



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**Monografia de Final de Curso**

**Aluno(a): Marina Passarella Desjardins**

**Orientador (a): Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Francisco Carlos Groppo**

**Ano de Conclusão do Curso: 2008**



TCC 444

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
BIBLIOTECA

**Assinatura do(a) Orientador(a)**



**Universidade Estadual De Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



**Marina Passarella Desjardins**

**INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM SOBRE  
PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E  
HISTOQUÍMICOS EM RATOS COM DTM  
INDUZIDA**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião-Dentista.

**Orientador(a): Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Francisco Carlos Groppo**

Piracicaba

2008

Unidade FOP/UNICAMP  
N. Chamada .....  
.....  
Vol. .... Ex. ....  
Tombo BC/ .....

C.T. 786356

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

D461i

Desjardins, Marina Passarella.

Influência do diazepam sobre parâmetros morfológicos e  
histoquímicos em ratos com DTM induzida. / Marina  
Passarella Desjardins. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.  
35f.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Oclusão dentária. I. Groppo, Francisco Carlos. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

## ***Dedico este trabalho***

---

À Deus,

Pela força e coragem durante toda esta caminhada.

À minha mãe,

Que mesmo não estando mais entre nós, foi de fundamental importância para a conclusão deste trabalho.

Ao meu pai Maurício e minha irmã Mariana,

Pelo amor, incentivo e apoio absoluto em mais uma etapa de minha vida.

Ao meu namorado Patrick,

Pela paciência, compreensão, ajuda e carinho

## ***Agradecimentos***

---

Agradeço primeiramente a Deus;

Aos meus pais, Maurício e Maria Edy (em memória) e a minha irmã Mariana, pelo incentivo, esforço e ajuda na realização deste trabalho, pois sem eles jamais chegaria onde cheguei;

Ao meu namorado Patrick, pela colaboração, paciência, carinho e ajuda prestada durante o desenvolvimento do meu trabalho;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela oportunidade da realização deste trabalho;

À PIBIC, pelo apoio financeiro concedido, o qual foi de extrema importância;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Francisco Carlos Groppo, pela orientação, ensinamento e compreensão durante a minha formação;

Ao meu co-orientador Dr<sup>o</sup>. Sidney Figueroba Raimundo, pelo ensinamento, orientação e colaboração;

Às minhas grandes amigas, confidentes e companheiras de muitas risadas e tristezas, Amanda de Carvalho Ayub Furlan e Thaíza Thiemi Da Luz Diez Vecino kono, pela amizade verdadeira conquistada e lapidada durante esses quatro anos;

À minha amiga Ana Carolina Borges de Freitas, pela ajuda, paciência, colaboração e pela grande parceria formada durante estes quatro anos;

Aos meus muitos amigos que sempre me ajudaram e me ouviram quando precisei de um ombro amigo, que jamais serão esquecidos e pelos quais tenho um enorme carinho;

Aos meus colegas de curso da turma 49 que estudaram e conviveram comigo;

À todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente, contribuindo para a realização deste trabalho.

## **SUMÁRIO**

---

	<b>Pg</b>
<b>Lista de ilustrações.....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas.....</b>	<b>8</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>9</b>
<b>Introdução e Justificativa.....</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>17</b>
• <b>Tratamentos.....</b>	<b>19</b>
• <b>Processamento do material para microscopia de luz.....</b>	<b>20</b>
• <b>Morfometria.....</b>	<b>20</b>
• <b>Imunoensaio.....</b>	<b>22</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>30</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>32</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>33</b>

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

---

	<b>Pg.</b>
<b>Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais propostos.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 1 - a- oclusão cêntrica, b- ratos com dispositivo oclusal c- movimento de abertura.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2 - Demarcação (em verde) e medição do disco articular e processamento no software Image Pro-plus.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3 - Imunoensaio ELISA realizado em uma das amostras.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 1 - Pesos inicial e final dos animais após os tratamentos realizados.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4 - Aspecto histológico (HE) das ATM do grupo A (controle), B (resina) e C (bandagem) considerando o tratamento com NaCl a 0,9% (1) e diazepam (2). Assim, o C1, por exemplo, representa o grupo bandagem tratado com soro fisiológico.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 5 - Aspecto histológico (Alcian-Blue) das ATM do grupo A (controle), B (resina) e C (bandagem) considerando o tratamento com NaCl a 0,9% (1) e diazepam (2).....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 6 - Área dos discos articulares segundo o grupo de estudo. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significantes (<math>p &lt; 0,05</math>).....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 7 - Curvas de calibração obtidas com o imunoensaio.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 8 - Concentração das interleucinas obtidos pelo imunoensaio.....</b>	<b>29</b>

## **LISTAS DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

---

- **A.T.M.** = Articulação têmporomandibular
- **D.T.M.** = Disfunção têmporomandibular
- **et al** = e outros (abrevatura de "et lii")

## **RESUMO**

---

As desordens da articulação temporomandibular (DTM) estão associadas com o processo inflamatório/dor, incluindo os componentes biológico e comportamental. Embora as DTM sejam de etiologia multifatorial, o papel da oclusão tem ocupado um lugar de destaque e neste ponto existe muita polêmica a respeito das alterações oclusais que podem estar significativamente envolvidas nessa etiologia.

Existem cinco condições que aumentariam o risco de DTM: mordida aberta anterior, sobrepasso horizontal superior a 6mm, discrepância entre relação e oclusão cêntricas, mordida cruzada unilateral e perda de dentes posteriores. As medidas farmacológicas para o tratamento das disfunções temporomandibulares incluem analgésicos, antiinflamatórios e agentes opióides, sendo que antidepressivos e neurolépticos também podem ser empregados.

Os objetivos dessa pesquisa serão avaliar os aspectos morfológicos e histoquímicos da ação de um benzodiazepínico (Diazepam, 5mg/kg) em animais com alteração oclusal. Serão utilizados 30 ratos distribuídos em 3 grupos: Grupo 1 - sem mau-oclusão (controle); Grupo 2 -- com mau-oclusão induzida através do deslocamento retrusivo da cabeça da mandíbula por um dispositivo confeccionado com bandas ortodônticas fixados com resina fotopolimerizável nos incisivos superiores; Grupo 3 - com mau-oclusão induzida através do aumento bilateral da dimensão vertical com a fixação de um fio de aço de espessura de 0,9mm com resina fotopolimerizável na região de molares inferiores direitos e esquerdos.

Após 7 dias da indução da mau-oclusão, todos os animais serão submetidos à administração por via intramuscular, durante 7 dias, de diazepam 5mg/kg. Após este período, as ATM de ambos os lados serão retiradas em bloco. Uma das ATM será submetida, após fixação e descalcificação, ao processamento histológico (HE e Alcian Blue). A ATM contralateral será submetida à maceração, centrifugação e o sobrenadante submetido ao imunoensaio (ELISA) para avaliação das citocinas pró-inflamatórias (IL1-b, IL-6 e TNF-a). A leitura será feita por espectrofotometria (comprimento de onda de 450nm com filtro de correção de 570nm).

Os resultados mostram que o diazepam causou redução (ANOVA,  $p < 0,05$ ) da área do disco articular com ou sem a presença da mau-oclusão. Além disso, a mau-oclusão induzida pela resina posicionada na oclusal dos molares induziu significativamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ) mais dano no disco articular do que aquela induzida pela bandagem dos incisivos superiores.

Os resultados do imunoensaio ainda são inconclusivos, pois apenas dois animais foram ensaiados, mas já apontam para concentrações crescentes de interleucinas nos animais submetidos aos tratamentos. Assim, podemos concluir que o diazepam, assim como os modelos de interferências oclusais propostos, interferem negativamente com o disco articular.

## **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

---

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação do tipo sinovial, que se estabelece entre as extremidades ósseas da cabeça da mandíbula, a fossa mandibular e o tubérculo articular do osso temporal. As superfícies articulares da fossa mandibular e da cabeça da mandíbula são revestidas por tecido fibrocartilagenoso (Caltabiano *et al.*, 1990; Bach-Petersen *et al.*, 1994; Katchburian, Arana, 1999).

As superfícies articulares da fossa mandibular e da cabeça da mandíbula são revestidas com tecido conjuntivo denso fibroso e não por cartilagem hialina, como na maioria das outras articulações. Este tecido é geralmente menos susceptível aos efeitos de envelhecimento do que a cartilagem hialina e, dessa forma, menos provável de desgaste com o tempo. A cartilagem fibrosa ou fibrocartilagem é uma forma de transição entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina, uma vez que se constitui de uma combinação de fibras colágenas densas e de células cartilaginosas localizadas em lacunas e rodeadas por quantidades variáveis de matriz hialina (Finn Geneser, 2003).

Em uma ATM saudável, o colágeno do tipo I é encontrado, tanto na cartilagem, quanto no osso subcondral. O colágeno do tipo II está presente apenas na cartilagem, assim como o do tipo VI e IX. Estes tipos de colágenos atuam como moléculas adesivas, agrupando fibrilas de colágeno maiores, e colágeno a glicosaminoglicanos. As fibras de colágeno são responsáveis pela resistência à tensão e os glicosaminoglicanos pela resistência à compressão, como também contribuem para a manutenção da viscoelasticidade do disco articular (Tanaka *et al.*, 2003).

Embora as disfunções temporomandibulares (DTM) sejam de etiologia multifatorial (Storey *et al.*, 1979; Carlsson, 1984), o papel da oclusão tem ocupado um lugar de destaque e neste ponto existe muita polêmica a respeito das alterações oclusais que podem estar significativamente envolvidas nessa etiologia (McNamara *et al.*, 1995). Existe consenso a respeito da combinação de algumas alterações oclusais que tornariam a oclusão um fator de risco em indivíduos biologicamente susceptíveis. Existem cinco condições oclusais que aumentariam o risco de DTM:

mordida aberta anterior, sobrepasso horizontal superior a 6mm, discrepância entre oclusão cêntrica e relação cêntrica (OC/RC), mordida cruzada unilateral e perda de dentes posteriores (Pullinger *et al.*, 1993). Entretanto, deve-se enfatizar que estas condições em conjunto respondem, aproximadamente entre 10 a 20 % pela etiologia das DTM (Droukas *et al.*, 1984; Luz *et al.*, 1995). Mau-oclusão não é sinônimo de dor orofacial ou de DTM dolorosa, mas, se o componente oclusal for um fator contribuinte para a dor por disfunção, é evidente que ele é significativo e não deve ser desprezado (Litvak & Malament, 1993).

Injúrias na articulação temporomandibular podem causar inflamação envolvendo os tecidos da ATM. Interleucinas-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) seria um dos mediadores chave no processo inflamatório e na contribuição da destruição da cartilagem nas doenças inflamatórias articulares (artrite reumatoide). São conhecidos 18 tipos de interleucinas, denominadas interleucina-1 (IL-1) até interleucina-18 (IL-18). Outras citocinas importantes são os interferons (IFN alfa, beta e gama) e os fatores de necrose tumoral (TNF alfa e beta) (Finn Geneser, 2003).

O efeito da indução da mau-oclusão unilateral sobre a fibrocartilagem do disco da articulação temporomandibular de coelhos adultos foram avaliados por um período de um a 28 dias por Shaw & Molyneux (1993) através da colagem de um splint oclusal na região dos dentes posteriores inferiores direito, com espessura de 1mm. Examinaram a região anterior, intermediária e posterior das bandas discais. Os achados sugeriram que o disco da ATM poderia participar de forma compensatória na mudança no nível celular em resposta as mudanças funcionais.

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

Os tecidos articulares apresentam grande quantidade de fibras colágenas, responsáveis pela resistência à tensão, e proteoglicanos, responsáveis pela resistência à compressão. Mao *et al* (1998) checaram a expressão dos proteoglicanos na ATM de ratos em resposta a um aumento unilateral da mordida. O

aumento unilateral foi realizado com resina fotopolimerizável sobre os molares superiores direitos, mantendo por quatro semanas. O aumento na expressão sugeriu que a alteração unilateral da mordida induziria a um aumento nas forças compressivas na ATM dos animais.

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

O efeito da mau-oclusão induzida por um aumento unilateral da dimensão vertical em ratos foi avaliado histologicamente e imunohistologicamente na cartilagem articular da cabeça da mandíbula. Quando a cartilagem condilar de todos os três grupos foram imunohistologicamente examinada com anti-interleucina-1(IL-1), alguns condrócitos na cartilagem articular estavam positivamente corados. Os resultados sugeriram que a mau-oclusão unilateral pode induzir a uma diminuição da cartilagem articular que pode ser o resultado do tamanho reduzido de condrócitos e componentes de matriz extracelular na articulação. Esta mudança pode ter sido causada pela IL-1 que possivelmente foi produzida pelos condrócitos articulares (Yamamoto M. 1994).

A outra origem da dor nas DTM são as desordens intra-capsulares. O deslocamento funcional do disco articular pode causar dor com o movimento e com o aumento da pressão interarticular. São poucas informações a respeito do início e posterior progresso desta patologia, particularmente devido à dificuldade de estudos em seres humanos. A maioria dos trabalhos existente é derivada de estudos feitos em cadáveres (Akerman, Kopp & Rohlin, 1986; Kino, Ohmura & Amagasa, 1993) ou em pacientes submetidos à remoção cirúrgica do disco (Isberg & Isacsson, 1986).

A degeneração do disco articular pode ser a causa de muitos dos sinais e sintomas de DTM (Bell, 1990). Embora, as DTM representem um termo coletivo para um número de problemas clínicos que envolvem a musculatura mastigatória e/ou a ATM, o sintoma mais comum é a dor, geralmente localizada nesta musculatura, na região pré-auricular e/ou na ATM. Estes sintomas normalmente se agravam com os

movimentos da mastigação ou outros movimentos mandibulares, podendo ser acompanhados de dor no maxilar, ouvido, na cabeça, na face, limitação dos movimentos da mandíbula e sons articulares, entre outros (McNeill *et al.*, 1990). Contudo, tal dor não é de origem neurogênica, psicogênica ou visceral. As dores periodontal, dentária e cutânea também foram excluídas dessa definição. Portanto, a DTM inclui distúrbios relacionados com o complexo mastigatório, complexo cervical e articular. A DTM pode ser associada a condições de osteoartrite, artrites, e degeneração do disco articular, quando atinge diretamente a articulação (Mohl, 1999).

Forças biomecânicas dentro dos limites fisiológicos resultam em adaptação e remodelação dos componentes articulares e ajudam na manutenção de uma função aceitável. Fatores como idade, sexo, estresse psicológico, doenças sistêmicas, hormônios e traumatismo também influenciam a capacidade adaptativa da ATM (Moffet *et al.*, 1994).

A ansiedade é um fenômeno humano subjetivo e, à exceção de algumas das alterações somáticas e autônomas associadas, não tem nenhum equivalente em animais experimentais. Em termos biológicos, a ansiedade pode ser considerada como uma forma particular de inibição comportamental que ocorre em resposta a acontecimentos ambientais que são novos, não gratificantes (em condições nas quais se espera uma recompensa) ou punitivos (Rang *et al.*, 2001).

Os efeitos mais importantes dos benzodiazepínicos são exercidos sobre o sistema nervoso central na redução da ansiedade e da agressão, também exercem um acentuado efeito de “domesticação”, permitindo que animais sejam manipulados com mais facilidade. Os benzodiazepínicos diminuem o tempo necessário até o adormecer e aumentam a duração total do sono, apesar de que este último efeito ocorre apenas em indivíduos que normalmente dormem menos de seis horas por noite. Ambos efeitos tendem a declinar quando os benzodiazepínicos são administrados regularmente durante uma a duas semanas (Shader & Greenblatt, 1993).

Como os benzodiazepínicos potencializam a ação do GABA, mas não da glicina, a seletividade de sua ação anticonvulsivante é explicável. O clonazepam em virtude de sua ação anticonvulsivante seletiva é utilizado no tratamento da epilepsia, da mesma forma que o diazepam administrado por via intravenosa para controlar as

convulsões potencialmente fatais no estado de mal epiléptico. A distribuição dos locais de ligação de diazepam no cérebro é maior no córtex cerebral, menor no sistema límbico e mesencéfalo e ainda menor no tronco cerebral e medula espinal (Rang *et al.*, 2001).

Os benzodiazepínicos são bem absorvidos quando administrados por via oral, produzindo, em geral, concentração plasmática máxima em cerca de uma hora, podem ser administrados por via intravenosa e sua injeção intramuscular resulta em absorção lenta. Todos os benzodiazepínicos são metabolizados e, por fim, excretados na forma de conjugados de glicuronídeo na urina; o antagonista mais conhecido é o flumazenil, e é utilizado principalmente para reverter à ação sedativa dos benzodiazepínicos administrados durante a anestesia, bem como no tratamento da superdosagem aguda (Broaden & Goa, 1988).

O aumento do tônus muscular constitui uma característica comum dos estados de ansiedade nos seres humanos e pode contribuir para as mialgias e dores, incluindo cefaléia, que freqüentemente atormentam os pacientes ansiosos. O efeito relaxante dos benzodiazepínicos pode ser clinicamente útil; uma redução do tônus muscular tem se mostrado possível sem haver perda apreciável da coordenação (Rang *et al.*, 2001).

## **OBJETIVOS**

---

O objetivo do presente estudo foi comparar a presença de citocinas inflamatórias na ATM de ratos e verificar os principais aspectos morfológicos e histoquímicos da ação dos benzodiazepínicos em animais com ou sem DTM induzida por dois métodos de alteração oclusal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia/UNICAMP, em 31 de julho de 2006, sob protocolo número 1068-1. A bolsa concedida iniciou-se em 1º de agosto de 2007, sendo o cronograma ajustado em função do início da mesma.

### **A) Fármacos**

Foram utilizados diazepam (Valium 10mg/2ml, solução injetável, Lab. Roche) e solução salina (cloreto de sódio 0,9%) estéril, anestésico quetamina (100mg/ml) e relaxante muscular xilasina (100mg/ml).

### **B) Animais**

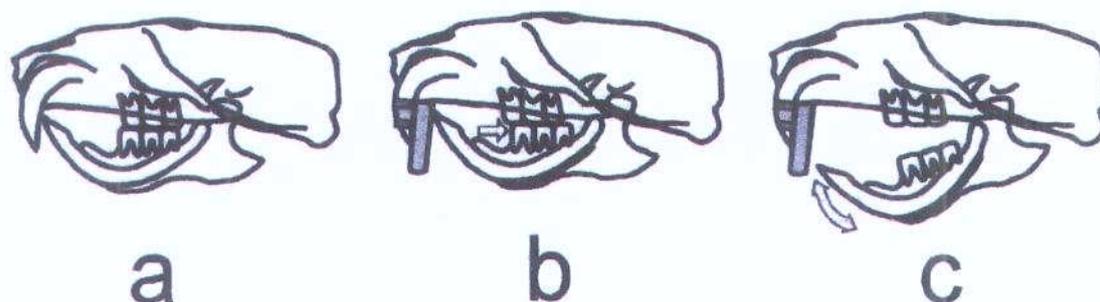
Foram utilizados 30 ratos, adultos (*Rattus norvegicus* albinus, Winstar, SPF\*\*\*\*) com 6 a 10 semanas de vida, com peso entre 200 a 250g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e passaram uma semana de adaptação ambiental após o transporte, antes do início do experimento. Os animais foram mantidos em regime de água e alimentação *ad libitum*, à temperatura média de 23°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, sendo fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7 às 19 horas.

### **C) Grupos experimentais**

Quadro 1 mostra a distribuição dos grupos experimentais propostos.

<b>Grupo</b>	<b>Sub-Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tratamento (via injetável/oral)</b>	<b>Com ou sem mau- oclusão</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Total</b>
<b>Grupo1</b>	1MA	M	Solução NaCl 0,9% (controle)	SEM	5	10
	1MB	M	Valium (2,5mg/kg )	SEM	5	
<b>Grupo2</b>	2MA	M	Solução NaCl 0,9% (controle)	Método 1	5	10
	2MB	M	Valium (2,5mg/kg )	Método 1	5	
<b>Grupo3</b>	3MA	M	Solução NaCl 0,9% (controle)	Método 2	5	10
	3MB	M	Valium (2,5mg/kg )	Método 2	5	

Os animais do grupo 1 serviram como controles, ou seja, não foram submetidos a mau-oclusão. A indução da mau-oclusão no grupo 2 (método 1) foi feita através do deslocamento retrusivo da cabeça da mandíbula durante o movimento de oclusão. Para tanto, um dispositivo confeccionado com bandas ortodônticas foi fixados com resina fotopolimerizável nos incisivos superiores, segundo a técnica descrita por Cholasueksa *et al.*, (2004). O dispositivo apresentou as medidas 8 x 14 x 4 mm. A Figura 1 mostra o esquema de colocação do dispositivo oclusal. O procedimento foi realizado sob anestesia intraperitoneal utilizando uma solução de quetamina (100mg/ml) e relaxante muscular xilasina (100mg/ml), diluindo-se 3,75ml da solução de quetamina mais 0,5 de xilasina em 5,75ml de água destilada.



**Figura 1.** a- oclusão cêntrica, b- ratos com dispositivo oclusal c- movimento de abertura.

A indução da mau-oclusão no grupo 3 (método 2) foi feita através do aumento bilateral da dimensão vertical com a fixação de um fio de aço (2mm de comprimento x 0,9mm de espessura) com resina fotopolimerizável na região de molares inferiores direito e esquerdo. Este procedimento também foi feito sob a mesma anestesia anteriormente descrita. Os animais submetidos à mau-oclusão receberam ração triturada *ad libitum* durante todo o restante do experimento.

### **1) Tratamentos**

Após 7 dias da instalação do dispositivo oclusal, todos os animais (Grupos 1 e 2) foram submetidos ao tratamento com os fármacos em estudo, segundo a Tabela 1, sendo as administrações feitas por via intramuscular, durante 7 dias.

Após este período, as ATM foram expostas após incisão da pele, na região pré-auricular e dissecadas para retirada em bloco. Esse processo cirúrgico foi efetuado em ambos os lados. Os animais foram sacrificados logo após a retirada das peças, por meio de asfixia com gás carbônico.

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, realizada a descalcificação da estrutura em solução de EDTA a 7% e formol a 5%. A ATM contralateral foi submetida à maceração e centrifugação. O sobrenadante foi submetido ao imunoenensaio (Elisa) descrito abaixo (item 1.6).

## **1.2) Processamento do material para microscopia de luz**

A ATM removida foi lavada em água destilada, desidratada em etanol a 70%, 95% e 100%, diafanizada em xilol, embebida e incluída em parafina a 65°C. Cortes seriados de 6 µm foram feitos em micrótomo manual (Leica, RM 2145) e colhidos em lâminas histológicas, que foram desparafinizados, hidratados e corados por meio dos seguintes métodos de coloração:

- a) Hematoxilina-Eosina para análise da estrutura geral da ATM (Michalani, 1980);
- b) Alcian Blue pH 2,5 para visualização de proteoglicanos, (Junqueira & Junqueira, 1983).

Foram realizadas fotomicrografias em cortes histológicos seriados e corados pelos métodos descritos em a, b e c por meio de fotomicroscópio, empregando-se objetiva de 100 vezes e iluminação convencional. Após, foi realizada a histofotometria por meio da medida da intensidade de luz absorvida em uma região percentual da área iluminada (Zimmer, 1973), sendo os valores da absorbância tomados sobre áreas equivalentes ou semelhantes de segmentos das superfícies das ATM estudadas

## **1.3) Morfometria**

As fotomicrografias de cortes histológicos seriados foram realizadas através de fotomicroscópio Nikon (eclipse E800) e sistema fotográfico Nikon (FDX-35), empregando-se objetiva de 100 vezes e iluminação convencional.

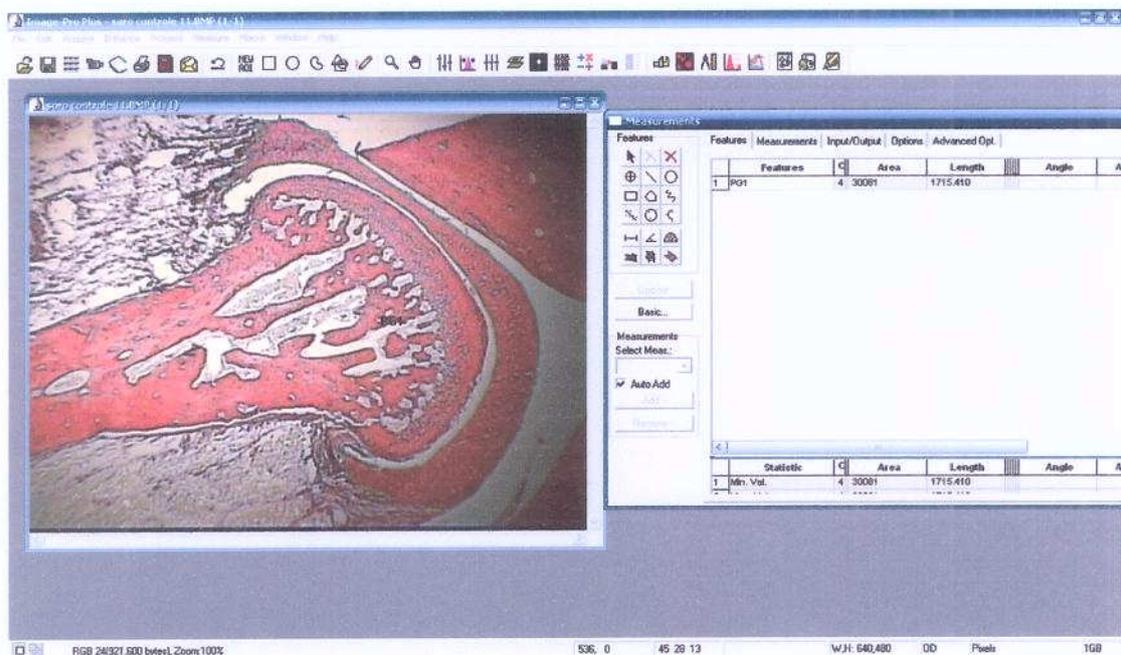
As lâminas foram analisadas utilizando o sistema Image Pro-plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Springs). As imagens foram gravadas com uma câmera de vídeo colorida da marca CoolSNAP-Pro color (Roper Scientific Photometrics) adaptada a um microscópio Eclipse E800 (NIKON), utilizando uma objetiva Nikon Plan Fluor de 10X. O microscópio foi ajustado para a iluminação de Koehler; uma imagem de um campo vazio foi gravada como referência para correção de sombras, e o sistema de medida foi calibrado com o slide de referência antes de ser iniciada qualquer gravação.

Foi criada uma seqüência operacional automática para se medir a densidade ótica das lâminas. Neste processo automático de análises, as imagens das lâminas foram convertidas para uma escala de cinza com 8-bits. O operador calibrou o nível de cinza do fundo das lâminas, fazendo com que a coloração das mesmas chegue à zero.

A densidade óptica foi medida utilizando a média de cinza, sendo igual à soma da intensidade de cinza de cada pixel dividido pelo número de pixels medidos. A resolução das imagens foi ajustada para 640 x 480 pixels e a resolução final da tela foi de 0,103  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ .

A área utilizada para a tomada das medidas foi toda a área do disco articular (adaptado de Varayoud *et al.*, 2001).

A Figura 2 mostra o sistema de medição dos discos articulares pelo sistema Image Pro-plus.



**Figura 2.** Demarcação (em verde) e medição do disco articular e processamento no software Image Pro-plus.

#### **1.4) Imunoensaio**

A avaliação das citocinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$ , IL1- $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foi feita por meio do teste Elisa de captura. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram avaliados no sobrenadante de monocamadas de macrófagos por Elisa.

Para este teste utilizou-se uma placa de 96 poços, a qual foi coberta com 100 $\mu$ L/poço com anticorpo de captura para TNF- $\alpha$  (1 $\mu$ g/mL, *R&D Systems*) e deixada à temperatura ambiente por 24 horas.

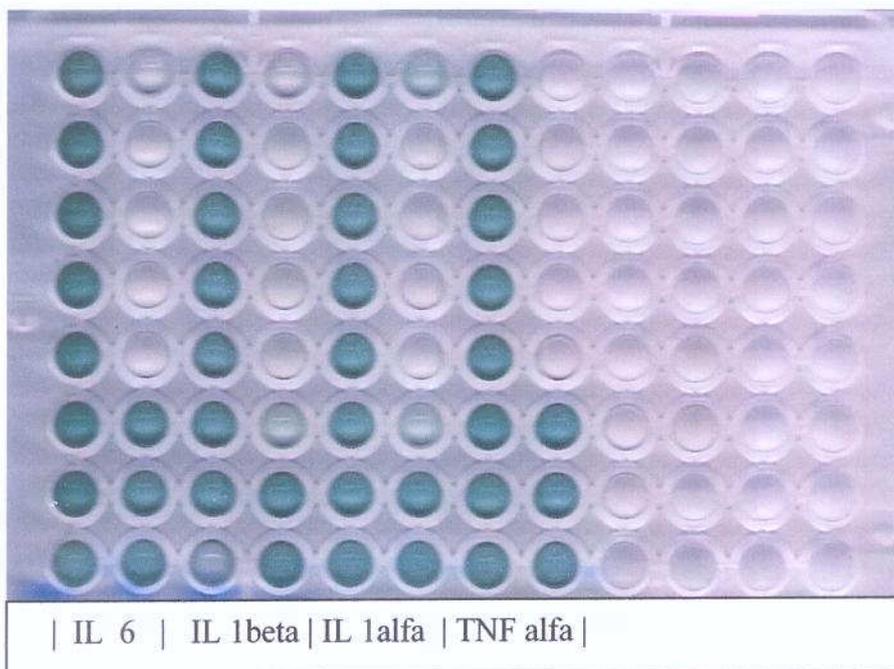
No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem apropriado e então foi adicionado a cada poço 300 $\mu$ L/poço de tampão de bloqueio. A placa foi então incubada com este tampão por 1h à temperatura ambiente para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos.

Após este procedimento, a placa foi novamente lavada e 100  $\mu$ L/poço das amostras (diluídas 1:2) e soluções padrão diluídas em 7 concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 pg/mL) foram acrescentados. A placa foi então incubada à temperatura ambiente por 24 h. Após este período, a placa foi lavada como descrito anteriormente e então adicionou-se 100 $\mu$ L/poço de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  de detecção (biotinilado 50 $\mu$ g/mL, *R&D Systems*) e a placa foi incubada à temperatura ambiente por mais 2 h.

Em seguida a placa foi novamente lavada, acrescentando solução de estreptoavidina 100 $\mu$ L/poço e a placa foi então incubada por 20 min. Após nova lavagem, 100  $\mu$ l de solução para substrato da *R&D Systems* para Elisa foi adicionada. A placa foi mantida no escuro por aproximadamente 25 min para o desenvolvimento de cor e em seguida a reação colorimétrica foi parada através da adição de ácido sulfúrico 1M (50 $\mu$ L/poço).

A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm com filtro de correção de 540 ou 570nm.

A Figura 3 mostra uma das placas do ensaio ELISA realizado.



**Figura 3.** Imunoensaio ELISA realizado em uma das amostras

## RESULTADOS

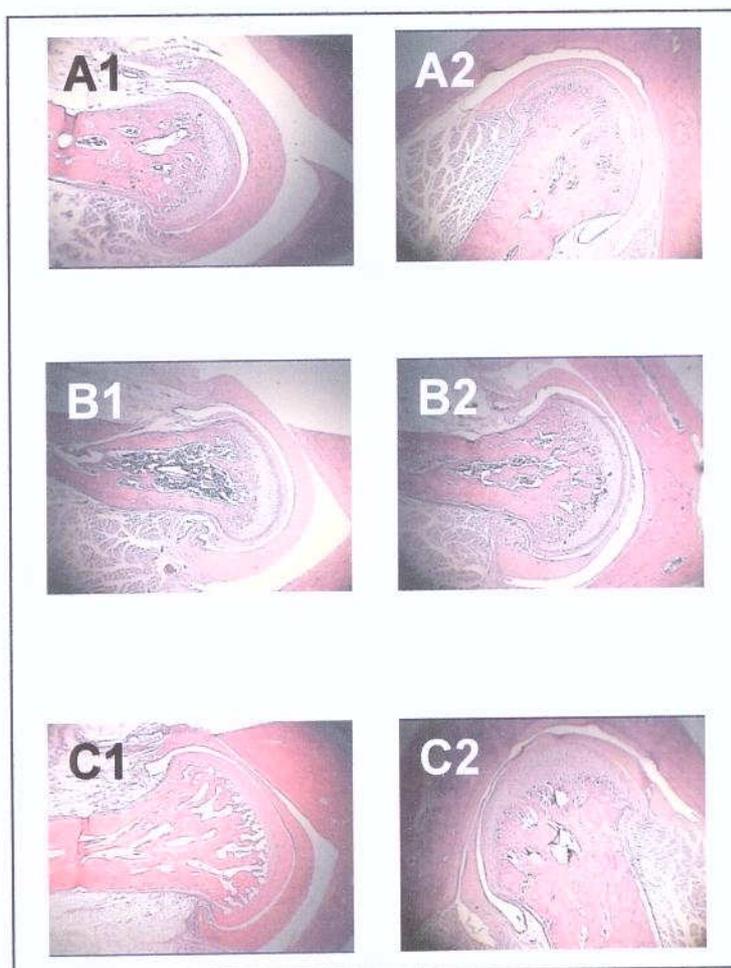
Na Tabela 1 se observa o peso inicial (antes de serem submetidos aos fármacos) e o peso final (após uma semana de aplicação dos fármacos) dos animais em função dos grupos em estudo.

**Tabela 1.** Pesos inicial e final dos animais após os tratamentos realizados.

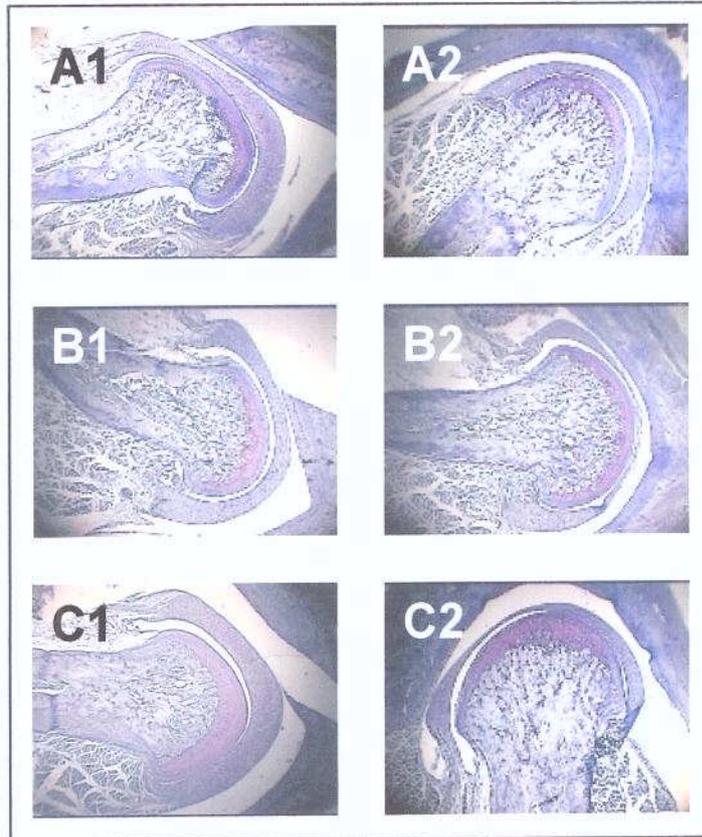
	Método de Mau-Oclusão								
	Sem mau-oclusão			Resina			Bandagem		
	Inicial	Final	p (teste t)	Inicial	Final	p (teste t)	Inicial	Final	p (teste t)
<b>Controle</b>	399,2 (±15,8)	400,2 (±13,1)	0.7301	446,0 (±52,8)	394,0 (±57,6)	0.0081	416,8 (±43,2)	434,0 (±48,4)	0.1835
<b>Diazepam</b>	434,8 (±41,9)	436,4 (±62,8)	0.9025	409,6 (±26,7)	351,2 (±25,3)	< 0.0001	429,0 (±26,9)	384,2 (±40,3)	0.0685

Em média, todos os grupos apresentaram menor peso que o inicial após 14 dias de experimento. Entretanto, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os pesos inicial e final dos animais submetidos ao tratamento com diazepam ou naqueles do controle. Da mesma forma, a mau-oclusão provocada pela bandagem nos incisivos não induziu redução significativa no peso dos animais. Porém, o método de adesão de resina nos molares inferiores dos animais causou redução de peso.

A Figura 4 e 5 mostram as fotomicrografias de um exemplar de cada grupo na coloração HE e Alcian-Blue.

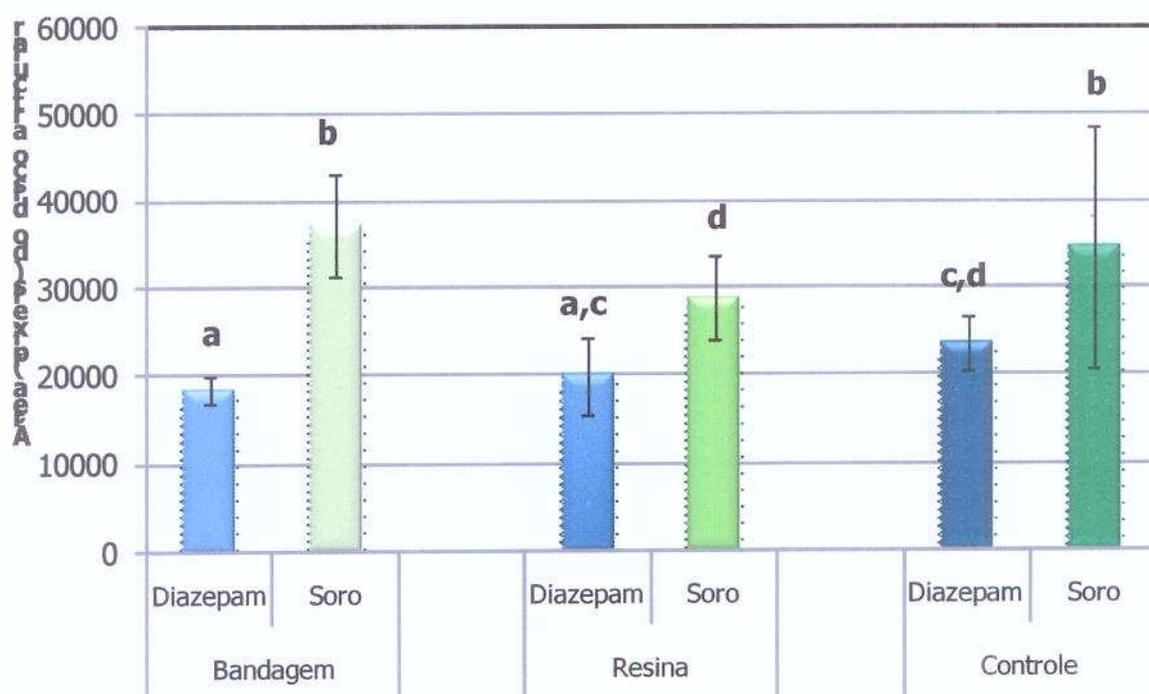


**Figura 4.** Aspecto histológico (HE) das ATM do grupo A (controle), B (resina) e C (bandagem) considerando o tratamento com NaCl a 0,9% (1) e diazepam (2). Assim, o C1, por exemplo, representa o grupo bandagem tratado com soro fisiológico.



**Figura 5.** Aspecto histológico (Alcian-Blue) das ATM do grupo A (controle), B (resina) e C (bandagem) considerando o tratamento com NaCl a 0,9% (1) e diazepam (2).

A Figura 6 mostra o resultado da análise das áreas dos discos articulares dentro de cada grupo.



**Figura 6.** Área dos discos articulares segundo o grupo de estudo. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

Os resultados mostraram que o diazepam causa redução significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ) na área do disco articular, sendo seu efeito agravado quando o animal se encontrava em disfunção oclusal. Além disso, foi possível observar que a colocação de resina nos molares dos animais, como método para forçar o desajuste oclusal, produziu uma significativa redução da área do disco quando comparados ao controle e a bandagem.

A Figura 7 mostra as curvas de calibração, com o  $R^2$ , obtidas para o teste ELISA para cada uma das citocinas. A Figura 8 mostra a concentração de IL 6, IL 1-alfa, IL 1-beta e TNF-alfa obtidas no teste de imunoenensaio ELISA. Até o presente momento foram ensaiados apenas 2 animais devido ao atraso da importação do material necessário ao teste ELISA. Assim, a análise estatística ainda não foi realizada para este parâmetro.

Embora com resultados limitados, já é possível observar que houve diferenças matemáticas entre os grupos, o que deverá corroborar os achados histológicos.

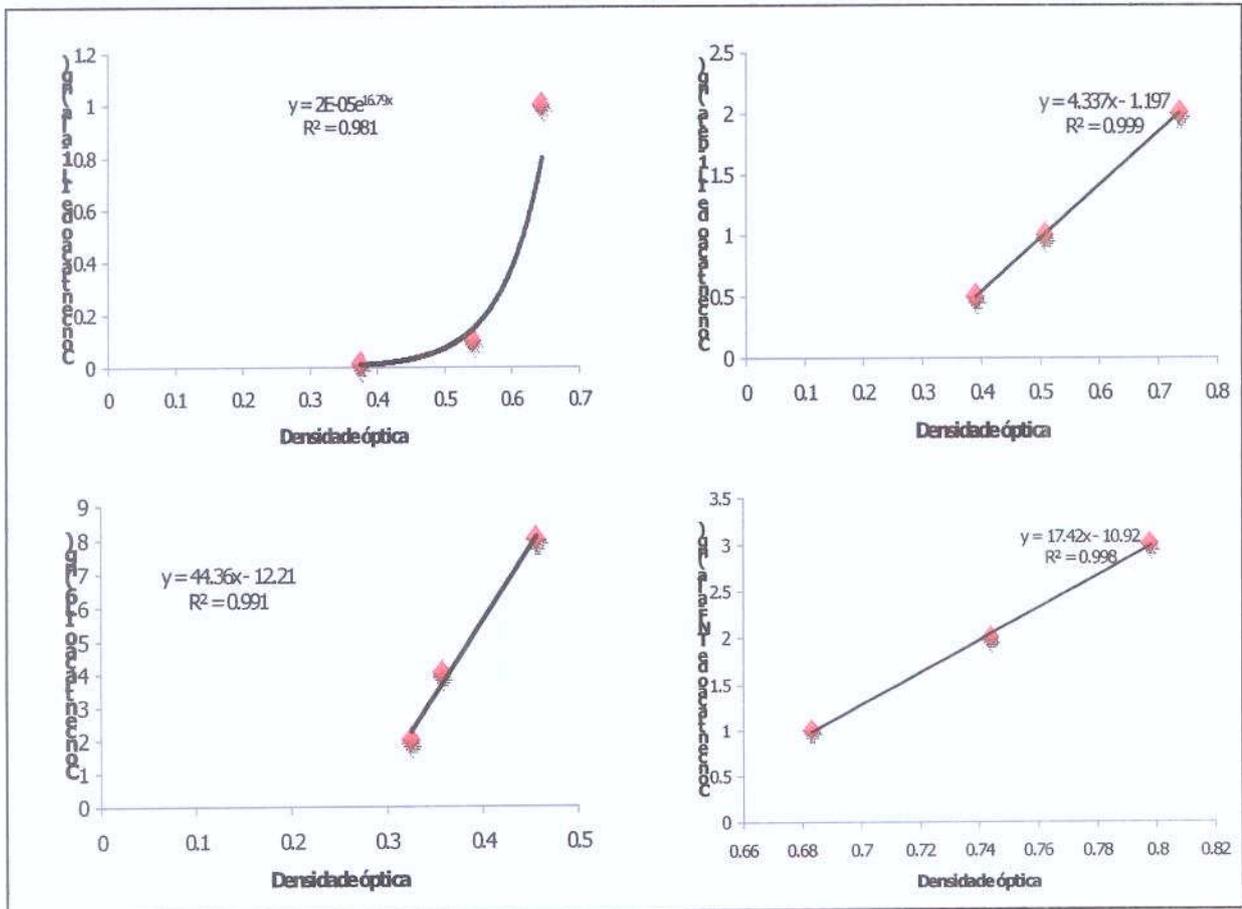


Figura 7. Curvas de calibração obtidas com o imunoenensaio

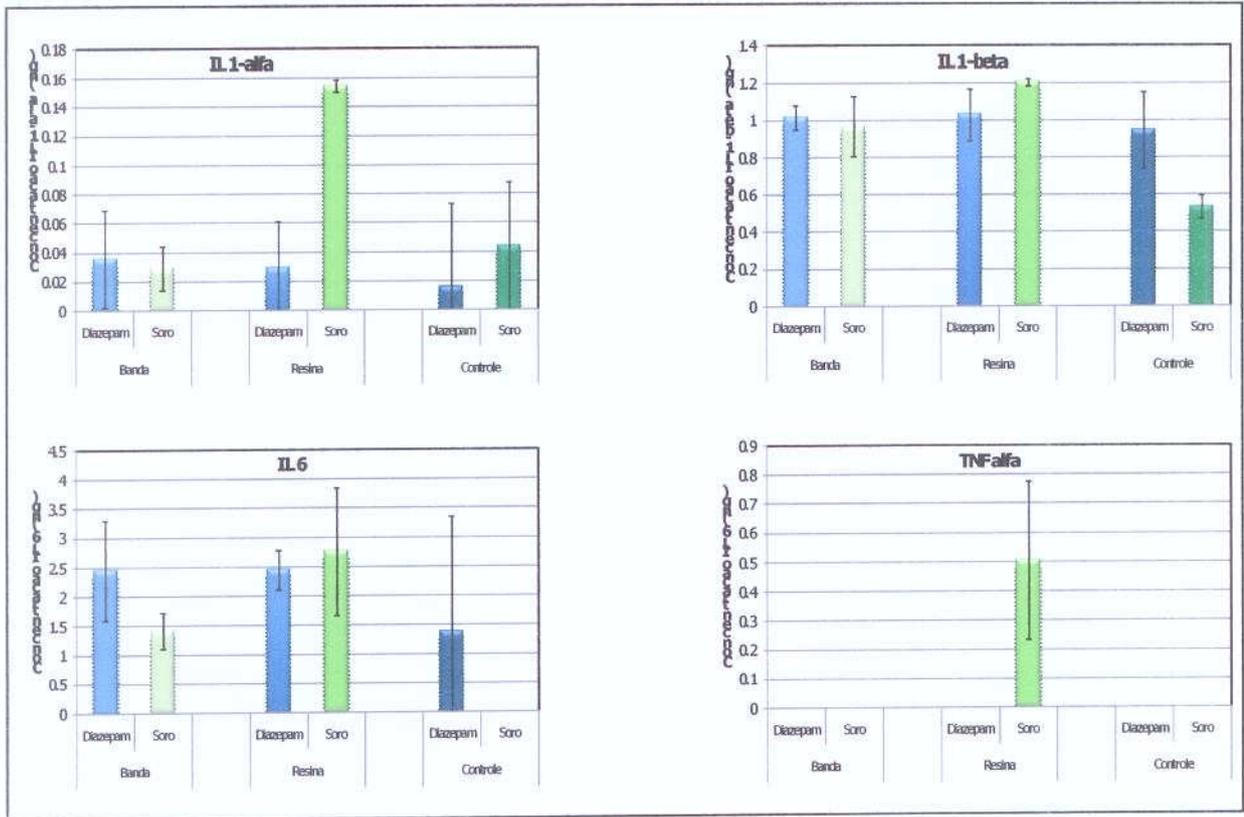


Figura 8. Concentração das interleucinas obtidos pelo imunoenensaio.

## **DISCUSSÃO**

---

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pudemos observar que os ratos, submetidos a mau-oclusão pelo aumento bilateral da dimensão vertical com o uso de resina fotopolimerizável nos molares inferiores, apresentaram uma perda de peso significativa no final do tratamento, indicando que a indução da mau-oclusão provocou um quadro de similar DTM (disfunção temporomandibular) humana e, em função disto, tiveram sua alimentação comprometida e abaixo do ideal.

Segundo Pullinger et al. (1993), existem cinco condições oclusais capazes de aumentar o risco de DTM e, com esta pesquisa, pudemos confirmar que o aumento bilateral posterior poderia ser um deles. Em acordo com McNeill et al. (1990), a DTM representa um termo coletivo para um número de problemas clínicos que envolvem a musculatura mastigatória e/ou a ATM, sendo a dor o sintoma mais comum. Esta se agrava com os movimentos da mastigação ou outros movimentos mandibulares podendo limitar os movimentos da mandíbula, o que poderia ter influenciado na perda de peso dos animais.

A oclusão ocuparia um papel de destaque em relação às disfunções temporomandibulares (McNamara et al., 1995) e, pelo resultado desta pesquisa, foi possível observar que as alterações oclusais induzidas nos animais (deslocamento retrusivo da cabeça da mandíbula e aumento bilateral da dimensão vertical) foram capazes de desenvolver esta disfunção.

Após avaliação das citocinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$ , IL1- $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) pelo teste de imunoenensaio (ELISA), observamos que houve uma grande concentração destas interleucinas, principalmente no grupo dos ratos com resina nos molares inferiores, com exceção da interleucina TNF- $\alpha$ , que se mostrou presente apenas no grupo de resina-soro. Esta grande concentração de interleucinas pode confirmar que a indução dos dois tipos de mau-oclusões nos animais levaram a um processo inflamatório e, segundo Geneser (2003), injúrias na ATM podem causar inflamações envolvendo seus tecidos.

De acordo com Bell (1990), a degeneração do disco articular pode ser a causa de muitos dos sinais e sintomas de disfunção temporomandibular, o que estaria em acordo com os resultados do presente estudo, pois foi observada redução da área do disco articular. Além disso, foi possível observar que a colocação de resina nos molares dos animais, como método para forçar o desajuste oclusal, produziu uma significativa redução da área do disco quando comparados ao controle e a bandagem.

## **CONCLUSÃO**

---

Os resultados mostraram que o diazepam causou redução (ANOVA,  $p < 0,05$ ) da área do disco articular com ou sem a presença da mau-oclusão. Além disso, a mau-oclusão induzida pela resina posicionada na oclusal dos molares dos animais, induziu significativamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ) mais dano no disco articular do que aquela induzida pela bandagem dos incisivos superiores.

Concluimos, então, que o diazepam, assim como os modelos de interferências oclusais propostos, interferem negativamente com o disco articular.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. Akerman S, Kopp S, Rohlin M. Histological changes in temporomandibular joints from elderly individuals. An autopsy study. *Acta Odontol Scand* 1986;44:231-39.
2. Bach-Petersen S, Kjaer I, Fischer-Hansen B. Prenatal development of the human osseous temporomandibular region. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1994;14:135-45.
3. Bell WE. Categories of temporomandibular joint. In: *Temporomandibular disorders. Classification, diagnosis, management*. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1990. p.273-371.
4. Broaden R.N, Goa K.L. Flumazenil. A preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and clinical use. *Drugs* 1988;35:448-467.
5. Caltabiano M, Caltabiano C, Martinez G, Leonardi R. Aspetto histologico del tessuto cartilagineo del cõndilo fetale umano. *Mondo Ortodõntico* 1990;15:439-42.
6. Carlsson GE. Masticatory efficiency: the effect of age, the loss of teeth and prosthetic rehabilitation. *Int Dental J* 1984;4:93-97.
7. Cholasueksa P, Warita H, Soma K. Alterations of the Rat Temporomandibular Joint in Functional Posterior Displacement of the Mandibule. *Angle Orthodontist*, 2004;74-5:677-683.
8. Droukas B, Linde C, Carlsson G.E. Relationship between occlusal factors and signs and symptoms of mandibular dysfunction. A clinical study of 48 dental students. *Acta Odontol. Scand*, 1984;42:277-283,
9. Finn Geneser. *Histologia com bases biomoleculares* editora medica Panamericana, Guanabara Koogan; 3ªed. 2003 p.211
10. Ghafari J, Degroote C, Condylar Cartilage Response to Continuous Mandibular Displacement in the Rat. *The Angle Orthodontist* january, 1986:49
11. Harper R.P, Kerins C.A, Talwar R, Spears R, Hutchins B, Carlson D.S, McIntosh J.E, Bellinger L.L. Meal Pattern Analysis in Response to Temporomandibular Joint Inflammation in the Rat. *Journal of Dental Research*; 2000;79(9):1704.
12. Isberg A, Isacsson G. Tissue reactions associated with internal derangement of the temporomandibular joint. A radiographic, cryomorphologic, and histologic study. *Acta Odontol Scand* 1986;44:160-64.
13. Junqueira LCV, Junqueira LMMS. *Técnicas básicas citologia e histologia*. 1ª ed. São Paulo: Editora Santos; 1983. p.50-51.

14. Katchburian E, Arana-Chavez V. *Histologia e embriologia oral*. São Paulo: Panamericana; 1999. p.357-73.
15. Kino K, Ohmura Y, Amagasa T. Reconsideration of the bilaminar zone in the retrodiskal area of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;75:410-21.
16. Litvak H, Malament K. Prosthodontic management of temporomandibular disorders and orofacial pain. *J Prosthet Dent* 1993;69:77-84.
17. Luz J.G.C, Uono H.H, Yamamoto M.K. Passive mandibular border positions and their relationships with signs and symptoms of craniomandibular disorder. A study of linear and angular measurements. *J Nihon Univ Sch Dent*, 1995;37:28-32.
18. Mao J.J, Rahemtulla F, Scott P.G. Proteoglycan Expression in the Rat Temporomandibular Joint in Response to Unilateral Bite Raise.
19. McNamara Jr, JA. The relationship of occlusal factors and orthodontic treatment to temporomandibular disorders. In: Sessle BJ, Bryant PS, Dionne RA Eds. *Temporomandibular disorders and related pain condition*. Seattle: IASP Press; 1995. p.399-427.
20. McNeill C, Mohl ND, Rugh JD, Tanaka TT. Temporomandibular disorders: diagnosis, management, aedication and research. *JADA* 1990;120:253-63.
21. Michalani G. *Técnica histológica em anatomia patológica*. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1980.
22. Moffet B.C, Johnson L.C, McCabe J.B, Askew H.C. Articular remodeling in the adult human temporomandibular joint. *Am J. Anat.* 1964;115:119-130.
23. Mohl ND. The anecdotal tradition and the need for evidence based care for temporomandibular disorders. *J Orofac Pain* 1999;13:227-31.
24. Pullinger AG, Seligman DA, Gambein JA. A multiple regression analysis of the risk and relative odds of temporomandibular disorders as a function of common occlusal features. *J Dent Res*. 1993;72:968-79.
25. Rang H.P, Dale M.M, Ritter J.M. *Farmacologia* 4ª ed. Guanabara Koogan 2001:442-450.
26. Shader R.I, Greenblatt D.J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. *New Engl. J. Med.* 1993;328:1398-1405.
27. Shaw R.M, Molyneux G.S. The effects of induced dental malocclusion on the fibrocartilage disc of the adult rabbit temporomandibular joint. *Archs Oral Biol*. 1993;38:415-422.

- 28. Storey,AT . Temporomandibular joint: function and dysfunction. Copenhagen: Munksgraard International Publishers; 1979.**
- 29. Tanaka E, Aoyama J, Tanaka M, Eijden T, Sugiyama M, Hanaoka K, Watanabe M, Tanne K. The proteoglycan contents of the temporomandibular joint disc influence its dynamic viscoelastic properties. J Biomed Mater Res 2003;65(A):386-92.**
- 30. Varayoud J, Ramos JG, Joazeiro PP, Montes GS, Toro MMM, Luque EH. Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term. Biology of Reproduction 2001;65:375-83.**
- 31. Yamamoto M. Involvement in morphological changes of the articular cartilage of rat temporomandibular joint induced by experimental malocclusion. Fukuoka Igaku Zasshi; 1994.85(3):78-90.**
- 32. Zimmer GH. Microphotometry. Mol Biol Biochem Biophys 1973;14:297-328.**