywords: Temporomandibular dysfunction. Omega-3. Cytokines. Inflammation, acetylsalicylic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Indução sistêmica de artrite na cauda com CFA	19
Figura 2	Corte coronal da ATM	21
Figura 3	Efeito dos tratamento na espessura total das camadas da ATM dos animais	23
Figura 4	Efeito dos tratamentos sobre a espessura de cada camada da ATM	24
Figura 5	Aspecto morfológico nas diferentes colorações da ATM	25
Figura 6	Efeito dos tratamentos sobre a concentração de citocinas nas ATM dos animais	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
3 PROPOSIÇÃO	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Fármacos	18
4.2 Animais	18
4.3 Grupos Experimentais	18
4.3.1 Injeções de CFA+ Colágeno Bovino tipo II CII na base da cauda de ratos	19
4.3.2 Obtenção dos tecidos	20
4.3.3 Processamento histológico	20
4.6 Morfometria	20
4.7 Imunoensaio	21
4.8 Análise de dados	22
5 RESULTADOS	23
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	38
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	38
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	39
Anexo 3 – Iniciação Científica	40

1 INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial de união entre a mandíbula e a base do crânio, composta por três elementos ósseos principais: côndilo mandibular, fossa mandibular e tubérculo articular do osso temporal. Apresenta também tecidos conjuntivos associados, incluindo o disco articular. Transtornos da ATM podem afetar a mandíbula e os músculos mastigatórios. Muitos fatores, como idade, sexo, fatores hormonais, traumas e estresse psicológico podem levar à adaptação fisiológica ou, caso contrário, à desorganização da ATM (Figueroba et al., 2014a). Além disso, doenças sistêmicas de caráter inflamatório e degenerativas, como osteoartrite e artrite, podem ter impacto significativo nessa articulação. Agentes anti-inflamatórios, analgésicos e relaxantes musculares têm sido usados para aliviar os principais sintomas (Dym e Israel, 2012). Outras estratégias, tais como fisioterapia, exercícios, ultrassom, terapia manual, acupuntura e laser também foram propostos (Rashid et al., 2013; Figueroba et al., 2014b). Várias abordagens têm sido adotadas para induzir inflamação aguda ou crônica na ATM, tais como o aumento de dimensão vertical, rompimento da zona bilaminar, hiper mobilidade induzida no côndilo (Embree et al., 2011; Figueroba et al., 2014a). Também pode resultar da injeção de agentes irritantes químicos, incluindo a carragenina, a ovalbumina (Habu et al., 2002) e o adjuvante completo de Freund, conhecido pela sigla CFA (Denadai-Souza et al., 2009; Wu et al., 2010; Kou et al., 2011; Wang et al., 2012; Holwegner et al., 2015). O CFA é composto de *Mycobacterium tuberculosis* mortos e secos em óleo. Este induz a artrite reumatoide patologicamente idêntica àquela que ocorre em seres humanos (Bendele, 2001). A injeção do CFA é simples e reprodutível, com foco na fase aguda da inflamação (Harper et al., 2001; Guan et al., 2005; Spears et al., 2005; Flake et al., 2006; Lai et al., 2006; Wu et al., 2010; Kou et al., 2011). Ainda não há cura para a artrite reumatoide e o objetivo do tratamento é a remissão dos sintomas para um estado em que a inflamação desapareça ou seja considerada leve. Os glicocorticoides, tanto injetados intra-articularmente, quanto extra-articularmente, por via local ou sistêmica (Caporali et al., 2013), tornaram-se padrão-ouro para o tratamento da artrite reumatoide e são amplamente utilizados (Kirwan, 2012). Entretanto, a administração intra-articular causa reações erosivas no osso e cartilagem (Ghalayani et al., 2013) e produz efeitos adversos sistêmicos (Habib, 2009). A crescente preocupação com os efeitos colaterais dos glicocorticoides, quando utilizados por longos períodos, levaram à diminuição da utilização indiscriminada na artrite reumatoide (Mota et al., 2013). Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são classificados essencialmente em ômega-3 (ω -3), ômega-6 (ω -6), ômega-7 (ω -7) e ômega-9 (ω -9). Quando metabolizado, o ácido linoleico (ω -6) forma o ácido araquidônico e EPA, sendo que o α -linolênico (ω -3) forma o

DHA. Estes ômega-6 e ômega-3 são considerados ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados por mamíferos, os quais sintetizam apenas ômega-7 e ômega-9 (Mesquita et al., 2011). Numerosos estudos de cultura celular confirmaram que tanto o EPA como o DHA pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 em vários tipos de células (Miles e Calder, 2012). O ácido acetilsalicílico (AAS) tem uma ação anti-inflamatória, analgésica, antipirética e antiagregante, a ação da aspirina não se limita ao bloqueio pró-inflamatório dos eicosanoides, a modificação do ciclo-oxigenase pela aspirina leva à geração de mediadores especializados em lipídios de pro-resolução que são produzidos apenas nos estágios tardios da inflamação (Chee et al., 2016). Resolvinas são mediadores lipídicos endógenos de ação anti-inflamatória, gerados a partir de ácidos graxos ômega-3 precursores, DHA e EPA e agem para resolver a inflamação ou minimizar os danos nos tecidos, e maximizar a proteção do tecido na inflamação aguda (Kein et al., 2013). Age reduzindo a infiltração de neutrófilos e promovendo a remoção de fagócitos, acelerando assim a Inflamação (Chee et al., 2016). As resolvinas são formadas no plasma de indivíduos a partir do EPA catalisadas pela aspirina, resultando em melhora dos sinais clínicos da inflamação (Oh et al., 2011). De forma semelhante, as resolvinas derivadas de DHA, reduzem a inflamação, diminuindo a adesão plaquetária-leucócito e a conversão de DHA desencadeada pela aspirina produz moléculas com dupla função (anti-inflamatória e de pro-resolução) (Chee et al., 2016).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Artrite Reumatóide

A AR é uma doença sistêmica, inflamatória, progressiva e autoimune, que afeta as articulações. Ela acomete mais a membrana sinovial, ocasionando uma destruição dos tecidos da cartilagem e do osso articular. Não há maior prevalência em um grupo étnico específico, mas ela ocorre com mais frequência em mulheres, sendo três vezes mais do que no homem (Silman e Pearson, 2002).

Normalmente ela afeta mais as pessoas entre 40 a 60 anos, podendo afetar qualquer idade mesmo os mais jovens. Os fatores que contribuem para o desenvolvimento desta doença são: fatores genéticos, ambientais (como cigarro e infecções variadas), produção de auto anticorpos, como o fator reumático. (Kumar et al., 2008).

Além disso, a o anticorpo anti CPP que parece ser mais sensível no diagnóstico da doença, podendo ser detectado por vários anos antes que a doença se manifeste. E também pode ser prenunciador de um pobre prognóstico, mostrando que poderá ocorrer uma destruição progressiva articular (Van der liden et al. ., 2009).

O anticorpo anti- CPP que parece ser mais sensível no diagnóstico da doença, podendo ser detectado por muito tempo antes da manifestação da doença. Pode ser prenunciador de um pobre prognóstico, mostrando que poderá ocorrer uma destruição progressiva articular (VAN DER LIDEN et al ., 2009). Sintomas como: dor, rigidez, crepitação articular, edema nas articulações, A rigidez articular ocorre com mais frequência pela manhã, podendo acometer qualquer articulação, mas as mais acometidas geralmente são punho, tornozelo, joelho e coluna cervical. (Lee e weinblatt.,2001)

Erosão óssea geralmente ocorre nas articulações das mãos e dos pés (Miles & Calder, 2012). A ATM tem diferentes características morfológicas, funcionais e biológicas em comparação com as demais articulações sinoviais (Embree et al., 2010). Revestida por uma fibrocartilagem é constituída por colágeno tipo I e as camadas mais profundas colágeno tipo II (Ghassemi et al., 2016). Isto diferencia a ATM de outras articulações com cartilagem hialina, constituídas de colágeno tipo II (Embree et al., 2011).

Mesmo com essas diferenças, a ATM pode ter as mesmas intercorrências que afetam outras articulações, incluindo AR (Aliko et al., 2011), pode ser grave e comprometer

todo o sistema mastigatório (Dimitroulis, 2005). As lesões articulares apresentam infiltração de células imunes que produzem altos níveis de mediadores químicos (Miles & Calder, 2012). Aumento do nível das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF-alfa e prostaglandina (PGE2) no líquido sinovial têm sido encontrados no desarranjo interno do ATM e na osteoartrite (Figueroba et al., 2018).

2.2 Ômega-3

O ômega-3 é um ácido muito importante para o ser humano por suas propriedades anti-inflamatórias, imunológicas. Ele atua na diminuição das citocinas e quimiocinas, o qual são proteínas anti-inflamatórias. Sendo assim esse ácido está presente em algumas plantas e animais como linhaça e peixes (salmão). (Barbalho et al., 2001)

O ser humano não consegue sintetizá-lo devido a uma falha enzimática, pela falta de algumas enzimas. Por isso que eles devem ser adquiridos através da alimentação. Estudos demonstram que a população ocidental está consumindo alimentos que possuem muito mais ômega-6 do que ômega-3, sendo o ômega-6 pró-inflamatória, e é uma das causas do crescimento desse tipo de patologia. (Barbalho et al., 2001)

O ômega-3 uma vez que está no corpo humano ele é transportado pela corrente sanguínea dentro de lipoproteínas, e muitas das células que estão incluídas na resposta inflamatória expressam receptores de lipoproteínas, por isso possuem a capacidade de aceitar esse tipo de lipoproteína e utilizar os componentes do ômega-3. (Mahoney, 1982; Calder et al., 1994).

Portanto com um aumento da ingestão de ômega-3 há maior concentração desses lipídios na corrente sanguínea e nas membranas das células através de suas incorporações nelas e assim eles conseguem alterar a formação de derivados lipídicos o que influencia na função das células que estão envolvidas na inflamação. (Jeffery et al., 1996).

Ômega-3 de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA) têm propriedades anti-inflamatórias, benéficas nas doenças cardiovasculares, artrite reumatoide (Olson et al., 2013), constituintes importantes dos fosfolipídios das membranas celulares, onde desempenham um papel na permeabilidade iônica da membrana (Calder, 2013). Pesquisa em animais relatam que os ácidos graxos reduziram a incidência e gravidade da AR (Knott et al., 2011). Redução no nível de IL-1 em um modelo *in-vitro* de inflamação de cartilagem

mostrou que o ômega 3 tem potencial terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias articulares (Wann et al., 2010). Sugerindo que suplementos de ácidos graxos melhoram a resposta inflamatória e diminuem a dose diária de NSAID em pacientes com artrite idiopática juvenil (Gheita et al., 2012).

Outra hipótese de ação do ω -3 está na competição com o estoque de ácido araquidônico ocasionando à inibição da produção de eicosanoides pró-inflamatórios. Podem servir como substratos alternativos para a ciclooxigenase (COX1 e COX2) resultando na formação de produtos menos potentes que os pró-inflamatórios (Serhan et al., 2009). Dessa forma, o ômega 3 poderia desempenhar um papel modulador das reações inflamatórias, sejam elas agudas ou crônicas.

2.3 Ácido Acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS) tem uma ação anti-inflamatória especialmente para AR, analgésica, antipirética e antiplaquetária, a ação da aspirina não se limita ao bloqueio pró-inflamatórios dos eicosanoides e inibição da COX resulta em diminuição da produção de prostaglandinas, pela geração de mediadores especializados em lipídios de pro-resolução que são produzidos apenas nos estágios tardios da inflamação (Chee et al., 2016).

Nos últimos anos, numerosos estudos descobriram que a aspirina também pode inibir proliferação de células tumorais e promover sua apoptose de maneira dependente da concentração e do tempo. Esses achados mostram a possibilidade do uso mais amplo e sob nova perspectiva no mecanismo da aspirina no tratamento da AR (Zhang et al., 2018).

A aspirina tem a capacidade de regular potentemente os neutrófilos e os mediadores, reduzindo a peritonite murina e a inflamação dérmica. RvD3 e ATRvD3 tiveram ações com leucócitos bloqueando a transmigração de neutrófilos humanos, melhorando a fagocitose e erocitose de macrófagos. Esses resultados demonstram que o RvD3 está atuando de maneira exclusiva dentro do período de resolução da inflamação como vantagem e contribuem para as ações benéficas da aspirina e dos ácidos graxos n-3 essenciais. (Jesmond Dalli, Jeremy W. Winkler, Romain A. Colas et al., 2014).

A COX-2 acetilada pela aspirina gera o ácido docosaexaenoico (17R-hidroxi-DHA), o qual na oxigenação subsequente por 5-lipo-oxigenase (LOX) resulta na produção de

(17R-hidroxi-DHA), também conhecido como resolvina D1 desencadeado por aspirina (AT-RvD1) (Lima-Garcia et al., 2011).

Esta nova função enzimática da COX-2 é única para esta enzima e não é mostrada pela COX-1. Estudos estruturais atribuem essa diferenciação enzimática à observação de que, diferentemente da COX-1, o domínio catalítico da COX-2 não é totalmente bloqueado por sua acetilação induzida por aspirina e ainda é capaz de desempenhar diferentes funções enzimática, a aspirina desencadeia a formação de lipoxinas e limita a infiltração de leucócitos na pele (Morris et al., 2009).

Uma característica associada à descoberta dos novos metabólitos oxidativos do ácido docosaenoico DHA é o papel da aspirina na biossíntese dessas moléculas. A aspirina, o primeiro medicamento produzido quimicamente, foi sintetizado na década de 1850 e continua sendo amplamente utilizado por suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. (Makriyannis & Nikas , 2011).

2.4 Indução Da Artrite

Modelo experimental em animais é muito utilizado no estudo da artrite reumatoide e suas características patológicas, tais como edema de extremidades, hiperplasia sinovial, proliferação de tecido sinovial, destruição da cartilagem e inflamação excessiva. Existem vários métodos disponíveis para induzir artrite. Portanto, provavelmente há muito a ser aprendido com modelos com modelos espontâneos de indução em roedores (Brand, 2005).

Os modelos de indução animal podem ser classificados de acordo com antígeno usado: Indução com antígenos como albumina (Maffia et al., 2004), suspensão de auto antígenos como colágeno tipo II (Trentham et al., 1997), proteoglicanos (PGIA) da cartilagem humana (Glant, & Olah, 1980), produtos de antígenos bacterianos como parede celular peptidoglicano de *Streptococcus*, e preparações de *Mycobacterium* em adjuvante completo de Freund (CFA) (Brand, 2005), Induções mais focadas dependem da administração de anticorpos específicos para proteínas da cartilagem, como o tipo II colágeno (Terato et al., 1992).

A artrite induzida por colágeno (CIA) é utilizado Colágeno tipo II intradérmico (cauda) em rato e camundongos associado ao adjuvante completo de Freund CFA, o curso da doença no modelo animal varia com o tipo de roedor. Os primeiros sinais de inflamação nas patas podem aparecer logo no dia 9 após a imunização (Brand, 2005)

Estudos prévios usaram a associação de CFA e colágeno tipo II (injeção na cauda) (Park et al., 2012; Olson et al., 2013; Liu et al., 2015; Morin et al., 2015). A artrite reumatoide induzida com colágeno CII em ratos tem muitas semelhanças com a artrite humana, sendo que as fêmeas são mais suscetíveis. O início da artrite é rápido, geralmente entre 10 a 13 dias após a imunização, atingindo o pico após 20 dias e depois declinando gradualmente dependendo do antígeno usado (Hegen et al., 2008).

Já os modelos em animais com indução inflamatória sistêmica da articulação temporomandibular são poucos. Estudos utilizando artrite induzida por proteoglicanos (PGIA) não mostram os sintomas típicos que envolvem os transtornos inflamatórios na ATM (Ghassemi et al., 2016; Afzali et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo específico deste estudo foi comparar o efeito do ômega-3 associado ou não à ácido acetilsalicílico AAS na ATM de ratos submetidos à injeção de CFA+ colágeno tipo II CII na cauda. Em ambos os grupos, foram avaliadas através de Imunoensaio de Elisa as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e, além da anti-inflamatória IL-10 nos tecidos adjacentes da ATM. Além disso, foram verificados os principais aspectos morfológicos e histoquímicos nos mesmos tecidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado junto ao Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia/UNICAMP protocolo n o 4182-1/4182-1(B)/2018.

4.1 Fármacos

Foi utilizado cloridrato de quetamina (Dopalen injetável, laboratórios Vetbrands), cloridrato de xilasina (Anasedan injetável, laboratórios Vetbrands), além de solução salina estéril (NaCl a 0,89%), CFA (suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* a 4mg/ml, Sigma®, 1:1 em solução salina), ácido acetilsalicílico (100 mg, Aspirina® Prevent Bayer), colágeno bovino tipo II (CII – 2 mg/ml dissolvido em ácido acético 0.05 M) e OmegaPure 90%®, EPA 235mg + DHA 165mg, Biobalance Nutraceuticals, Porto Feliz - São Paulo, Brazil)

4.2 Animais

Foram utilizados 32 ratos, adultos (heterogênicos HanUnib: WH Wistar, SPF****)1 com 10 a 12 semanas de vida, com peso entre 350 a 400g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em regime de água e alimentação ad libitum, à temperatura média de 23°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, sendo foto período de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7 às 19 horas.

4.3 Grupos experimentais

Para induzir artrite nos animais, os procedimentos foram modificados daqueles descritos previamente por Liu *et al.*, (2015) e Araújo *et al.*, (2015). Foram utilizados 24 animais distribuídos nos seguintes grupos (n=8):

Grupo 1– Injeção de 100 µL de NaCl 0,89% na base da cauda +1 mL de NaCl 0,9% intragástrica dose única durante 7dias;

Grupo 2 – Injeção de 100 µl de CFA + CII na base da cauda;

Grupo 3 – Injeção de 100 µl de CFA + CII na base da cauda + administração intragástrica única, diária, de 300 mg/kg de ω -3, durante 7 dias;

Grupo 4 – Injeção de 100 µl de CFA + CII na base da cauda + administração intragástrica única, diária, de 300 mg/kg de ω -3 + AAS 20 mg/kg/dia i.p., durante 7 dias;

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

4.3.1 Injeções de CFA+ Colágeno Bovino tipo II CII na base da cauda de ratos

O colágeno bovino tipo II foi dissolvido em ácido acético 0,05 M para 2,0 mg/ml e completamente emulsificado com o CFA+ solução salina (1:1) na proporção de (1:1). Para imunizar os animais, essa suspensão foi injetada intradermicamente na base da cauda dos animais (Figura 1).



Figura 1- Indução sistêmica de artrite na cauda c/CFA

Após 15 dias da indução, os animais do Grupo-1 foram submetidos à administração única, diária, de 1 ml de NaCl 0,9% por via intragástrica, durante 7 dias, visando sua utilização como controle dos Grupos- 2 e 3. No Grupo-2, houve a administração intragástrica única, diária, de 300 mg/kg de ω -3, durante 7 dias. A dose de 300 mg/kg de ω -3 foi escolhida de acordo com a proposta de Diretrizes do Health Canada para obter uma dose equivalente à humana de ω -3 de 3,0g/dia (Park et al.,2013; Morin et al., 2015).

Já no Grupo-3, houve a injeção de 100 µL de CFA + CII na base da cauda + administração intragástrica única, diária, de 300 mg/kg de ω -3 + AAS 20 mg/kg/dia i.p., durante

7 dias. A aspirina em baixas doses pode causar o aparecimento de mediadores lipídicos, como as lipoxinas e resolvinas. A dose escolhida foi baseada em Abd-Elghafour et al., (2017).

4.3.2 Obtenção dos tecidos

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

4.3.3 Processamento histológico

Após a descalcificação as ATM sofreram o processo de desidratação em álcool I 70%, 95% e 100%, diafanizada em xilol, embebida/incluída em parafina. Nove cortes seriados coronais de 6 µm de espessura foram realizado para cada animal em micrótomo manual (LEICA, RM 2145), e corados por Hematoxilina-Eosina (HE) para análise geral da ATM, azul de toluidina para visualização dos PGs proteoglicanos, e vermelho picrossirius-hematoxilina (polarização) fibras colágenas.

Morfometria

A região mais superior do côndilo foi selecionada para as medições. Para verificar a espessura total e de cada camada da cartilagem condilar (fibrosa, proliferativa, maturada e hipertrófica), realizou-se três medidas em diferentes regiões e os resultados expressos em milímetros (Fig.2), mensurados através do Image-Pro Software Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA). As imagens foram gravadas com uma câmera fotográfica (CoolSNAP-Pro Color - Roper Scientific Photometrics) adaptada ao microscópio, utilizando objetivas de 10× e 20×.

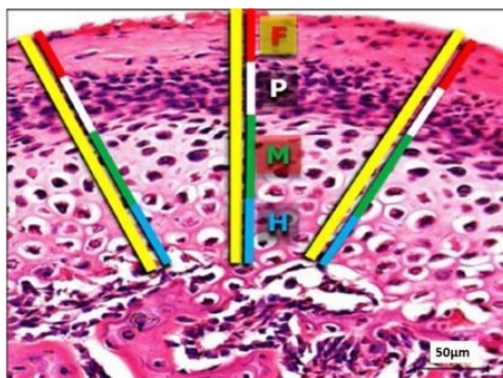


Figura 2 - Corte coronal da ATM mostrando a região condilar – camadas (F = fibrosa; P = proliferativa; M = madura; e H = hipertrófica) da cartilagem articular medida em três diferentes regiões (coloração hematoxilina e eosina, ampliação $\times 20$).
Fonte: Figueroba *et al.*, 2014a.

4.3.4 Imunoensaio

A outra ATM submetida à maceração e centrifugação em tampão de extração celular (tampão tris- HCL 50 mM pH, 7,5). O sobrenadante submetido ao Imunoensaio ELISA de captura (Pepro Tech, Inc., Rocky Hill, MJ, EUA) níveis de citocinas pró inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti- inflamatório IL-10 foram avaliados.

Foram utilizadas placas de 96 poços, sendo adicionado 100 μ L/poço com anticorpo de captura para cada citocina em temperatura ambiente durante a noite. Lavada em solução de Tween 20 a 0,05% em PBS (tampão fosfato em salina, Sigma), foi adicionado 300 μ L de tampão de bloqueio 1% BSA (albumina sérica bovina, Sigma) em PBS por poços em temperatura ambiente por 1 hora bloqueio de sítios de ligação inespecífico.

Em seguida, as placas foram lavadas, e acrescentado 100 μ L das amostras e da solução padrão diluída em sete concentrações, incubada em temperatura ambiente por 2 horas. Após este período foram lavadas como descritos anteriormente e adicionado 100 μ L dos anticorpos de detecção em cada poço, incubada em temperatura ambiente por mais 2 horas. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, acrescentando 100 μ L da solução de avidina-peroxidase (conjugada) enzima em cada poço.

Após 30 minutos, novamente lavadas, foi adicionado 100 μ L de solução para substrato- ABTS (solução de 2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico, Sigma). Mantida em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor, em seguida, a reação colorimétrica foi lida em espectrofômetro por densidade óptica a 405nm com correção de comprimento de onda definido para 650nm.

4.4 Análises dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de D'Agostino e Pearson para verificar a sua normalidade e ao teste de Bartlett para observar a homocedasticidade. Caso apresentem normalidade e homocedasticidade, os dados foram submetidos a análises paramétricas, caso contrário a análises não paramétricas, como os testes de Kruskal-Wallis e de Dunn (post-hoc). Todas as análises foram realizadas considerando 5% de nível de significância, utilizando o software GraphPad Prism 7.05.

5 RESULTADOS

5.1 Espessura da camada de cartilagem

A Figura 3 abaixo mostra o efeito dos tratamentos na espessura total das camadas da ATM dos animais.

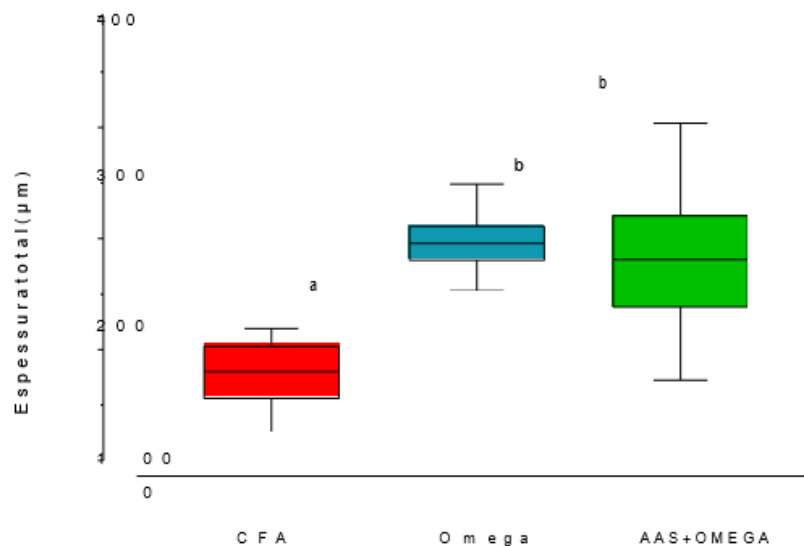


Figura-3 - Efeito dos tratamentos sobre a espessura total da ATM dos animais. Linha central=mediana, caixa=1º e 3º quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

A figura acima revela que ambos os tratamentos aumentaram ($p > 0.0001$) a espessura total da ATM em relação ao controle com CFA. Não houve efeito adicional do AAS ($p = 0.0698$) no efeito do ômega.

A Figura 4 mostra o efeito na espessura de cada camada da ATM induzido pelos tratamentos. De uma forma geral, as camadas tiveram sua espessura aumentada pelos tratamentos, com exceção da camada hipertrófica que não sofreu efeito da combinação de AAS com ômega. Também não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos nas demais camadas.

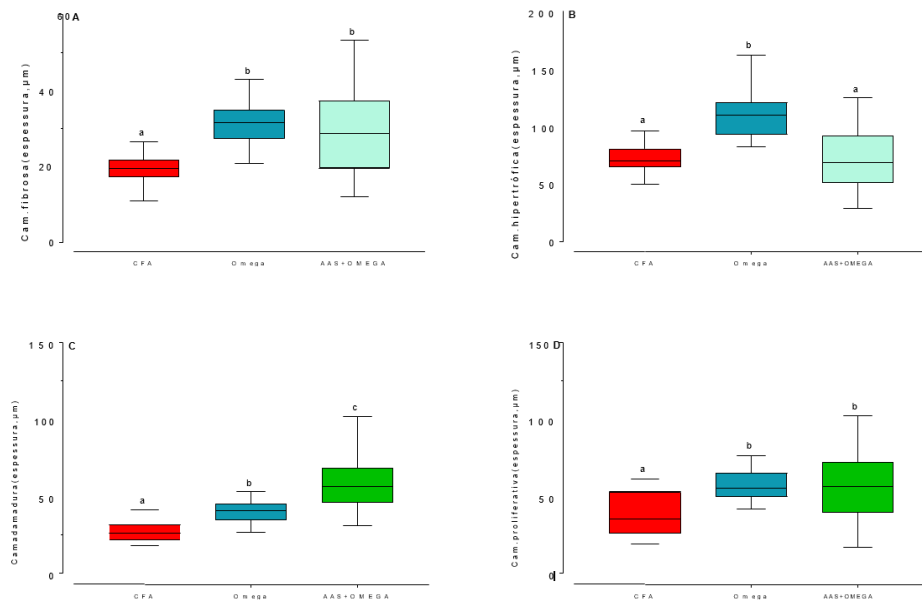


Figura-4. Efeito dos tratamentos sobre a espessura de cada camada da ATM. Linha central=mediana, caixa=1º e 3º quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

O tratamento com ômega-3, adicionado ou não de AAS, mostrou um aumento na camada fibrosa em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). A camada hipertrófica nos animais tratados com ômega-3 estava aumentada em comparação com os demais grupos ($p < 0,0001$), mas não houve diferença significativa entre os animais dos grupos controle e AAS+ ômega ($p = 0,99$). A camada madura mostrou um aumento em sua espessura quando tratada com ômega-3 ($p = 0,0008$) ou com a sua associação com AAS ($p < 0,0001$) quando comparada ao grupo ômega. Na camada proliferativa, os tratamentos com ômega e sua associação com AAS também promoveram aumento de espessura ($p < 0,0001$) em relação ao controle.

O aspecto morfológico dos tecidos das camadas (fibrosa, proliferativa, madura e hipertrófica) da cartilagem ATM dos animais submetidos aos tratamentos é mostrado na Figura 5 abaixo.

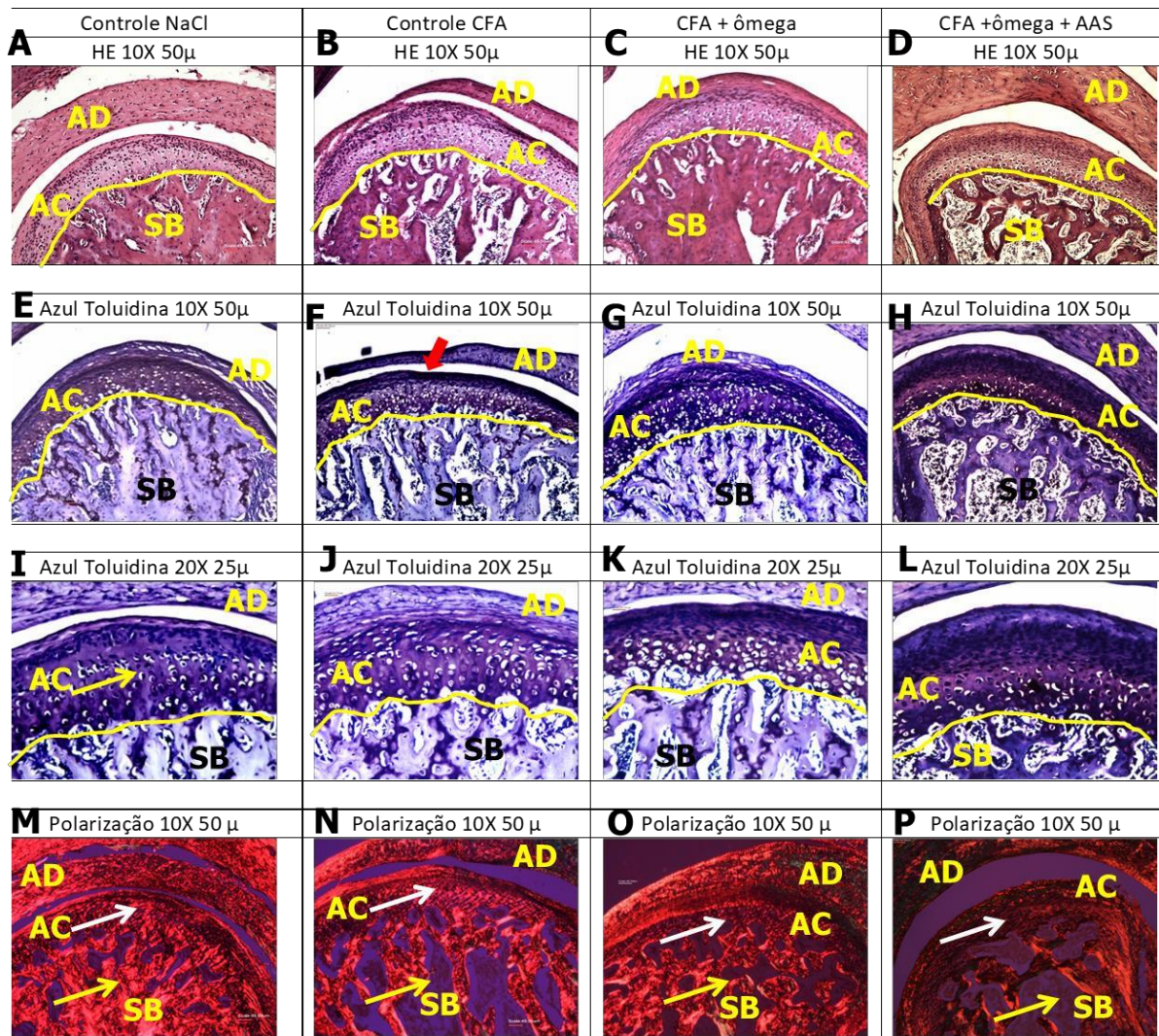


Figura-5 - Aspecto morfológico nas diferentes colorações da ATM; coloração HematoxilinaEosina (HE) A - D: 10 X amplificação, escala Bar de 50µm. Azul de toluidina E - H: 10 X amplificação, escala Bar de 50µm e I - L: 20 X amplificação, escala Bar de 25µm. Vermelho picrossirius-hematoxilina (polarização) M - P: 10 X amplificação, escala Bar de 50µm. As regiões do côndilo são as seguintes: AD, disco articular; AC, cartilagem articular; SB, osso subcondral. As linhas amarelas tracejadas dividem a cartilagem e o osso subcondral. A seta amarela (M - P) colágeno no osso subcondral e seta branca (M - P) colágeno na cartilagem condilar. A seta vermelha (imagem F) indica mudanças morfológicas na camada fibrosa. A seta amarela em (I -L) mostras os condrócitos e a densidade de proteoglicanos.

Somente nos animais com artrite sistêmica (grupo controle) foi observado desarranjo celular, condrócitos amorfos achatados e uma diminuição da densidade de proteoglicanos (diminuição da intensidade do tom azul), como mostra a Fig. 5J. Os animais tratados com ômega 3 mostraram uma reorganização celular e restabelecimento da normalidade da morfologia celular. Nesses também foi observado um aumento da densidade de proteoglicanos (aumento da intensidade do tom azul), comparável ao controle negativo (Fig. 5K). No grupo AAS + ômega-3 observamos um aumento da densidade de proteoglicanos maior

que os demais grupos (Fig. 5L). A forma organizacional das fibras colágenas é observada na coloração vermelho picrossirius-hematoxilina (Figuras 5M, 5N, 5O e 5P). Os animais com artrite sistêmica (Fig. 5N) mostram degradação, com diminuição na quantidade fibras colágenas na cartilagem condilar (seta branca) e osso subcondral (seta amarela). Nos animais tratados com ômega-3 e AAS+ômega-3 (Fig. 5O e 5P), se nota melhora na quantidade e na organização das fibras colágenas, sendo observado um maior efeito nos animais tratados com ômega-3 somente (Fig.5O).

Níveis de citocinas

A Figura 6 mostra concentração das citocinas nas ATM dos animais de acordo com os grupos em estudo. Foi possível observar que não houve efeito adicional ($p>0.05$) do AAS no efeito observado com o ômega em nenhuma das citocinas. Tanto o ômega sozinho quanto associado ao AAS diminuíram significativamente as concentrações das citocinas IL-1 β e TNF- α , além de aumentarem a concentração da IL-10.

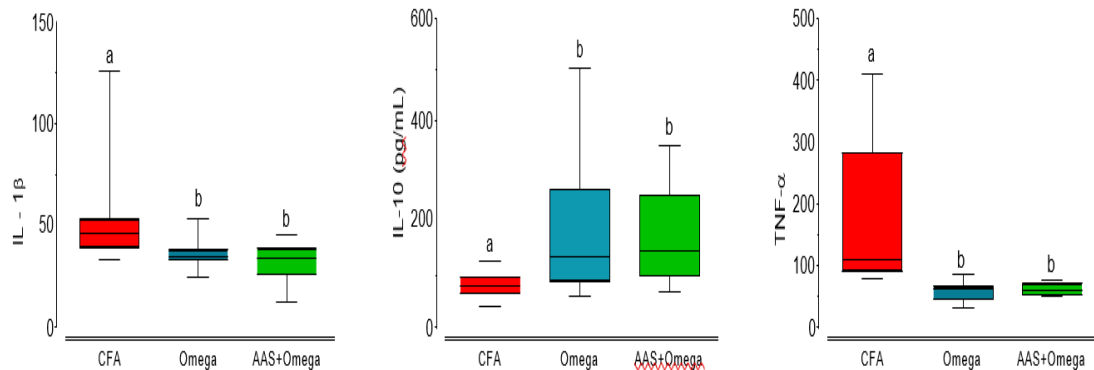


Figura-6 - Efeito dos tratamentos sobre a concentração de citocinas nas ATM dos animais. Linha central=mediana, caixa=1º e 3º quartis, suíças=valores máximo e mínimo. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

Modelo experimental em animais é muito utilizado no estudo da artrite reumatoide e suas características patológicas, tais como edema de extremidades, hiperplasia sinovial, proliferação de tecido sinovial, destruição da cartilagem e inflamação excessiva. Existem vários métodos disponíveis para induzir artrite e outros estudos prévios usaram a associação de adjuvante completo de Freund (CFA) e colágeno bovino tipo II CII (injeção na cauda) (Park et al., 2012; Olson et al., 2013; Liu et al., 2015; Morin et al., 2015), similar ao método utilizado no nosso estudo. Já os modelos em animais com indução inflamatória sistêmica da articulação temporomandibular são poucos. Estudos utilizando artrite induzida por proteoglicanos (PGIA) não mostram os sintomas típicos que envolvem os transtornos inflamatórios na ATM (Ghassemi et al., 2016; Afzali et al., 2010).

O nosso estudo é o primeiro a avaliar o efeito sistêmico da associação de adjuvante completo de Freund (CFA) e colágeno bovino tipo II CII na ATM, além da atividade preventiva dos ácidos graxos tipo ômega ω -3 e do AAS. A osteoartrite da articulação temporomandibular é uma doença crônica e multifatorial caracterizada como sinovite, envolvendo a degradação progressiva da cartilagem, a remodelação óssea subcondral e a dor crônica (Wang et al., 2012a; Wang et al., 2015). No presente estudo, a ATM foi afetada pela indução sistêmica (CFA+CII), o que pode ser mostrado pela diminuição da espessura da cartilagem articular especialmente nas suas camadas (fibrosa, proliferativa e madura), além do desarranjo e degradação das fibras colágenas principalmente no trabeculado ósseo, o qual é constituído por colágeno tipo I (Fig. 5N) e da diminuição na quantidade de proteoglicanos.

Na figura 5F, a camada fibrosa mostrou uma grande deformidade em sua morfologia, com redução dos proteoglicanos incorporados à rede da matriz de colágeno. Isso leva a uma redução da resistência à compressão e tensão, com alta predisposição a deformidade (Lu et al., 2009). Além disso, a diminuição das células fibrocartilaginosas nessa camada fibrosa pode comprometer a capacidade para o auto-reparo do sistema (Tanaka et al., 2005). Em estudo prévio, a indução inflamatória provocada em modelo PGIA, mostrou menor evidências de comprometimento estrutural e menor degradação da cartilagem articular na ATM de ratos (Ghassemi et al., 2016). A indução sistêmica da reumatite com colágeno bovino tipo II em camundongos é conhecida por promover mais inflamação sinovial, erosão óssea, dano cartilagem e infiltração de leucócitos em articulações do joelho e as patas traseiras (Oh et al., 2017).

A estrutura da cartilagem condilar da ATM é macroscopicamente semelhante a cartilagem articular de outras articulações sinoviais. As alterações patológicas observadas na artrite da TMJ se assemelham aquelas observadas na artrite de joelho e quadril (de Bont et al. 1993). No tratamento das inflamações articulares, várias abordagens são utilizadas na tentativa de prevenir e desacelerar a progressão da doença. A nutrição adequada, o controle de peso corporal, exercícios físicos, fisioterapia, anti-inflamatórios e analgésicos (Roush et al., 2010) têm sido indicados.

Além disso, a administração prolongada de altas doses de corticosteroides quando utilizada está ligada a efeitos adversos graves, incluindo osteoporose, fraturas, úlcera péptica, infecções e doenças cardiovasculares, entre outros (Lin et al., 2014). Outros estudos já demonstraram que ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa, como o ômega-3 (LC-n3), têm propriedades anti-inflamatórias, sugerindo que podem ser benéficos como terapias em distúrbios causados por artrite reumatoide (James et al., 2010).

Mediadores lipídicos endógenos de ação anti-inflamatória, gerados a partir de ácidos graxos como o ômega-3 e seus precursores DHA e EPA, além de resolvinas, agem na inflamação aguda minimizando danos nos tecidos articulares (Keinan et al., 2013). O ácido acetilsalicílico (AAS) tem uma ação anti-inflamatória, analgésica, antipirética e antiagregante. Sua ação não se limita ao bloqueio pró-inflamatórios dos eicosanoides e a modificação da ciclooxigenase (COX-2) pela aspirina leva à geração de mediadores especializados em lipídios de pro-resolução que são produzidos apenas nos estágios tardios da inflamação (Chee et al., 2016). A COX-2 acetilada pela aspirina gera o ácido docosaexaenoico (17R-hidroxi-DHA), o qual na oxigenação subsequente por 5-lipo-oxigenase (LOX) resulta na produção de 17-epi-RvD1, também conhecido como resolvina D1 desencadeado por aspirina (AT-RvD1) (Lima-Garcia et al., 2011). Não encontramos na literatura estudos associando ômega-3 com a articulação temporomandibular, embora alguns estudos relatam o seu uso no tratamento e prevenção de outras doenças inflamatórias articulares (Knott et al., 2011; Gheita et al., 2012; Olson et al., 2013).

Em nosso estudo, nos animais que receberam tratamento com ômega-3, a espessura da cartilagem articular estava aumentada em relação aos animais controle. Estudos recentes em animais relataram que o ômega-3 alivia o dano e inibe a degradação da matriz da cartilagem articular do joelho (Sakata et al., 2015; Yu et al., 2015). Além disso, pode proteger a cartilagem articular durante o desenvolvimento da osteoartrite (Zainal et al., 2008; Gruenwald et al., 2009). De fato, no presente estudo os animais tratados com ômega-3 mostraram um aumento na síntese

de proteoglicanos, proliferação de condrócitos, espessamento e reorientação das fibras colágenas. Alguns estudos relatam que a o ômega-3 EPA (ácido eicosapentaenoico) é capaz de inibir o estresse oxidativo induzido por apoptose e perda de matriz celular (Sakata et al., 2015), associada a uma maior síntese de colágeno e diminuição de prostaglandina E2 (Hankenson et al., 2000) e, assim, o ômega-3 poderia ser benéfico na terapêutica da osteoartrite (Roush et al., 2010). A associação de AAS + ômega-3 mostrou um aumento da síntese de proteoglicanos observado na figura 5L pelo aumento de densidade de cor. De fato, Manicourt et al. (1994), em um estudo in vitro, sugeriu que a aspirina exerce um efeito favorável sobre o metabolismo geral proteoglicanos e do ácido hialurônico em cartilagem com lesões avançadas de osteoartrite.

A destruição do tecido articular induz a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, no espaço articular (Damilar et al., 2015). Entre as citocinas próinflamatórias, a TNF- α é a principal e regula a formação de outros mediadores inflamatórios no tecido sinovial (Brzustewicz e Bryl, 2015). As interações e desregulações das células imunológicas podem induzir a superprodução de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α , resultando em um desequilíbrio entre pró-inflamatório e atividade de citocinas antiinflamatórias e danos nas articulações (Burmester et al., 2014).

Houve um aumento no nível de interleucina IL-1 β e TNF- α na ATM nos animais com artrite induzida. Outros estudos também mostraram que a injeção intra-articular de CFA na ATM induziria um aumento no nível de IL-1 β no tecido do disco da ATM (Kerins et al., 2005; Wang et al., 2012b). A indução sistêmica inflamatória com CFA+CII em outras articulações também mostrou um aumento da IL-1 β (Olson et al., 2013), TNF- α (Liu et al., 2015; Ma et al., 2017) e de ambas citocinas IL-1 β e TNF- α (Morin et al., 2015; Xu et al., 2017). No presente estudo, a IL-10 mostrou que após a indução sistêmica de artrite houve uma redução nos níveis dessa interleucina. Um estudo realizado em animais, o qual injetou albumina sérica bovina metilada (mBSA) e CFA diretamente na ATM, mostrou resultado semelhante, ocorrendo diminuição no nível de IL-10 (Silva Quinteiro et al., 2014). A indução da artrite sistêmica de artrite com o modelo usado no presente estudo, mostrou um nível baixo de IL-10 na articulação do joelho.

Outros estudos mostraram que a IL-10 pode desempenhar um papel importante na promoção da restauração da tolerância em doenças autoimunes, incluindo a artrite reumatoide induzida (Carter et al., 2011; Quinteiro et al., 2014). Já se sabe que os ácidos eicosapentaenoico ω -3 (EPA) e docosaexaenoico (DHA), proveniente de óleos de peixe, podem reduzir a dor e inflamação em artrite reumatoide. O ácido ω -3, pelo mecanismo de competitividade, inibe a

produção de PGE2 e LTB4, a ativação do NFkB e a liberação de citocinas inflamatórias tais como IL-1 β e TNF- α (Morin et al., 2015). De fato, em nosso estudo, o ácido ω -3 diminuiu o nível das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e TNF α . Um estudo semelhante, usando a indução sistêmica com CFA+CII mostrou diminuição no nível das citocinas IL-1 β e TNF- α nas articulações das patas traseiras e do tornozelo de ratos (Morin et al., 2015). Estudos em cultura celular também mostraram que tanto o EPA como o DHA podem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 em vários tipos de células (Miles e Calder, 2012).

O efeito analgésico e anti-inflamatório do ω -3 pode estar associado aos mediadores de lipídeos endógenos, tais como as lipoxinas e resolvinas, as quais são proteínas derivada do ômega-3 (Sommer e Birklein, 2010). Atualmente, a pedra angular da terapia da artrite reumatoide inclui produtos biológicos como anticorpos para TNF- α , IL-1 β e IL-6. (Taylor e Feldmann, 2009). Assim, nossos resultados são promissores e merecem estudo mais aprofundado visando o uso do ômega-3 no tratamento de DTM e da ATM em pacientes com artrite.

7 CONCLUSÃO

O ácido graxo ômega-3 mostrou atividade anti-inflamatória na ATM de ratos com inflamação induzida. A sua associação ao ácido acetilsalicílico não mostrou efeito adicional.

REFERENCIAS

1. Abd-Elghafour BA, El-Sayed NM, Ahmed AA, Zaitone SA, Moustafa YM. Aspirin and (or) omega-3 polyunsaturated fatty acids protect against corticohippocampal neurodegeneration and downregulate lipoxin A4 production and formyl peptide receptor-like 1 expression in pentylenetetrazole-kindled rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017 Apr;95(4):340-8.
2. Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2010 Feb;159(2):120-30.
3. Araujo GR, Vaz ER, Fujimura PT, Fonseca JE, de Lima LM, Canhão H, et al. Improved serological detection of rheumatoid arthritis: highly antigenic mimotope of carbonic anhydrase III selected in a murine model by phage display. *Arthritis Res Ther* 2015;17:168.
4. Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis—Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine*. 2015 Dec;76(2):527-536.
5. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*. 2013 Mar;75(3):645-62.
6. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5569-79.
7. Chee B, Park B, Fitzsimmons T, Coates AM, Bartold PM. Omega-3 fatty acids as an adjunct for periodontal therapy—a review. *Clin Oral Invest* 2016;20:879-94.
8. Damlar I, Esen E, Tatli U. Effects of glucosamine–chondroitin combination on synovial fluid IL-1b, IL-6, TNF-a and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 May 1;20(3):e278-83.
9. de Bont LG, van der Kuijl B, Stegenga B, Vencken LM, Boering G. Computed tomography in differential diagnosis of temporomandibular joint disorders. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1993 Aug;22(4):200-9.

10. Figueroba SR, Desjardins MP, Nani BD, Ferreira LE, Rossi AC, Santos FA, Venâncio PC, Aguiar FH, Groppo FC, Effect of diazepam on temporomandibular joints in rats with increased occlusal vertical dimension. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014;52(5):438-44.
11. Ghassemi Nejad S, Kobezda T, Tar I, Szeka-necz Z. Development of temporomandibular joint arthritis: the use of animal models. *Joint Bone Spine* 2016;20:30111–7.
12. Gheita T, Kamel S, Helmy N, El-Laithy N, Monir A. Omega-3 fatty acids in juvenile idiopathic arthritis: effect on cytokines (IL-1 and TNF- α), disease activity and response criteria.
13. Gruenwald J, Petzold E, Busch R, Petzold HP, Graubaum HJ. Effect of glucosamine sulfate with or without omega-3 fatty acids in patients with osteoarthritis. *Adv Ther.* 2009 Sep;26(9):858-71.
14. Hankenson KD, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KG, Turek JJ: Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000 Jan;223(1):88-95.
15. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Nov;67(11):1505-15.
16. Ames M, Proudman S, Cleland L. Fish oil and rheumatoid arthritis: past, present and future. *Proc Nutr Soc.* 2010 Aug;69(3):316-23.
17. Keinan D, Leigh NJ, Nelson JW, De Oleo L, Baker OJ. Understanding resolvin signaling pathways to improve oral health. *Int J Mol Sci* 2013;14:5501–5518.
18. . Kerins CA, Carlson DS, Hinton RJ, Hutchins B, Grogan DM, Marr K, Kramer PR, Spears RD, Bellinger LL. 58.6. Hankenson KD, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KG, Turek JJ: Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000 Jan;223(1):88-95.
19. Knott L, Avery NC, Hollander AP, Tarlton JF. Regulation of osteoarthritis by omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids in a naturally occurring model of disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011 Sep;19(9):1150-7.

20. Lima-Garcia JF, Dutra RC, da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol*. 2011 Sep;164(2):278-93.
21. Lin S, Huang J, Zheng L, Liu Y, Liu G, Li N, Wang K, Zou L, Wu T, Qin L, Cui L, Li G. Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing rats. *Calcif Tissue Int*. 2014 Oct;95(4):362- 73.
22. Liu Q, Zhu XZ, Feng RB, Liu Z, Wang GY, Guan XF, Ou GM, Li YL, Wang Y, Li MM, Ye WC. Crude triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* (Di Wu) exert ant arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats. *Chin Med*. 2015 Jul 25;10:20.
23. Lu XL, Mow VC and Guo XE. Proteoglycans and mechanical behavior of condylar cartilage. *J Dent Res*. 2009 Mar;88(3):244-8.
24. Ma A, Yang Y, Wang Q, Wang Y, Wen J, Zhang Y. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells. *Mol Med Rep*. 2017 Jun;15(6):3615-3622.
25. Manicourt DH, Druetz-Van Egeren A, Haazen L, Nagant de Deuxchaisnes C Effect of tenoxicam and aspirin on the metabolism of proteoglycans and hyaluronan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Br J Pharmacol*. 1994 Dec;113(4):1113-20.
26. Mateen S, Moin S, Shahzad S, Khan AQ. Level of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: Correlation with 25-hydroxy vitamin D and reactive oxygen species. *PLoS One*. 2017 Jun 8;12(6):e0178879.
27. Miles EA, Calder PC. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr*. 2012 Jun;107 Suppl 2:S171-84.
28. Morin C, Blier PU, Fortin S. Eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid monoglycerides are more potent than docosahexaenoic acid monoglyceride to resolve inflammation in a rheumatoid arthritis model *Arthritis Res Ther*. 2015 May 29;17:142. doi: 10.1186/s13075-015-0653-y3615-3622.
29. Oh BR, Suh DH, Bae D, Ha N, Choi YI, Yoo HJ, Park JK, Lee EY, Lee EB, Song YW. effect of a novel histone deacetylase 6 inhibitor, CKD-L, on collagen induced arthritis in vivo and regulatory T cells in rheumatoid arthritis in vitro. *Arthritis Res Ther*. 2017 Jul 3;19(1):154.

30. Olson MV, Liu YC, Dangi B, Paul Zimmer J, Salem N Jr, Nauroth JM. Docosahexaenoic acid reduces inflammation and joint destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Inflamm Res*. 2013 Dec;62(12):1003-13.
31. Park Y, Lee A, Shim SC, Lee JH, Choe JY, Ahn H, Choi CB, Sung YK, Bae SC. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a 16- week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-design multicenter study in Korea. *J Nutr Biochem*. 2013 Jul;24(7):1367-72.
32. Roush JK, Dodd CE, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Schoenherr WD, Richardson DC, Leventhal PS, Hahn KA. Multicenter veterinary practice assessment of the effects of omega3 fatty acids on osteoarthritis in dogs, *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Jan 1;236(1):59-66.
33. Sakata S, Hayashi S, Fujishiro T, Kawakita K, Kanzaki N, Hashimoto S, Iwasa K, Chinzei N, Kihara S, Haneda M, Ueha T, Nishiyama T, Kuroda R, Kurosaka M. Oxidative stress-induced apoptosis and matrix loss of chondrocytes is inhibited by eicosapentaenoic acid. *J Orthop Res*. 2015 Mar;33(3):359-65.
34. Silva Quinteiro M, Henrique Napimoga M, Gomes Macedo C, Furtado Freitas F, Balassini Abdalla H, Bonfante R, Trindade Clemente-Napimoga J15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 5;740:58-65.
35. Sommer C, Birklein F. Fighting off pain with resolvins. *Nat Med*. 2010 May;16(5):518-20.
36. Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, Tanne K. Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. *Histochem Cell Biol*. 2005 Mar;123(3):275-81.
37. Taylor, PC., Feldmann, M., 2009. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 5(10), 578–582.
38. Wang XD, Kou XX, He DQ, Zeng MM, Meng Z, Bi RY, Liu Y, Zhang JN, Gan YH and Zhou YH. Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate. *PLoS One*. 2012a;7(9):e45036.
39. Wang XD, Kou XX, Mao JJ, Gan YH, Zhou YH. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. *J Dent Res*. 2012b May;91(5):499-505.

40. Wang XD, Zhang JN, Gan YH and Zhou YH. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis. *J Dent Res*. 2015 May;94(5):666-73.
41. Yu H, Li Y, Ma L, Meng H, Bai X, Fan Z, Yu F, Guo A. A low ratio of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids suppresses matrix metalloproteinase 13 expression and reduces adjuvant-induced arthritis in rats. *Nutr Res*. 2015 Dec;35(12):1113-21.
42. Zainal Z, Longman AJ, Hurst S, Duggan K, Caterson B, Hughes CE, Harwood JL. Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Jul;17(7):896-905.
43. Zhang X, Feng H, Du J, Sun J, Li D, Hasegawa T, Amizuka N, Li M. Aspirin promotes apoptosis and inhibits proliferation by blocking G0/G1 into S phase in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via downregulation of JAK/STAT3 and NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2018 Dec;42(6):3135-3148.
44. Morris T, Stables M, Hobbs A, de Souza P, Colville-Nash P, Warner T, Newson J, Bellingan G, Gilroy DW. *J Immunol*. 2009; 183:2089–2096.
45. Makriyannis A, Nikas SP. Aspirin-Triggered Metabolites of EFAs. *Chem Biol*. 2011 Oct 28;18(10):1208-9.
46. Maffia, P., J. M. Brewer, J. A. Gracie, A. Ianaro, B. P. Leung, P. J. Mitchell, K. M. Smith, I. B. McInnes, and P. Garside. 2004. Inducing experimental arthritis and breaking self-tolerance to joint-specific antigens with trackable, ovalbumin-specific T cells. *J. Immunol*. 173:151-156.
47. Trentham, D. E., A. S. Townes, and A. H. Kang. 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med*. 146:857-868.
48. Glant, T. and I. Olah. 1980. Experimental arthritis produced by proteoglycan antigens in rabbits. *Scand. J. Rheumatol*. **9**:271-279.

49. Brand DD. Rodent Models of Rheumatoid Arthritis. *Comp Med*. 2005 Apr;55(2):114-22. Review.
50. Terato, K., K. A. Hasty, R. A. Reife, M. A. Cremer, A. H. Kang, and J. M. Stuart. 1992. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J. Immunol*. 148:2103-2108.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

tcc			
ORIGINALITY REPORT			
14%	14%	3%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	repositorio.unicamp.br Internet Source	10%	
2	repositorio.ufes.br Internet Source	<1%	
3	lume.ufrgs.br Internet Source	<1%	
4	ptdocz.com Internet Source	<1%	
5	bibliotecatede.uninove.br Internet Source	<1%	
6	repositorio.unesp.br Internet Source	<1%	
7	repositorio.ufpe.br Internet Source	<1%	
8	revistas.bvs-vet.org.br Internet Source	<1%	
9	repositorio.ufrn.br Internet Source	<1%	
10	X.D. Wang, X.X. Kou, J.J. Mao, Y.H. Gan, Y.H. Zhou. "Sustained Inflammation Induces Degeneration of the Temporomandibular Joint", Journal of Dental Research, 2012 Publication	<1%	
11	repositorio.ufsm.br Internet Source	<1%	
12	bv.fapesp.br Internet Source	<1%	
13	revista-fi.com.br Internet Source	<1%	
14	www.teses.usp.br Internet Source	<1%	
15	informativodenutricao.blogspot.com Internet Source	<1%	
16	www.treinototal.com.br Internet Source	<1%	

17 bdtd.biblioteca.ufpb.br <1%
Internet Source

18 cochranelibrary-wiley.com <1%
Internet Source

19 Gun-Woo Oh, Won-Kyo Jung. "Biomedical Materials for Regenerating Bone Tissue Utilizing Marine Invertebrate", Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2015 <1%

Publication

20 paulofitpro.blogspot.com <1%
Internet Source

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off

Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



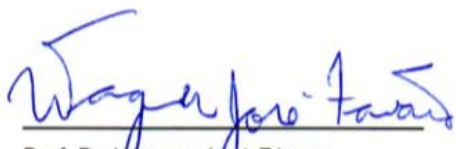
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Efeito da associação do ácido acetilsalicílico ou dexametasona com ômega 3 no processo inflamatório induzido por CFA na articulação temporomandibular (ATM) de ratos: estudo piloto, registrada com o nº 4182-1(B)/2018, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Sidney Figueiroba Raimundo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 04 de junho de 2018.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2018-01/07/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/07/2018-01/07/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	03 meses / 300g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

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

Campinas, 04 de junho de 2018.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

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

Anexo 3 – Iniciação Científica



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2017/17472-3
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Encerrado
Vigência	01/03/2018 a 28/02/2019
Beneficiário	Beatriz Hidalgo Ceotto
Responsável	Francisco Carlos Groppo
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em :	25/04/2019
---------------------	------------

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	11/03/2019	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP. A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem. Para visualizar o parecer, por favor, acesse o Sistema SAGe (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos. Atenciosamente, Carlos Henrique de Brito Cruz Diretor Científico da FAPESP

Frases para Termo de Outorga
<i>Não há frases associadas.</i>

Relatório Científico 2 (Aprovado)

Compromisso	10/03/2019
Período Relacionado	10/08/2018 a 28/02/2019
Situação	Atendido