



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MILAGROS DEL VALLE EL ABRAS ANKHA

**USO DE ÁCIDO HIALURÔNICO ASSOCIADO AO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS DO DISCO
ARTICULAR E DA SUPERFÍCIE OSTEOCONDRAIS CAUSADOS PELA
OSTEOARTRITE NA ATM**

2018

MILAGROS DEL VALE EL ABRAS ANKHA

**USO DE ÁCIDO HIALURÔNICO ASSOCIADO AO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS DO DISCO
ARTICULAR E DA SUPERFÍCIE OSTEOCONDAL CAUSADOS PELA
OSTEOARTRITE NA ATM**

Tese de Pesquisa apresentado ao Curso de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA do Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

El Abras Ankha, Milagros Del Valle

Uso de ácido hialurônico associado com plasma rico em plaquetas na regeneração de defeitos do disco articular e da superfície osteocondral causados pela osteoartrite na ATM / Milagros Del Valle El Abras Ankha. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

67 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Yasmin Rodarte Carvalho.

1. Osteoartrite . 2. Disfunção temporomandibular. 3. Regeneração tecidual. 4. Plasma rico em plaquetas. 5. Ácido hialurônico. I. Rodarte Carvalho, Yasmin , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Rubens Guimarães Filho

Universidade de Taubaté (UNITAU)

Taubaté

Prof. Dra. Carla Roberta Tim

Universidade Brasil

São Paulo

Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mônica Ghislaine Oliveira Alves

Universidade de Mogi das Cruzes (UMC)

Mogi das Cruzes

São José dos Campos, 7 de fevereiro de 2018

DEDICATÓRIA

Principalmente a Deus, por me dar saúde e ter dado a oportunidade de ter uma família e amigos maravilhosos.

A meus pais, Moein Ishak El Abras e Maha Ankha de El Abras, pelo amor, dedicação e apoio.

A meus irmãos, Antonio e Jul, que mesmo estando longe me deram apoio e alegria quando precisei.

A meus amigos, que sempre estão presentes, mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Virgem, por me dar forças para continuar e chegar até aqui. Eles sabem que estes últimos anos não foram fáceis.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, em especial:

À minha Orientadora, a Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho, pela amizade, dedicação e ensino. Por sempre estar presente para me aconselhar e guiar em tudo, Obrigada!!!

À Profa. Dra. Luana Marotta R. de Vasconcellos, pela amizade, ensino e dedicação. Por sempre estar presente para me orientar em tudo.

A meus companheiros da pós-graduação, em especial Victor Bernardes Barroso da Costa, Vivian Narana Ribeira El Achkar, Fernanda Herrera da Costa, Felipe Eduardo de Oliveira pelo apoio e amizade.

Aos Técnicos do laboratório de Patologia e histologia, do Departamento de Biociências do ICT – Unesp, Campus de São José dos Campos, Maria Salete, Walter e Ana Lourdes pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos Alunos de Iniciação Científica: Bruna Emi Takamura, Leticia de Miguel Nazario e Vinicius Almeida de Barros Lima.

A Diego Rodrigues Ferreira, pela ajuda com a parte estatística deste trabalho, o apoio, amizade e companhia.

A meus compadres Lilian Anami e Julio V. Paulin pelo apoio brindado quando mais precisei.

Ao ICT-Unesp e seus funcionários, por manter um ótimo ambiente de estudo e trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro concessão da bolsa

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 20 |
| 2.1 Objetivo geral | 20 |
| 2.2 Objetivo específico | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 Matriz de hidrogel | 21 |
| 3.2 Animais | 22 |
| 3.2.1 Divisão dos grupos | 22 |
| 3.2.2 Procedimento cirúrgico para lesão do disco articular | 23 |
| 3.3 Tratamento da ATM | 24 |
| 3.4 Eutanásia | 26 |
| 3.5 Processamento para análise macroscópica, radiográfica, histológica, histoquímica e imuno-histoquímica do disco articular e do côndilo Mandibular | 27 |
| 3.6 Forma de análise do disco e do côndilo mandibular | 28 |
| 3.6.1 Análise macroscópica | 28 |
| 3.6.2 Análise radiográfica do disco articular | 28 |
| 3.6.3 Análise histológica | 28 |
| 3.6.4 Análise histoquímica | 29 |
| 3.6.5 Análise de imuno-histoquímica | 29 |
| 3.7 Análise estatística | 29 |
| 4 RESULTADOS | 31 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1 Análise macroscópica dos discos articulares | 31 |
| 4.1.2 Análise macroscópica dos côndilos mandibulares..... | 34 |
| 4.2 Análise radiográfica dos discos articulares..... | 36 |
| 4.3 Análise histológica do côndilo e do disco articular | 38 |
| 4.3.1 Análise histológica do côndilo mandibular | 41 |
| 4.3.2 Análise histológica do disco articular | 43 |
| 4.4 Análise histoquímica do disco e do côndilo mandibular..... | 43 |
| 4.4.1 Análise das fibras colágenas | 43 |
| 4.5 Análise de imuno-histoquímica | 50 |
| 5 DISCUSSÃO | 55 |
| 6 CONCLUSÃO | 60 |
| REFERÊNCIAS | 61 |
| ANEXO | 67 |

El Abras Ankha MV. Uso de ácido hialurônico associado com plasma rico em plaquetas na regeneração de defeitos do disco articular e da superfície osteocondral causados pela osteoartrite na ATM [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, 2018

RESUMO

Estudos anteriores sugerem que o ácido hialurônico (AH) e o plasma rico em plaquetas (PRP) têm potencial para melhorar o processo de cicatrização da cartilagem e diminuir a progressão da osteoartrite. No entanto, poucas pesquisas avaliam seu efeito sinérgico. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do AH associado ao PRP na regeneração do disco articular e da superfície osteocondral da articulação temporomandibular (ATM). A osteoartrite será induzida por meio da perfuração bilateral do disco articular de coelhos. Quarenta coelhos foram divididos em 4 grupos, conforme o procedimento: sem lesão(SL)/sem tratamento(ST) (n=4), lesão(L)/sem tratamento (ST) (n=12), L/AH (n=12), L/AH+PRP (n=12). Quatro coelhos do grupo SL/ST foram eutanasiados no tempo zero. Após 8 e 24 semanas da perfuração dos discos articulares, seis coelhos dos grupos L/ST, L/AH e L/AH+PRP foram eutanasiados. O disco articular foi avaliado radiograficamente para visualizar possíveis calcificações. Foi realizada análise macroscópica e histológica do disco e do côndilo mandibular. Foi utilizada a análise histoquímica por *Picrosirius Red* para avaliar a presença de colágeno I e III e a análise imuno-histoquímica do colágeno I e II. As porcentagens de marcação obtidas nas análises histoquímica e imuno-histoquímica foram avaliadas estatisticamente, adotando-se o nível de significância de 5%. Macroscopicamente, o disco articular nos grupos tratados apresentou, na maioria dos espécimes, preenchimento parcial ou total do defeito criado. Os côndilos apresentaram, na maioria dos espécimes, irregularidade da superfície osteocondral. Radiograficamente, após 24 semanas da perfuração do disco, focos de radiopacidade foram observados nos grupos não tratados e em alguns dos espécimes dos tratados. Na análise histológica foi confirmada a presença de material mineralizado, próximo e distante da perfuração, além de diminuição da celularidade e fibrose. Na análise histoquímica, a porcentagem de colágeno I prevaleceu com relação ao colágeno III, tanto no disco quanto no côndilo, independentemente do grupo e período avaliado. Entretanto, no disco não houve diferença estatística significativa. No côndilo, L/AH e L/AH+PRP nos períodos de 8 e 24 semanas apresentaram uma porcentagem de colágeno I significativamente maior que L/ST ($p < 0,05$). A expressão imuno-histoquímica de colágeno I e II no disco não apresentou diferença estatística significativa. No côndilo, a expressão do colágeno I apresentou diferença significativa entre os

grupos ($p=0,00$) e os períodos ($p=0,05$). O grupo L/AH+PRP de 24 semanas apresentou maior porcentagem de marcação positiva para colágeno I, que era diferente dos grupos SL/ST e L/ST, porém sem diferença estatística com relação ao L/AH. Em conclusão, os tratamentos da osteoartrite com AH ou PRP associado ao AH mostram resultados promissores, ajudando na redução do defeito criado no disco, porém, sem resultados satisfatórios como protetores da superfície osteocondral, na presença de perfuração discal.

Palavras-chaves: Osteoartrite. Disfunção temporomandibular. Regeneração tecidual. plasma rico em plaquetas. Ácido hialurônico

El Abras Ankha MV. Use of hyaluronic acid associated with platelet rich plasma in the regeneration of defects of the articular disc and the osteochondral surface caused by osteoarthritis in the TMJ [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo state University (Unesp), Institute of Science and Technology, 2018.

ABSTRACT

Previous studies have suggested that hyaluronic acid (HA) and platelet-rich plasma (PRP) have the potential to improve the healing process of cartilage and decrease the progression of osteoarthritis. However, few studies have evaluated their synergistic effect. This study aims at evaluating the effect of HA associated with PRP on the regeneration of the articular disc and the osteochondral surface of the temporomandibular joint (TMJ). Osteoarthritis was induced by means of bilateral perforation of the articular disc of rabbits. Forty rabbits were divided into 4 groups, according to the procedure: without lesion (WL)/without treatment (WT) (n = 4), lesion (L)/without treatment (WT) (n = 12), L/HA (n = 12), L/HA+PRP (n = 12). Four rabbits from group G1 were euthanized at time zero. After 8 and 24 weeks of joint disc perforation, six rabbits from groups L/WT, L/HA and L/HA+PRP were euthanized. The articular disc was evaluated radiographically to visualize possible calcifications. Macroscopic and histological analysis of the disc and the mandibular condyle were performed. The histochemical analysis by Picrosirius Red was used to evaluate the presence of collagen I and III, as well as the immunohistochemical analysis was used to evaluate the expression of collagen I and II. The percentages of staining obtained from the histochemical and immunohistochemical analysis were statistically evaluated, adopting the significance level of 5%. Macroscopically, the articular disc in the treated groups presented in most of the specimens partial or total filling of the defect created. The condyles presented, in most of the specimens, degeneration of the osteochondral surface. Radiographically, after 24 weeks of disc perforation, foci of radiopacity were observed in the untreated and in some of the specimens of treated groups. Histological analysis confirmed the presence of mineralized material, close and distant to perforation, as well as decreased cellularity and fibrosis. In the histochemical analysis, the percentage of collagen I prevailed in both disc and condyle, independently of the group and period evaluated. However, in the disc there was not statistical difference. In the condyle, L/HA and L/HA+PRP in the periods of 8 and 24 weeks presented a percentage of collagen I significantly higher than L/WT ($p < 0.05$). The expression of collagen I and II in the disc did not present significant statistical difference. In the condyle, the expression of collagen I was statistically different between the groups ($p = 0.00$) and the periods ($p = 0.05$). The 24-week L/HA+PRP group had a higher

percentage of positive marking for collagen I, which was different from the WL/WT and L/WT groups, but with no statistical difference with respect to L/HA. In conclusion, the treatment of osteoarthritis with HA or PRP associated with HA shows promising results, helping to reduce the defect created in the disc, but without satisfactory results as protectors of the osteochondral surface, in the presence of perforation of the disc.

Keywords: Osteoarthritis. Temporomandibular dysfunction. Tissue regeneration. Platelet rich plasma. Hyaluronic acid.

1 INTRODUÇÃO

Artrite e outras condições reumáticas representam atualmente a principal causa de incapacidade nos EUA. Estas alterações atingem hoje 6% da população acima dos 30 anos de idade, sendo que em 2030 essa porcentagem deverá atingir 25% da população, tornando-se um problema para a saúde pública (Bijlsma et al., 2011; Wang SZ et al., 2015).

Estudos epidemiológicos mostraram que 8,9% da população em geral sofrem de osteoartrite da articulação temporomandibular (OA-ATM), e a prevalência relatada de OA-ATM em pacientes com disfunção temporomandibular (DTM) é de até 55,6% (Bousnaki et al., 2017; Manfredini et al., 2006).

Os desarranjos internos da articulação temporomandibular (DIATM) estão caracterizados pela degeneração focal da superfície osteocondral como, erosão óssea, esclerose, e formação de osteófitos na superfície condilar (Roh et al., 2012; Li et al., 2015), assim como alteração da composição bioquímica e viscosidade do líquido sinovial, levando à perda da função (Wang L, Detamore, 2007; Bijlsma et al., 2011; Wang SZ et al., 2015).

Fatores genéticos predisponentes, além de fatores metabólicos, bioquímicos e biomecânicos contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas na ATM (Wang L, Detamore, 2007; Wang SZ et al., 2015).

A etiologia e progressão dos DIATM são mal compreendidas e, como resultado, as opções de tratamento são limitadas. Por causa da natureza complexa e única de cada caso de DIATM, o diagnóstico requer uma análise específica do paciente, acompanhado por várias modalidades de diagnóstico. Da mesma forma,

o tratamento requer planos personalizados para atender as características específicas da doença de cada indivíduo.

No ambiente ativo da ATM, do ponto de vista mecânico e bioquímico, para o tratamento das DTMs, existe na atualidade a visco-suplementação. Esta consiste da aplicação de substâncias com propriedades analgésicas e lubrificantes, idealizada para substituir o líquido sinovial perdido ou diminuído por causa da OA, para melhorar a função (Legré-Boye, 2015). Para que esta modalidade de tratamento seja efetiva, múltiplas aplicações devem ser feitas, resultando em incômodo para o paciente. Em vista disso, abordagens além desta terapêutica que possam restaurar de forma permanente a funcionalidade em uma única aplicação, tornam-se uma necessidade.

Vários estudos têm procurado uma abordagem terapêutica que proporcione além de analgesia e lubrificação, propriedades reparadoras e regeneradoras das estruturas sinoviais das articulações em geral (Jonnalagadda, Rivero, 2014; Elmallah et al., 2015). Uma abordagem é a engenharia dos tecidos, que aplica conhecimentos de engenharia, medicina e ciências da vida, para o desenvolvimento de substitutos biológicos, com o objetivo de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido lesionado ou perdido.

Para que um substituto biológico possa corresponder às propriedades geométricas, bioquímicas e biomecânicas nativas de tecidos articulares saudáveis, requer-se um conhecimento profundo das características do tecido nativo a ser reparado ou substituído (Murphy et al., 2013).

As articulações estão conformadas por cartilagem hialina, osso subcondral, líquido sinovial e uma membrana sinovial que envolve estas estruturas. A ATM além destes componentes apresenta um disco fibrocartilaginoso que, ao contrário da cartilagem hialina, consiste de um tecido conjuntivo denso com baixa densidade celular e uma limitada rede vascular restrita à região periférica (Madeira et al., 2015).

O disco da ATM situa-se em uma cavidade entre o côndilo mandibular e a superfície articular do osso temporal, dividindo a cavidade em dois compartimentos, supra e infra discal. O disco tem basicamente duas porções: uma anterior e outra posterior. A primeira delas, relacionada com a parte funcional da articulação, é dividida em três bandas: uma banda anterior, uma intermediária e uma posterior; constituídas por tecido conjuntivo denso, avascular, semelhante ao tecido que reveste o côndilo (Murphy et al., 2013).

As células que conformam o disco articular estão dispostas de forma homogênea e apresentam características semelhantes a condrócitos e fibroblastos. Embora ambos os tipos de células sejam distribuídos por todo o disco, as células na porção central da banda intermediária, tendem a ser semelhantes a condrócitos, enquanto as células na periferia do disco tendem a ser semelhantes a fibroblastos. A celularidade é maior nas bandas anterior e posterior do que na banda intermediária, podendo existir variações entre as espécies. Tem sido relatado que, com a idade, o disco torna-se mais fibroso e acelular (Berkovitz, Pacy, 2002).

Em termos de sua composição bioquímica, o disco é altamente fibroso, tendo um conteúdo de baixo teor de glicosaminoglicanas (GAG), alto teor de colágeno tipo I, e alta quantidade de água. (Sindelar et al., 2000). O componente primário da matriz extracelular (MEC) é o colágeno. O disco articular mostra um alinhamento de colágeno em forma de anel ao longo da periferia e alinhamento anteroposterior através da região central. Esta anisotropia contribui para a relação estrutura-função do disco, suportando as forças de tração impostas ao mesmo (Murphy et al., 2013).

Em condições fisiológicas, o disco está adaptado para suportar as cargas mecânicas durante a função mastigatória, já que possui um baixo coeficiente de atrito, tornando-o resistente ao cisalhamento e às forças de compressão (Bijlsma et al., 2011). Não obstante, a escassez de fatores de crescimento envolvidos na cicatrização, em combinação com uma espessa e hipóxica matriz extracelular

(MEC), resulta em um baixo potencial de cura intrínseco quando lesionado. (Madeira et al., 2015).

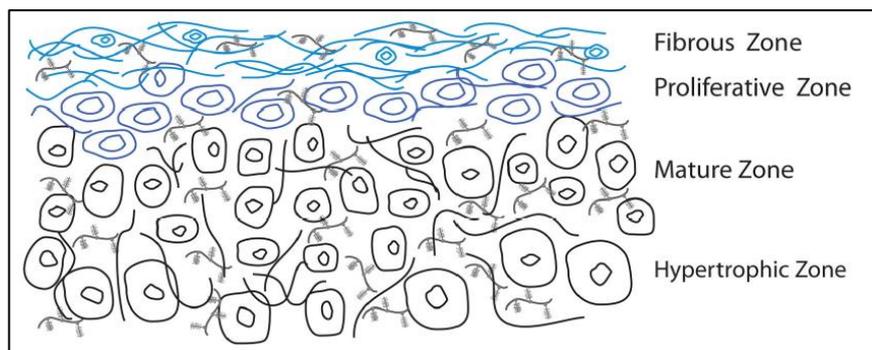
O cômulo articular no adulto está conformado por 4 zonas: fibrosa, proliferativa, madura e hipertrófica, que se encontram esquematizadas na figura 1.

A zona fibrosa é conformada por tecido conjuntivo denso, avascular, com feixes de colágeno tipo I e tipo II, sendo este último observado em pouca quantidade. Estas fibras encontram-se orientadas paralelamente à superfície articular. Escassos fibroblastos estão situados entre as fibras colágenas, alguns dos quais de formato arredondado, com aspecto de fibrocondrócitos (Wang L et al., 2009; Kalpakci et al., 2011).

A zona proliferativa é uma fina camada que contém células mesenquimais indiferenciadas, que podem se diferenciar em condrócitos ou fibroblastos. Esta separa a zona fibrosa das zonas madura e hipertrófica, e fornece novas células, tanto para a camada superficial quanto para a subjacente. (Klinge, 1996). A zona proliferativa está conformada por colágeno tipo I, observado na maioria das vezes como fibras dispersas. Assim como na zona fibrosa, a zona proliferativa contém versicano (Roth et al., 1997).

As zonas subjacentes, madura e hipertrófica, incluem condrócitos maduros e diferenciados, além de colágeno de ambos os tipos I e II (Teramoto et al., 2003; Wang L et al., 2009; Murphy et al., 2013). Subjacente a estas camadas encontra-se o osso condilar que apresenta uma organização lamelar, com áreas esponjosas e compactas.

Figura 1- Representação esquemática da cartilagem condilar



Legenda: Zona fibrosa: orientação anisotrópica das fibras, anteroposterior (predominantemente colágeno tipo I e proteoglicanos semelhantes a versicam). Zona proliferativa: predominantemente celular com matriz extracelular mínima. Zonas madura e hipertrofica: orientação isotrópica, disposição aleatória das fibras (predominantemente colágeno tipo II e proteoglicanos agregan)

Fonte: Murphy et al., 2013.

A engenharia dos tecidos pode oferecer de forma natural uma solução permanente para substituir ou tratar as estruturas teciduais lesionadas da ATM, com a finalidade de recuperar a função e eliminar os sintomas da dor causados pelas DTMs.

Existe uma grande variedade de estudos relacionados com a reparação e regeneração da cartilagem hialina e das superfícies osteocondrais (Madeira et al., 2015). Poucos estudos existem em relação à fibrocartilagem, menisco ou disco articular da ATM em comparação com outras articulações, como a do joelho (Kon et al., 2010; Blakeney et al., 2011).

Muitos estudos ainda precisam ser feitos para se conseguir o objetivo final, que é gerar um implante biológico ou regenerar uma área lesionada, de forma que as características histológicas, bioquímicas e biomecânicas sejam idênticas às do disco articular nativo e que, além disso, seja aplicável clinicamente (Shu W et al., 2015).

Lesões e doenças de todos os tecidos fibrocartilagosos incluindo o menisco, as junções tendão-osso e os discos intervertebrais da coluna e da

articulação temporomandibular, carecem de cura espontânea. Em algumas situações o tecido circundante à lesão não tem o potencial de regeneração adequado, colocando em questão a viabilidade do processo, na medida em que a utilização de matrizes apenas com funções estruturais e de orientação celular torna-se insuficiente (Huang, Fu et al., 2010).

Os hidrogéis são constituídos por uma rede tridimensional reticulada de cadeias de polímeros ligadas covalentemente, que em contato com água, intumescem, tornando-se biocompatíveis e biodegradáveis (Brooks et al., 1992; Murphy et al., 2013). A organização em rede destes hidrogéis facilita a permeação de oxigênio e nutrientes permitindo o encapsulamento e incorporação de células em microesferas, bem como a migração destas entre o tecido circundante e o *scaffold* (Mesallati et al., 2014). A sua forma e consistência permite ainda a sua administração parenteral para preencher defeitos de forma irregular (Chiu et al., 2011).

Matrizes extracelulares (MEC) sintéticas na forma de hidrogel foram idealizadas para criar um microambiente celular idêntico ao nativo. Estes hidrogéis sintéticos foram projetados para incorporar tanto proteínas quanto glicosaminoglicanos em uma única matriz. Por exemplo, AH ou micrômeros de sulfato de condroitina modificados com tiol foram combinados com micrômeros de gelatina tiol, e quando reagiram com polietileno glicol (PEG) diacrilato, formaram um microambiente reticulado semelhante a uma MEC (Shu XZ et al., 2006; Nicodemus, Bryant, 2008).

No âmbito da ATM, a engenharia dos tecidos pouco tem feito, embora já tenham sido estudadas várias matrizes com finalidades terapêuticas, reparadoras e regenerativas das estruturas lesionadas, estas têm sido confinadas aos efeitos sobre a superfície osteocondral e não sobre o disco (Takafuji et al., 2007)

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear não ramificado consistindo em unidades de dissacarídeos repetidas. Os monómeros de proteoglicano ligam-se a AH para formar grandes agregados que estão enredados

na matriz de colágeno de cartilagem intacta. O AH também é um componente macromolecular crítico no fluido sinovial normal e parece desempenhar um papel na estabilização das articulações e na nutrição das superfícies articulares (Guarda-Nardini et al., 2009). (Gotterbarm et al., 2006). No entanto, o seu efeito reparador permanece controverso, devido à escassez de provas.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um agente terapêutico relativamente novo que tem várias vantagens potenciais em relação aos corticosteroides no tratamento de doenças degenerativas da ATM. O PRP exibe propriedades antibacterianas (Woodall et al., 2007), inibe a proliferação de macrófagos e a reduz a resposta inflamatória (Bielecki et al., 2012).

O PRP é uma terapia biológica que compreende um concentrado de plaquetas do sangue do paciente (Pietrzak, Eppley, 2005). Este concentrado mostrou grande potencial como modalidade terapêutica devido à abundância de fatores de crescimento que contém (Marx, 2004). Apesar do fato de que o mecanismo exato de ação do PRP permanece desconhecido, tornou-se popular na medicina esportiva e na ortopedia, emergindo como um tratamento promissor para defeitos degenerativos da cartilagem e OA (Kon et al., 2010). Isto é principalmente atribuído às suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas, bem como os resultados positivos obtidos em estudos clínicos quando foi administrado intra-articularmente em caso de uma patologia da cartilagem, como no joelho com OA (Fortier et al., 2011). Mais especificamente, a prova do conceito foi estabelecida e existem evidências científicas substanciais para apoiar os potenciais efeitos do PRP nos defeitos da cartilagem (Smyth et al., 2013). Além disso, o PRP tem várias vantagens para o seguimento do tratamento, pois é facilmente obtido e preparado e está associado a poucas complicações pós-operatórias (Zhu et al., 2013).

Recentemente, as injeções de PRP foram aplicadas intra-articularmente na ATM em pacientes com OA e deslocamento do disco. Apesar da extensa literatura sobre a aplicação de PRP em outras articulações, especialmente na do joelho, sua

aplicação como tratamento na ATM é relativamente nova. Além disso, ainda não está claro se os resultados positivos obtidos no tratamento de características de cartilagem patológica e OA em outras articulações podem ser extrapolados para o manejo de OA-ATM e o deslocamento do disco acompanhado de degeneração de cartilagem (Bousnaki et al., 2017).

Diante do exposto, neste trabalho propõe-se avaliar o processo de reparação em modelo experimental de osteoartrite da articulação temporomandibular de coelhos, com a utilização do PRP associado ao AH em comparação com o AH isolado, método atualmente utilizado. Desta forma, pretende-se potencializar o efeito do AH, adicionando uma propriedade reparadora, proporcionada pelos fatores de crescimento contidos no PRP.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da associação do hidrogel de ácido hialurônico com o plasma rico em plaquetas na regeneração do disco articular e da superfície osteocondral da ATM.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o reparo tecidual e a porcentagem de diferentes tipos de fibras colágenas no disco perfurado após tratamento com AH ou AH associado ao PRP;
- Avaliar a integridade da superfície osteocondral, na presença do disco perfurado, após tratamento com AH ou AH associado ao PRP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matriz de hidrogel de AH

Foi utilizado o hidrogel Hystem® kit (Sigma), descrito a seguir:

Hystem® (Sigma) é uma matriz extracelular sintética composta por AH, colágeno desnaturado, polietileno glicol e água. O ácido hialurônico é gerado a partir de um processo de fermentação bacteriana usando *Bacillus subtilis* (Novozymes) e sem adição de qualquer componente de origem animal. Extralink (polietileno glicol diacrilato - PEGDA) é produzido pela adição de grupos de acrilato a ambas as extremidades do PEG, um polímero derivado do petróleo e de fontes inorgânicas, e não contém materiais de origem animal.

Os componentes do Hystem permanecem no estado líquido de 15 a 37 °C. O hidrogel é formado quando o agente de reticulação (Extralink® -PEGDA) é adicionado a uma mistura de hialuronato-tiol modificado (Glycosil®) e gelatina modificada com tiol (Gelin-S®). A gelificação ocorre em cerca de 20 minutos depois de todos os três componentes serem misturados. Nenhuma etapa depende de baixas temperaturas ou pH baixo. Os componentes são diluídos com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou meio de cultura de células para aumentar o tempo de gelificação se necessário, assim como diminuir a viscosidade.

Para preparar o hidrogel, foram utilizados dois frascos de Hystem, um frasco de extralink e um frasco de água destilada. Em condições assépticas, utilizando uma seringa de 5 mL e agulha 40x12 mm, foi adicionado 1 mL de água para cada frasco de Hystem, que foi posteriormente agitado em posição horizontal no vortex, por 30 min, para dissolver os sólidos. No mesmo momento adicionou-

se 0,5 mL de água no frasco de Extralink, evertendo o frasco várias vezes até homogeneizar a mistura. A seguir, os dois frascos de Hystem foram misturados para se obter 2 mL de solução e nesta foram adicionados 0,5 mL de solução Extralink, mais 1,6 mL de PBS. A gelificação ocorreu em 20 min.

3.2 Animais

O projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal, CEUA/ICT-CSJC-UNESP, sob protocolo nº 09/2015 (ANEXO A). Foram utilizados 40 coelhos machos brancos, da raça Nova Zelândia de peso médio de 2,5 – 3,0 kg, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP de Botucatu – SP, Brasil.

3.2.1 Divisão dos grupos

Os animais foram divididos em 4 grupos, especificados no Quadro 1.

Quadro 1 - Divisão dos grupos por procedimento e período de eutanásia

| Grupos de animais | Procedimento | N | Períodos de eutanásia |
|-------------------|--------------------------|---|-----------------------|
| SL/ST | Sem lesão/sem tratamento | 4 | Tempo zero |
| L/ST | Lesão / sem tratamento | 6 | 8 semanas |
| | | 6 | 24 semanas |
| L/AH | Lesão/hidrogel AH | 6 | 8 semanas |
| | | 6 | 24 semanas |
| L/AH+PRP | Lesão/hidrogel AH + PRP | 6 | 8 semanas |
| | | 6 | 24 semanas |
| Total | | | 40 coelhos |

Legenda: período de eutanásia 8 e 24 semanas após perfuração do disco.

Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.2 Procedimento cirúrgico para lesão do disco articular

Os coelhos foram anestesiados com 20 mg/kg de peso de xilazina (Anasedan) e 4 mg/kg de cloridrato de ketamina de sódio (Dopalen). A área pré-auricular foi raspada e infiltrada com 1 ml de cloridrato de articaína (Ultracaine DS, Sanofi Aventis). A técnica cirúrgica foi adotada seguindo o estudo de Takafuji et al. (2007).

Uma incisão na pele oblíqua e acima do processo zigomático foi feita, partindo do canto lateral do olho chegando até o meato acústico externo. Após a dissecação dos tecidos moles, o processo zigomático e a sutura zigomática que recobrem a ATM foram expostos e o processo zigomático foi então cuidadosamente removido.

Após exposição do espaço articular superior, a fim de localizar o disco, o mesmo foi retraído posteriormente com uma pinça, e um elevador periosteal foi colocado sob o disco para proteger o côndilo. A perfuração foi realizada com um *micropunch* para biópsia (Miltex) de 2 mm, na parte lateral do disco da ATM e

posteriormente este foi reposicionado ao local anatômico normal (Embree et al., 2015).

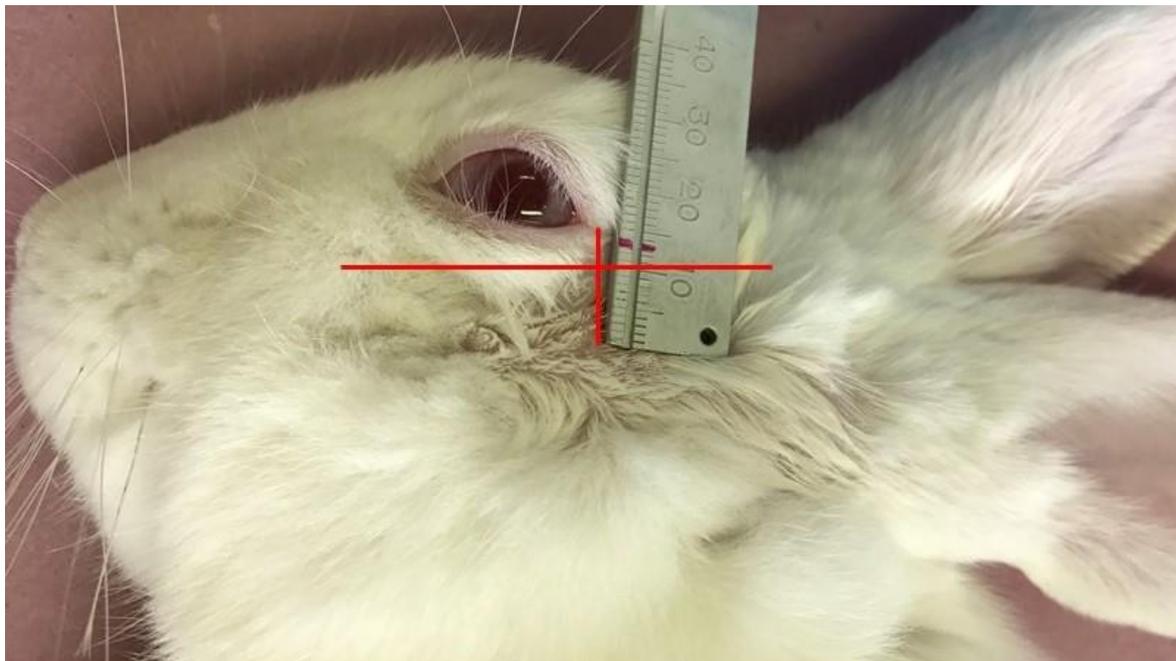
Todos os animais receberam uma dose única de 1,35 mg/Kg de peso de antibiótico (Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge) por via intramuscular no pré-operatório. Uma dose diária de 0,3 mg/kg de peso de Meloxicam por via subcutânea foi administrada para analgesia pós-operatória por quatro dias. Todos os animais foram devolvidos a suas gaiolas sem restrição de movimentação e alimentação, após o procedimento cirúrgico na ATM.

3.3 Tratamento da ATM

Após anestesia como descrito acima, foi realizada a punção da veia marginal da orelha para obtenção de 10 mL de sangue, utilizando uma seringa contendo 1 mL de heparina para prevenir a coagulação. Para a obtenção do PRP, a mistura do sangue anticoagulado foi colocada no kit de separação de plaquetas (Colheita SmartPrep, Plymouth, MA) e, em conformidade com as instruções do sistema, foi centrifugado durante 14 minutos. Após centrifugação, o PRP foi recolhido a partir do sobrenadante. O PRP foi misturado com o hidrogel de AH na proporção de 1:1.

A punção para infiltração do hidrogel foi padronizada utilizando como referência uma linha horizontal tangencial ao ponto mais convexo do rebordo infra-orbitário e uma linha vertical perpendicular à linha horizontal, partindo do canto lateral do olho, 13 mm abaixo (Figura 2).

Figura 2 - Parâmetro utilizado para infiltração do hidrogel na ATM



Legenda: Linha horizontal passando por um ponto do rebordo infraorbitário e outra linha perpendicular à linha infraorbitária partindo do canto lateral do olho, seguindo pela marcação de um ponto 13 mm em direção ao processo zigomático.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 4 semanas da perfuração dos discos, os animais dos grupos L/AH e L/AH+PRP receberam uma única infiltração, em ambas cavidades articulares, de 0,1 mL de hidrogel de AH e a mistura de AH e PRP, respectivamente (Figura 3).

Figura 3 - Infiltração da ATM



Legenda: infiltração com 0,1 mL de hidrogel utilizando o parâmetro pré-determinado (Figura 4).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Eutanásia

Os quatro coelhos do grupo SL/ST foram eutanasiados no tempo zero, e 6 dos grupos L/ST, L/AH e L/AH+PRP foram eutanasiados após os períodos de 8 e 24 semanas, utilizando uma injeção intramuscular e intracardíaca com Anasedan/Dopalen.

3.5 Processamento para análise macroscópica, radiográfica, histológica, histoquímica e imuno-histoquímica do disco articular e do côndilo mandibular

O disco e o côndilo foram dissecados, fixados em solução de formol a 10%, e fotografados utilizando um estereomicroscópio (Zeis - Stemi 2000C) para análise macroscópica.

Posteriormente, os discos foram radiografados. O posicionamento do disco, a distância e a angulação do cone do equipamento de RX foram padronizados utilizando o mesmo posicionador de películas de RX. Padronizou-se também o tempo de exposição do Rx (15 segundos) e o tempo de revelação (20 segundos).

Para estudo histológico, histoquímico e imuno-histoquímico, o côndilo foi previamente desmineralizado em EDTA a 5%. Após desmineralização as peças foram submetidas aos seguintes processos: lavagem em água; desidratação em soluções crescentes de etanol; diafanização em xilol; embebição em parafina (Paraplastic) a 60°C e em seguida, inclusão em parafina líquida. Os blocos de parafina com o material incluído foram deixados em repouso durante 24 horas em temperatura ambiente para a solidificação dos mesmos.

A partir dos blocos de parafina, os cortes histológicos foram obtidos utilizando o micrótomo Leica® RM2255. Foram realizados cortes de 5 µm para coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius, para realização da análise histológica e histoquímica. Após coloração, as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico (Zeiss-Axiophot ®). As imagens em *picrosirius red* foram analisadas utilizando o *Las Phase expert software* (Leica), para avaliação da maturidade das fibras colágena.

Para as reações de imuno-histoquímica, cortes de 3 µm foram obtidos e incubados (solução de citrato em banho de maria) com os anticorpos primários contra colágeno I (Clone 1 COL, MA126771, Invitrogen), na diluição de 1:500 e

colágeno II (Colone 6B3, MA513026, Invitrogen) na diluição de 1:50 durante uma noite a 4°C, seguido pela incubação com o anticorpo secundário polímero/peroxidase, utilizando DAB como cromógeno (EnVision™-Dako).

O controle positivo foi utilizado como indicado pelo fabricante e o controle negativo foi feito pela substituição do anticorpo primário pelo diluente do anticorpo. Todas as secções foram contracoradas com hematoxilina e observadas em microscópio de luz (Zeiss- Axiophot®).

3.6 Forma de análise do disco e côndilo mandibular

3.6.1 Análise macroscópica

As peças foram caracterizadas, considerando: coloração, formato e aspecto da superfície.

3.6.2 Análise radiográfica do disco articular

Foram avaliados os aspectos radiográficos dos discos articulares, bem como a presença de possíveis áreas de calcificação.

3.6.3 Análise histológica

No exame histológico das secções do disco e da superfície osteocondral do côndilo corados por HE foram avaliados os seguintes aspectos:

- Estado de organização do tecido: orientação das células e das fibras colágenas, presença ou ausência de resposta inflamatória;
- Coloração da matriz, arranjo das células, regularidade da superfície, espessamento da fibrocartilagem e fibras colágenas foram avaliados qualitativamente.

3.6.4 Análise Histoquímica

A análise quantitativa das fibras colágenas foi realizada no material corado por *Picrosirius Red*, por meio do programa *Las Phase expert software* (Leica).

3.6.5 Análise Imuno-histoquímica

Na análise imuno-histoquímica foi avaliada a marcação positiva com os anticorpos primários anti-colágeno I e II, por médio do software *Las Phase expert software* - Leica.

3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos das análises geradas a partir do *software Las Phase expert software* (Leica) foram submetidos à análise estatística descritiva e

inferencial utilizando o programa estatístico Minitab versão 18.0. A normalidade de distribuição das amostras foi verificada pelo teste de Anderson Darling. A comparação entre os grupos foi feita utilizando a análise de variância (ANOVA) 2 fatores adotando o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise macroscópica

4.1.1 Análise macroscópica dos discos articulares

Macroscopicamente o disco da ATM normal (grupo SL) apresenta forma ovalada e bicôncava, consistência flexível, superfície lisa, cor esbranquiçada, com perímetro médio de 15 mm (Figura 4A).

O disco de ATM após 8 semanas da perfuração apresentou irregularidades na superfície próxima à perfuração em todos os espécimes e uma redução do tamanho do defeito em 2 de 6 espécimes (Figura 4B).

Após 24 semanas da perfuração sem tratamento, o disco de ATM apresentou neoformação tecidual parcial na área da perfuração e algumas irregularidades contornando a superfície da mesma em 3 de 6 espécimes (Figura 4C).

Após 8 semanas do tratamento da ATM com AH, foi possível observar uma formação parcial de tecido na área perfurada e a superfície que contorna a perfuração apresentou-se lisa em 3 de 6 espécimes (Figura 4D), preenchimento total em 1 de 6 espécimes e sem preenchimento 2 de 6 espécimes.

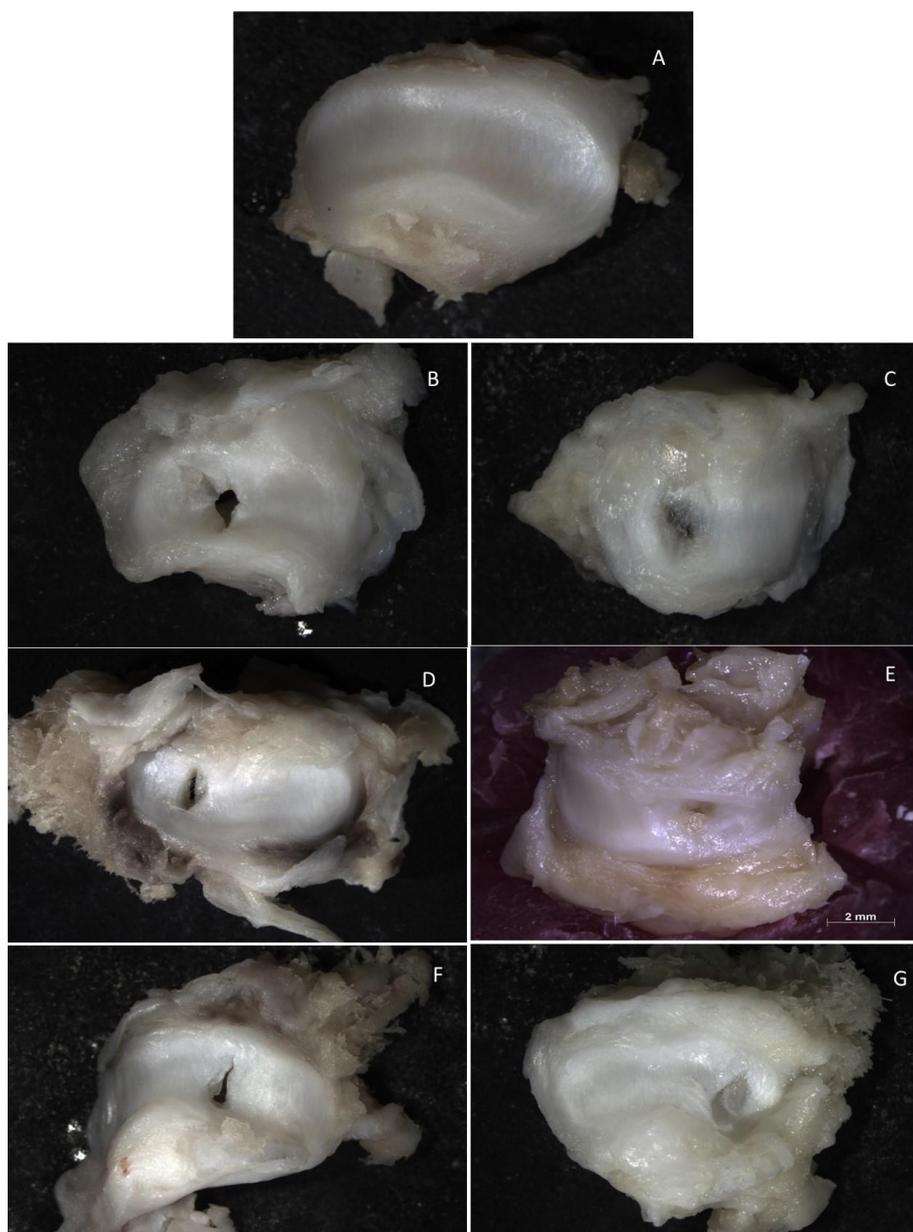
Após 24 semanas da perfuração, com tratamento com AH, observou-se em 4 de 6 espécimes, preenchimento parcial na área da perfuração por um tecido discretamente rugoso e de coloração amarelada. Em volta da perfuração o tecido apresentava ora uma superfície lisa ora irregular. Também foi possível observar

que o defeito em 2 dos 6 espécimes estava preenchido em sua totalidade (Figura 4E).

Após 8 semanas da perfuração e tratamento com AH+PRP, observou-se um tecido esbranquiçado semelhante ao restante do disco preenchendo parcialmente a área da perfuração em 4 dos 6 espécimes. A superfície em volta da perfuração era lisa (Figura 4F). Dois dos 6 espécimes não apresentaram sinal de reparação.

Após 24 semanas da perfuração e tratamento com AH+PRP observou-se um tecido esbranquiçado semelhante ao restante do disco preenchendo parcialmente a área da perfuração em 5 dos 6 espécimes. O defeito estava preenchido totalmente e em 1 dos 6 espécimes e a superfície em volta da perfuração era lisa em todos os discos (Figura 4G).

Figura 4 - Análise macroscópica do disco articular



Legenda: Disco de ATM: A) normal: cor esbranquiçada, superfície lisa e formato ovalado; B) L/ST 8 semanas: área de perfuração com 2mm de diâmetro e irregularidade ao redor; C) L/ST 24 semanas: perfuração parcialmente preenchida; D) L/AH 8 semanas: perfuração parcialmente preenchida por tecido semelhante ao restante do disco; E) L/AH 24 semanas: perfuração parcialmente preenchida; F) L/PRP+AH 8 semanas: perfuração parcialmente preenchida por tecido semelhante ao restante do disco; G) L/ PRP+AH 24 semanas: perfuração preenchida por tecido semelhante ao restante do disco.

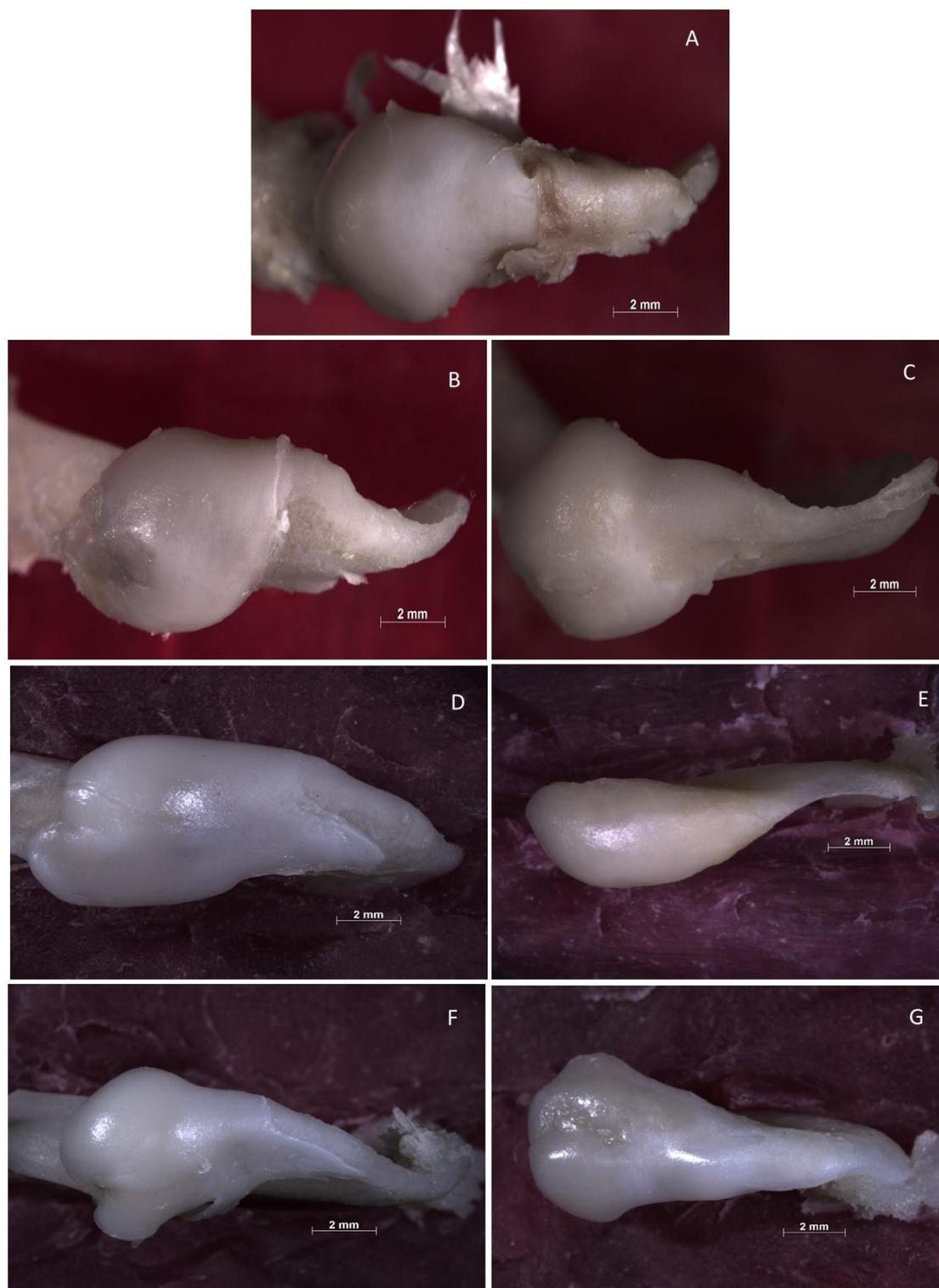
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Análise macroscópica dos côndilos mandibulares

A superfície osteocondral do côndilo mandibular normal apresentou-se um formato triangular de base arredondada, superfície lisa, cor esbranquiçada, medindo 13 mm no eixo anteroposterior, 7 mm de largura na porção mais anterior e 2 mm de largura na porção mais posterior (Figura 5A).

Após 8 semanas da perfuração do disco, sem tratamento (L/ST), a superfície osteocondral apresentou uma irregularidade em 5 dos 6 espécimes (Figura 5B), assim como também foi observado nos grupos L/ST e L/AH+PRP após 24 semanas (Figura 5C e 5D). Nos grupos L/AH (24 semanas) e L/AH+PRP (8 semanas) 3 de 6 espécimes apresentaram irregularidade na superfície osteocondral (Figuras 5D e 5E). No grupo L/AH (8 semanas) 4 dos 6 espécimes apresentaram irregularidade na superfície osteocondral.

Figura 5 - Análise macroscópica dos cêndilos mandibulares



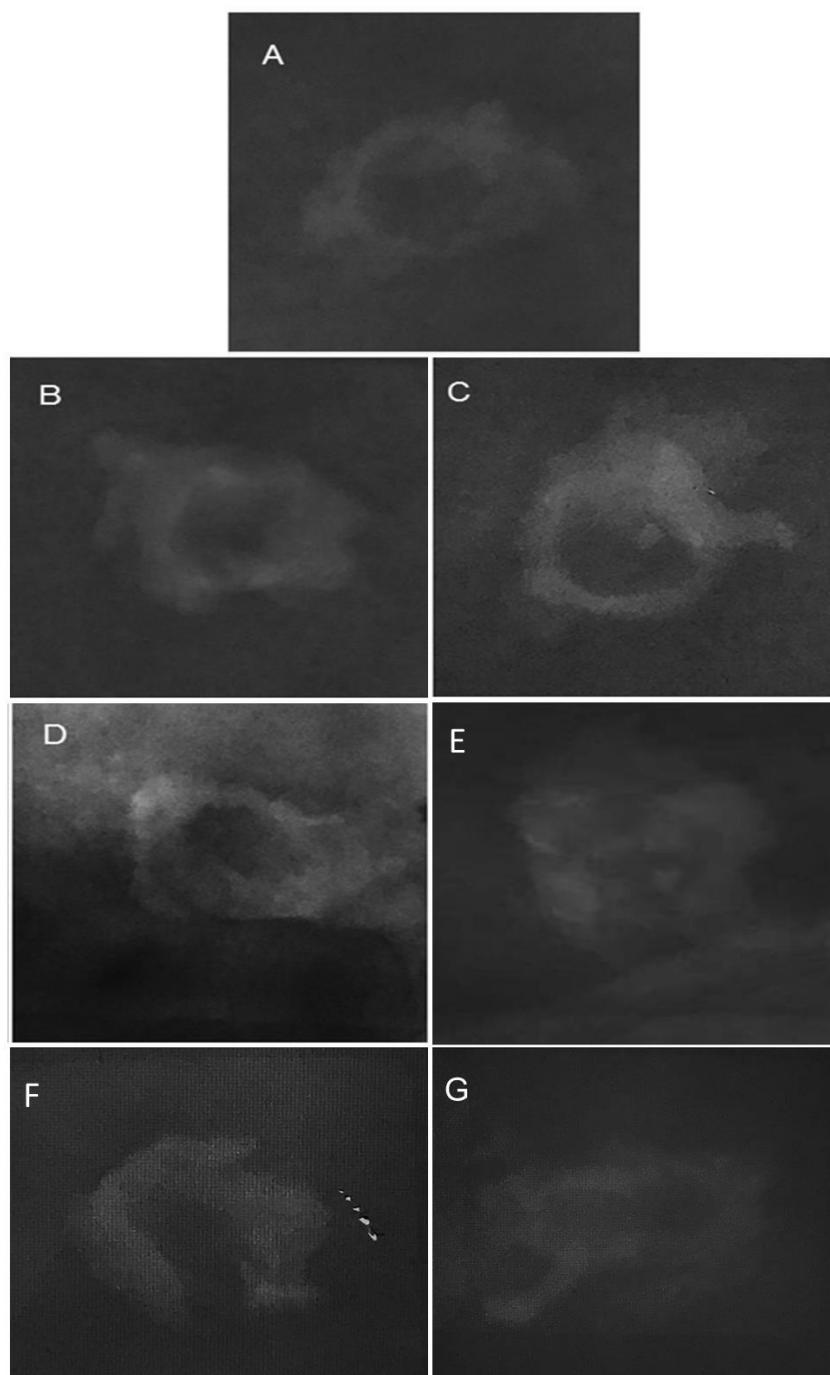
Legenda: A) ATM normal; B) Perfuração sem tratamento após 8 semanas; C) Perfuração sem tratamento após 24 semanas; D) Perfuração tratada com HA após 8 semanas; E) Perfuração tratada com HA após 24 semanas; F) Perfuração tratada com PRP + HA após 8 semanas; G) Perfuração tratada com PRP + HA após 24 semanas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Análise radiográfica dos discos

O disco da ATM normal (grupo SL), apresentou uma área com discreta radiopacidade que circunda uma região central mais radiolúcida (Figura 6A). Os discos após 8 semanas da perfuração sem tratamento (L/ST) não apresentaram radiopacidade na zona central do disco (Figura 6B). No grupo após 24 semanas da perfuração sem tratamento (L/ST) 4 de 6 discos apresentaram radiopacidade na zona central (Figura 6C). No grupo que foi tratado com AH (L/AH), nenhum dos discos apresentou radiopacidade após 4 semanas do tratamento (Figura 6D). No grupo tratado com AH após 24 semanas, 2 espécimes apresentaram área de radiopacidade central. No grupo tratado com PRP+AH (L/AH+PRP) 2 discos após 8 semanas e 3 após 24 semanas apresentaram área de radiopacidade central (Figura 6E e 6F) (Quadro 2).

Figura 6 - Radiografia dos discos de ATM



Legenda: A) disco de ATM normal com área radiolúcida central a uma área de radiopacidade tênue; B) disco de ATM após 8 semanas da perfuração sem evidencia de radiopacidade central; C) disco após 24 semanas da perfuração apresentando foco de radiopacidade na área radiolúcida; D) disco após 8 semanas do tratamento com AH sem sinal de radiopacidade na área central; E) Disco após 24 semanas do tratamento com AH apresentando radiopacidade central; F) Tratamento com AH+PRP após 8 semanas. G) AH+PRP após 24 semanas do tratamento sem evidencia de radiopacidade.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 2 - Resultados da análise radiográfica do disco articular normal, após perfuração e após tratamento com AH e AH associado ao PRP

| Disco | SL/ST | L/ST 8S | L/ST 24S | L/AH 8S | L/AH 24S | L/AH+PRP 8S | L/AH+PRP 24S |
|-------|------------|---------|----------|---------|----------|-------------|--------------|
| 1 | Não | Não | Não | Não | Sim | Não | Sim |
| 2 | Não | Não | Não | Não | Nao | sim | Não |
| 3 | Não | Não | Sim | Não | Não | Não | Sim |
| 4 | Não | Não | Sim | Não | Não | Sim | Sim |
| 5 | ----- - | Não | Sim | Não | sim | Não | Não |
| 6 | ----- - | Nao | Sim | Não | * | Não | Não |

Legenda: (sim): com radiopacidade no centro do disco; (não): sem radiopacidade no centro do disco

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Análise histológica do cômulo e do disco articular

4.3.1 Análise histológica do cômulo mandibular

Foram observadas quatro zonas na superfície osteocondral: fibrosa, proliferativa, madura e hipertrófica.

A zona fibrosa era formada por tecido conjuntivo denso, avascular, com feixes de fibras colágenas orientados paralelamente à superfície articular, entremeados por fibroblastos. A zona proliferativa, que separava a zona fibrosa da madura, mostrou-se rica em células de aspecto mesenquimal e apresenta poucas fibras colágenas. A zona subjacente, madura, era formada por cartilagem hialina, contendo condrócitos maduros. A zona hipertrófica era formada por condrócitos hipertróficos dispostos de forma não organizada. Subjacente a estas camadas, observou-se zona de ossificação endocondral que se continuava com o tecido ósseo esponjoso, o qual apresentava trabéculas lamelares delimitando espaços medulares (Figura 7A).

Nos cõndilos dos animais em que foi feita apenas a perfuração do disco (L/ST), após 8 semanas, observaram-se regiões de invaginação da superfície osteocondral, associadas com fibrose e desorganização das camadas. Em alguns cõndilos, observou-se também atrofia, principalmente das camadas fibrosa e proliferativa (Figura 7B).

Após 24 semanas da perfuração sem tratamento (L/ST), observaram-se ainda algumas áreas de desorganização e atrofia das camadas. Por vezes, encontrava-se espessamento da camada superficial fibrosa e ausência da camada proliferativa (Figura 7C).

O Cõndilo de ATM após 8 semanas da perfuração do disco e tratamento com AH (L/AH) apresentou irregularidade na superfície, perda da camada proliferativa e atrofia da camada condrogênica (Figura 7D).

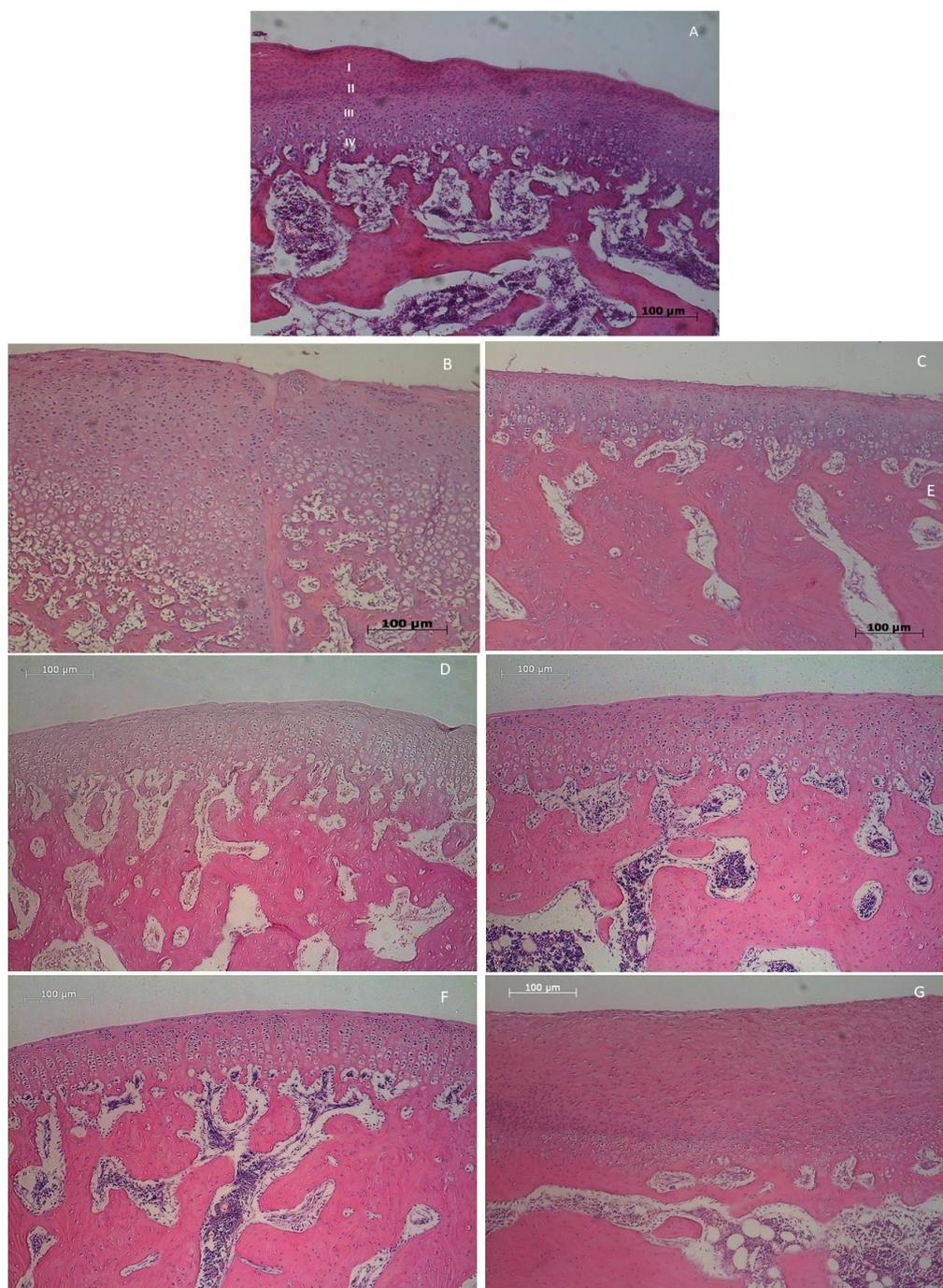
Após 24 semanas da perfuração do disco e tratamento com AH (L/AH), o cõndilo de ATM apresentou irregularidade na superfície, desorganização das camadas, perda da camada proliferativa e atrofia das demais zonas (Figura 7E).

O Cõndilo de ATM após 8 semanas da perfuração do disco e tratamento com PRP + AH (L/AH+PRP) apresentou atrofia da camada fibrosa, perda da camada proliferativa e atrofia das demais camadas (Figura 7F).

Após 24 semanas da perfuração do disco e tratamento com PRP + AH o cõndilo de ATM apresentou hipertrofia da camada fibrosa em alguns espécimes e atrofia das camadas madura e hipertrófica (Figura 7G).

Não foram observadas células inflamatórias em nenhum dos grupos e períodos avaliados.

Figura 7 - Análise histológica dos cêndilos



Legenda: Cêndilo mandibular: (A) com aspecto normal: I. zona articular ou fibrosa, II. zona proliferativa, III. zona madura ou condrogênica e IV. zona hipertrófica recobrendo o osso trabecular; (B) L/ST 4 semanas: fibrose e desorganização das camadas; (C) L/ST 24 semanas: perda da camada proliferativa e atrofia das demais camadas; (D e E) L/AH 8 e 24 semanas: perda da camada proliferativa e atrofia da camada condrogênica; (F) L/PRP 8 semanas: perda da camada fibrosa e proliferativa e atrofia da demais camadas; (G) L/AH+PRP 24 semanas: hipertrofia da camada fibrosa e atrofia das camadas madura e hipertrófica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Análise histológica do disco articular

O disco de ATM normal, na região entre a banda anterior e intermediária é constituído por tecido conjuntivo denso, avascular com feixes espessos de fibras colágenas, orientados ao acaso, entremeados por células arredondas, semelhantes a condrócitos, distribuídas de forma homogênea (Figura 8A).

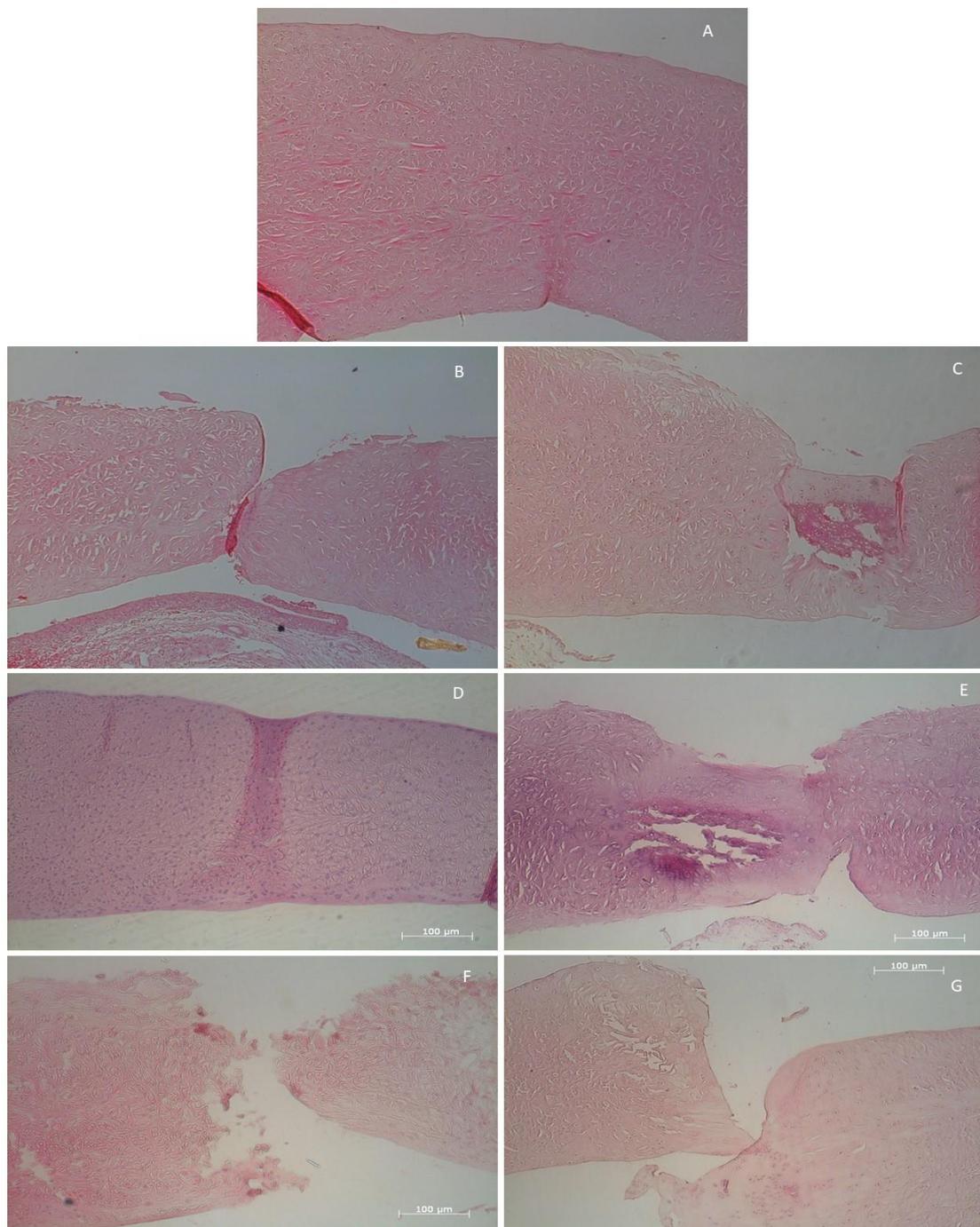
Após 8 semanas da perfuração sem tratamento (L/ST), o disco articular apresentou, próximo às bordas da perfuração, tecido conjuntivo mais denso, hialinizado e pouco celularizado. Por vezes, observaram-se células fusiformes, de aspecto fibroblástico junto à margem da perfuração (Figura 8B).

Após 24 semanas, na maioria dos discos, independentemente do grupo, observou-se, na área da perfuração e, por vezes, próximo à mesma, uma matriz mais densa que o restante do disco, hialinizada e contendo numerosas células semelhantes a condrócitos (Figura 8G). Nesta matriz, observou-se também calcificação (Figura 8C e 8E).

No disco após 8 semanas da perfuração e tratamento com AH (L/AH), observou-se feixes colágenos delicados entremeados por numerosas células de núcleo arredondado (Figura 8D).

Na Figura 8F, observa-se o disco após 8 semanas da perfuração e tratamento com AH+PRP (L/AH+PRP) apresentando, na área de perfuração, feixes colágenos hialinizados.

Figura 8 - Análise histológica do disco articular



Legenda: Disco de ATM na área da perfuração: A) normal: Banda anterior e intermediária formadas por tecido conjuntivo fibroso, entremeado por células semelhantes a condrócitos; B) L/ST 8 semanas: tecido conjuntivo denso, hialinizado e pouco celularizado nas bordas da perfuração; C) L/ST 24 semanas: tecido conjuntivo denso e hialinizado com calcificação; D) L/AH 8 semanas: feixes colágenos delicados e numerosas células de núcleo arredondado; E) L/AH 24 semanas: tecido conjuntivo denso e hialinizado com calcificação; F e G) L/PRP+AH 8 e 24 semanas: feixes colágenos hialinizados.

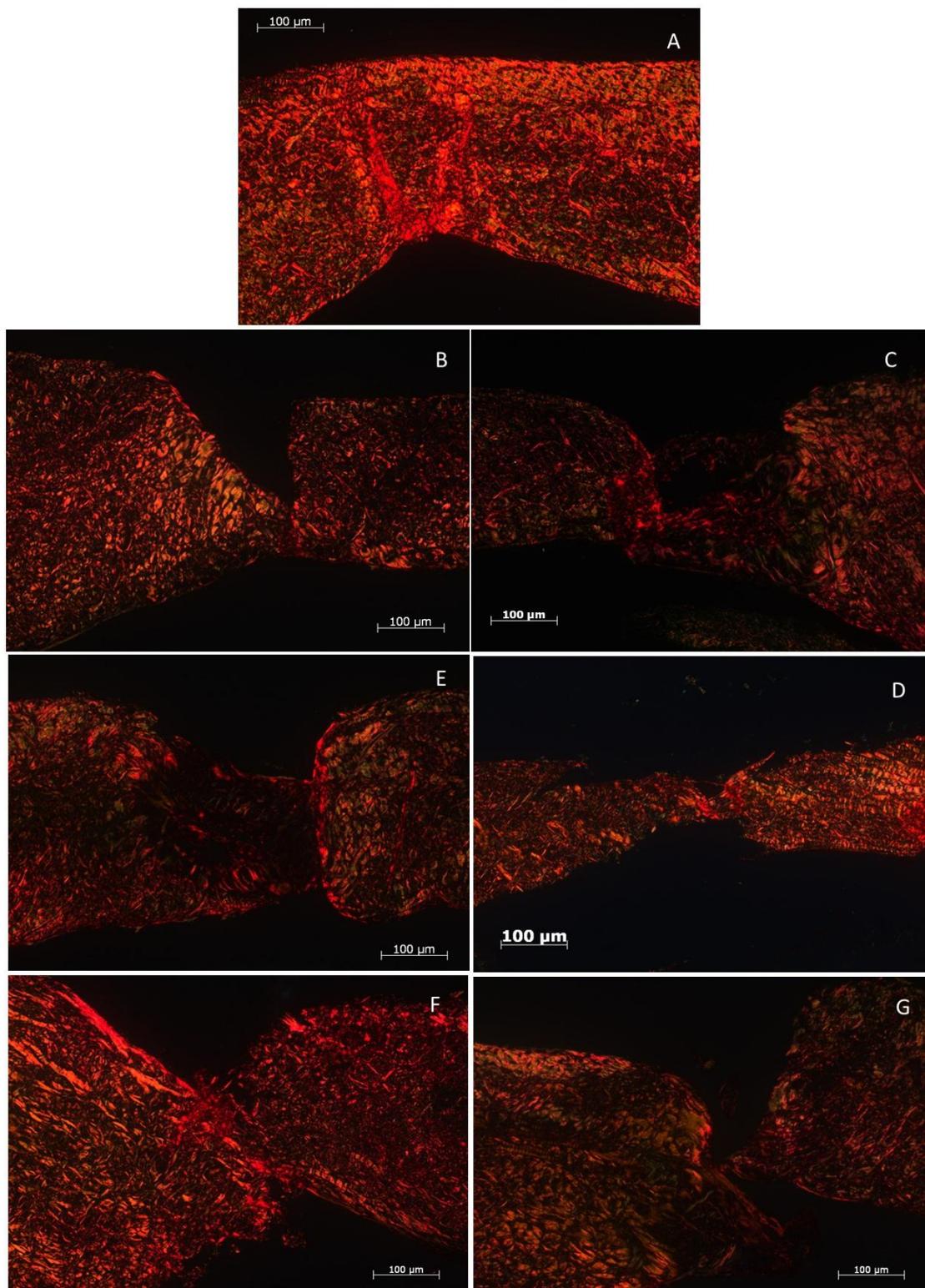
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Análise histoquímica do cômulo e do disco articular

4.4.1 Análise das fibras colágenas

Na análise das fibras colágenas do disco da ATM por *Picrosirius Red*, foram observadas fibras colágenas do tipo I coradas em vermelho e fibras colágenas do tipo III coradas em verde (Figura 9). Utilizando o software *Las Phase Expert – Leica* foi observado que a média da porcentagem do colágeno I (vermelho) prevalece em relação ao colágeno III (verde) independentemente do grupo e do período avaliado e sem diferença estatística significativa (Tabela 1 e 2). Porém, é possível observar que o grupo SL/ST e o grupo L/PRP+AH após 8 semanas, apresentaram porcentagens de colágeno I próximas (Figura 10).

Figura 9 - Pannel do disco de ATM dos diferentes grupos em *Picrosirius red*



Legenda: Imagens representativas dos discos de ATM corados por *Picrosirius red* e visualizados sob luz polarizada: A) SL/ST; B) L/ST 8 semanas; C) L/ST 24 semanas; D) L/AH 8 semanas; E) L/AH 24 semanas; F) L/PRP + AH 8 semanas; G) L/PRP + AH 24 semanas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Análise de variância ANOVA dois fatores do disco da ATM para o colágeno I (vermelho)

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-----------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Período | 1 | 0,04753 | 0,047533 | 1,75 | 0,194 |
| Grupos | 3 | 0,21725 | 0,072417 | 2,67 | 0,063 |
| Erro | 35 | 0,94967 | 0,027134 | | |
| Falta de ajuste | 3 | 0,00671 | 0,002236 | 0,08 | 0,973 |
| Erro puro | 32 | 0,94296 | 0,029468 | * | * |
| Total | 39 | 1,21446 | | | |

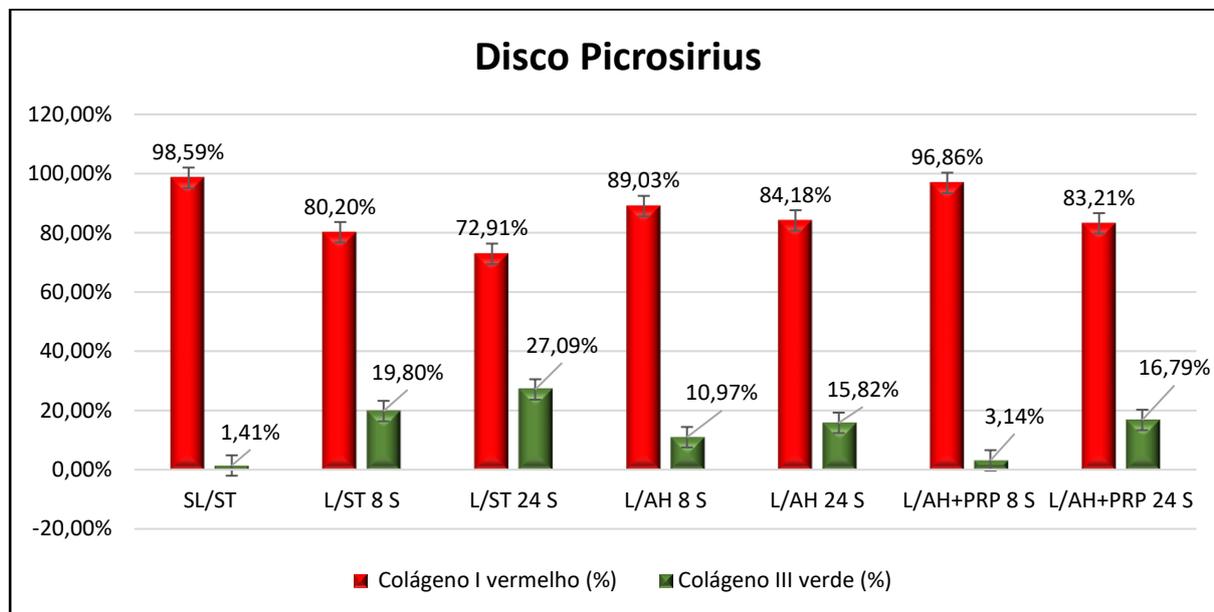
Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Análise de variância ANOVA dois fatores do disco de ATM para o colágeno III (verde)

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-----------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Periodo | 1 | 0,06731 | 0,067306 | 2,28 | 0,140 |
| Grupos | 3 | 0,19240 | 0,064132 | 2,17 | 0,109 |
| Erro | 35 | 1,03297 | 0,029513 | | |
| Falta de ajuste | 3 | 0,01697 | 0,005657 | 0,18 | 0,910 |
| Erro puro | 32 | 1,01599 | 0,031750 | * | * |
| Total | 39 | 1,29267 | | | |

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

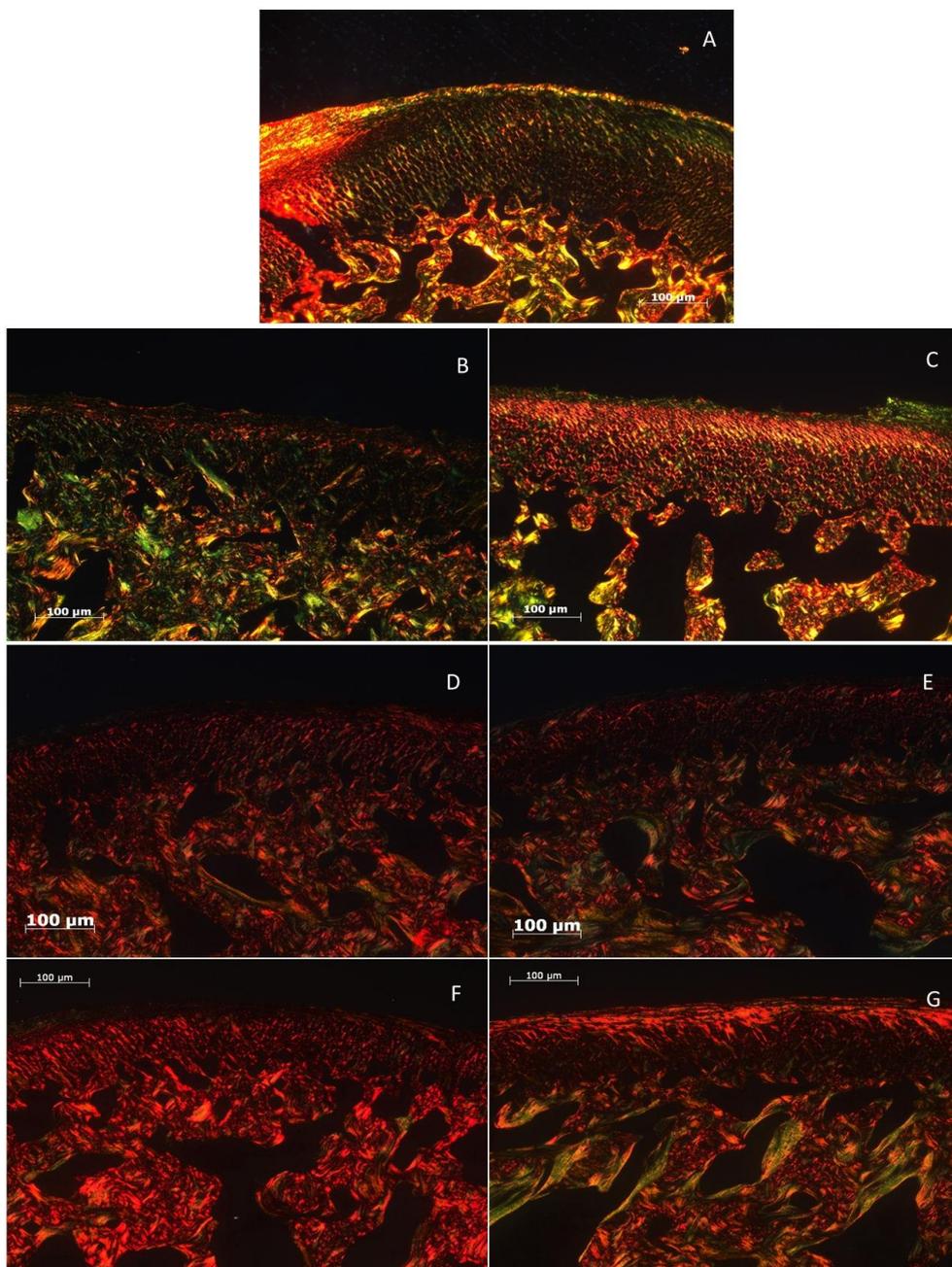
Figura 10 - Gráfico da porcentagem das medias do colágeno I e III obtidas através da análise em *Picrosirius red* no *Las Phase Expert – Leica* do disco da ATM dos diferentes grupos



Fonte: Elaborada pelo autor

Na análise das fibras colágenas do côndilo mandibular por *Picrosirius Red*, foram observadas fibras do tipo I coradas em vermelho e do tipo III coradas em verde (Figura 11). Utilizando o software *Las Phase Expert – Leica*, foi observado que a média da porcentagem do colágeno I (vermelho) prevalece em relação ao colágeno III (verde) independentemente do grupo e do período avaliado (Figura 12). Os grupos L/AH e L/AH+PRP, nos períodos de 8 e 24 semanas, apresentaram porcentagem de colágeno I significativamente maior que o grupo L/ST ($p < 0,05$) (Tabela 3 e Tabela 4). Quanto à porcentagem do colágeno III, o grupo L/ST foi diferente dos grupos L/AH e L/AH+PRP, independentemente do período avaliado (Tabela 5 e 6). A maior porcentagem de colágeno III foi observada no grupo L/ST e a menor no grupo L/AH (Tabela 5 e 6)

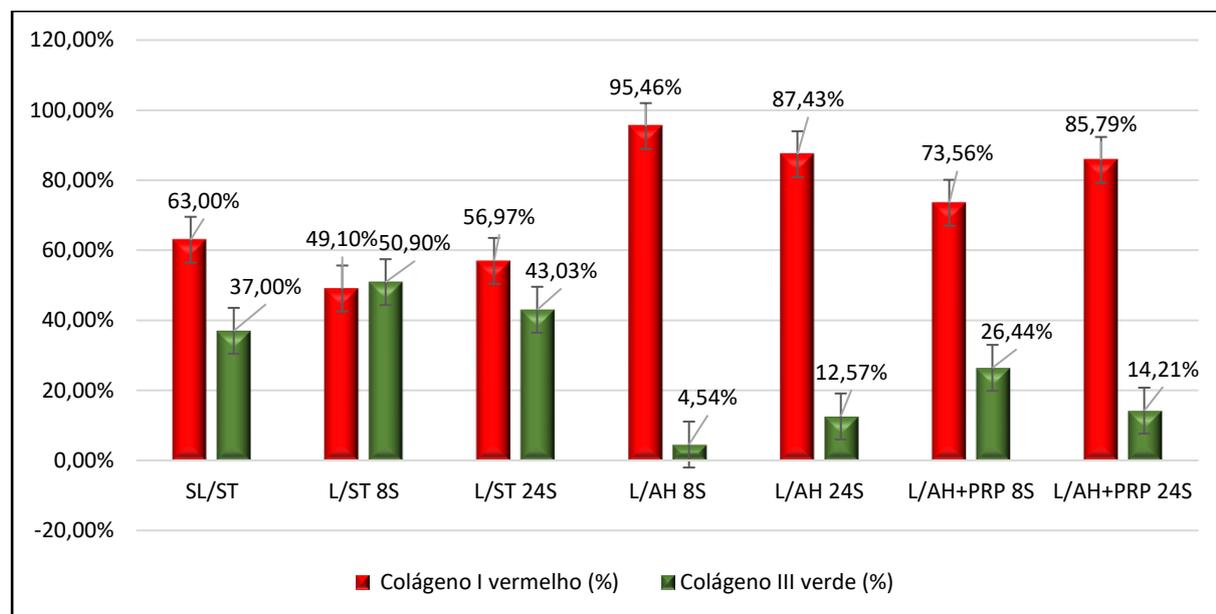
Figura 11 - Painel do cndilo da mandíbula dos diferentes grupos em *Picrosirius red*



Legenda: Imagens representativas do corte sagital dos cndilos da mandíbula em *Picrosirius red* visualizado na polarização, dos diferentes grupos analisados no *Las Phase Expert – Leica*: A) Cndilo de ATM normal; B) Cndilo de ATM após 8 semanas da perfuração sem tratamento; C) Cndilo de ATM após 24 semanas da perfuração sem tratamento; D) Cndilo de ATM após 8 semanas do tratamento com AH; E) Cndilo de ATM após 24 semanas do tratamento com AH; F) Cndilo de ATM após 8 semanas do tratamento com PRP + AH; G) Cndilo de ATM após 24 semanas do tratamento com PRP + AH.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Gráfico da porcentagem das medias do colágeno I e III obtidas através da análise em *Picrosirius red* no *Las Phase Expert – Leica* do cõndilo mandibular dos diferentes grupos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Análise de variância ANOVA dois fatores do cõndilo da mandíbula para o colágeno I (vermelho)

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|---------|----|----------|----------|---------|---------|
| Periodo | 1 | 0,06448 | 0,06448 | 1,85 | 0,182 |
| Grupos | 3 | 0,92756 | 0,30919 | 8,89 | *0,000 |
| Erro | 35 | 1,21673 | 0,03476 | | |
| Total | 39 | 2,20877 | | | |

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias; (*): diferença significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Análise comparativa múltipla de Tukey do côndilo da mandíbula para colágeno I (vermelho)

| Grupos | N | Medía | Agrupamento | |
|----------|----|----------|-------------|---|
| L/AH | 12 | 0,904567 | A | |
| L/AH+PRP | 12 | 0,796751 | A | |
| SL/ST | 4 | 0,630003 | A | B |
| L/ST | 12 | 0,532349 | B | |

Legenda: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Análise de variância ANOVA dois fatores do côndilo da mandíbula para o colágeno III (verde)

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|---------|----|----------|----------|---------|---------|
| Periodo | 1 | 0,06448 | 0,06448 | 1,85 | 0,182 |
| Grupos | 3 | 0,92754 | 0,30918 | 8,89 | 0,000 |
| Erro | 35 | 1,21675 | 0,03476 | | |
| Total | 39 | 2,20877 | | | |

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias; (*): diferença significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6 - Análise comparativa múltipla de Tukey do côndilo da mandíbula para colágeno III (verde)

| Grupos | N | Média | Agrupamento | |
|----------|----|----------|-------------|---|
| L/ST | 12 | 0,467651 | A | |
| SL/ST | 4 | 0,369997 | A | B |
| L/AH+PRP | 12 | 0,203249 | B | |
| L/AH | 12 | 0,095437 | B | |

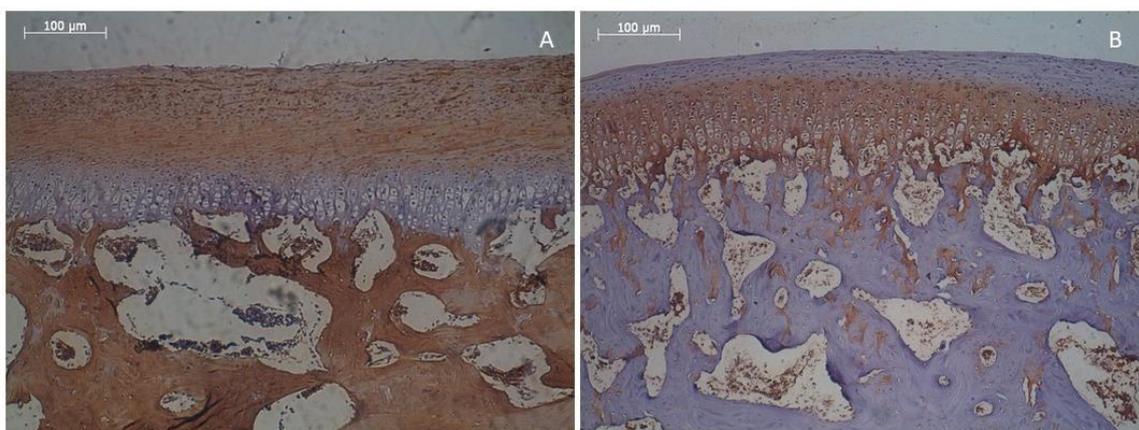
Legenda: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Análise de Imuno-histoquímica

Na análise descritiva da expressão de colágeno I e II, foi observado que na superfície osteocondral do côndilo mandibular em todos os grupos, o colágeno tipo I foi expresso em todas as camadas fibrosa, proliferativa e madura (Figura 17 A) e o colágeno tipo II foi expressado principalmente na zona hipertrófica (Figura 17B).

Figura 13 - Expressão imuno-histoquímica de Colágeno I e II no côndilo mandibular

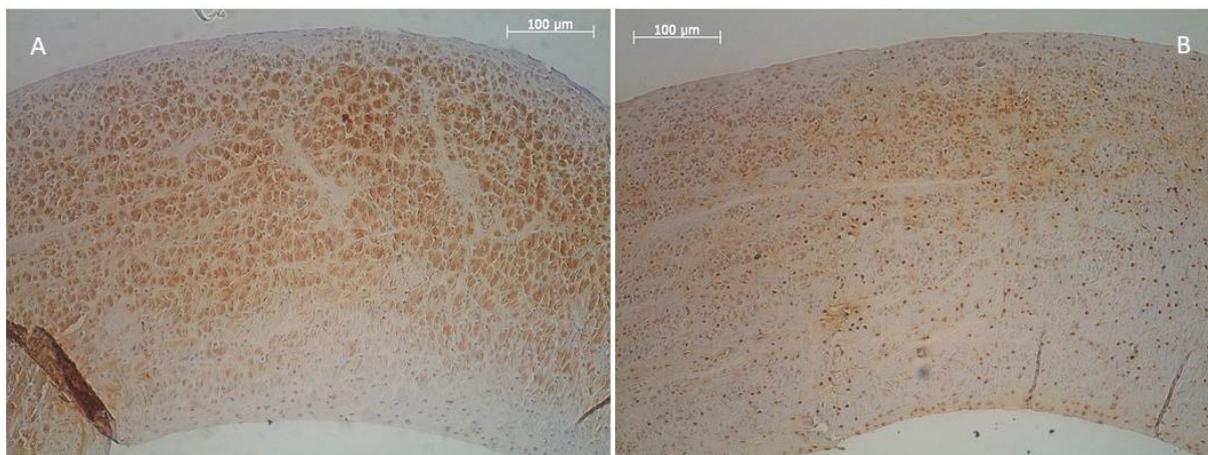


Legenda: imagem representativa da expressão do anti-colágeno I e II do côndilo mandibular. A) Colágeno I expresso na camada fibrosa e proliferativa da superfície osteocondral; B) Colágeno II expresso na zona madura e hipertrófica da superfície osteocondral.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No disco, o colágeno de tipo I foi evidenciado nos feixes de fibras colágenas no interior do tecido (Figura 14). O colágeno tipo II foi expresso no núcleo e em torno de grupos de células de aspecto condroide dispersas por todo o disco.

Figura 14 - Expressão imuno-histoquímica de colágeno I e II no disco articular



Legenda: imagem representativa da expressão do anti-colágeno I e II do disco articular. A) Colágeno I expresso nas fibrilas colágenas; B) Colágeno II expresso no núcleo e em torno de células de aspecto condroide.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As marcações do colágeno I e colágeno II na área da perfuração do disco da ATM, tanto nos grupos não tratados quanto nos tratados, não apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 7 e 8, Figura 15).

Tabela 7 - Análise de variância ANOVA dois fatores do disco da ATM para marcação do colágeno I

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|---------|----|----------|----------|---------|---------|
| Grupos | 4 | 0,33930 | 0,08482 | 0,99 | 0,425 |
| Periodo | 1 | 0,02834 | 0,02834 | 0,33 | 0,569 |
| Erro | 32 | 2,73188 | 0,08537 | | |
| Total | 37 | 3,07147 | | | |

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias.

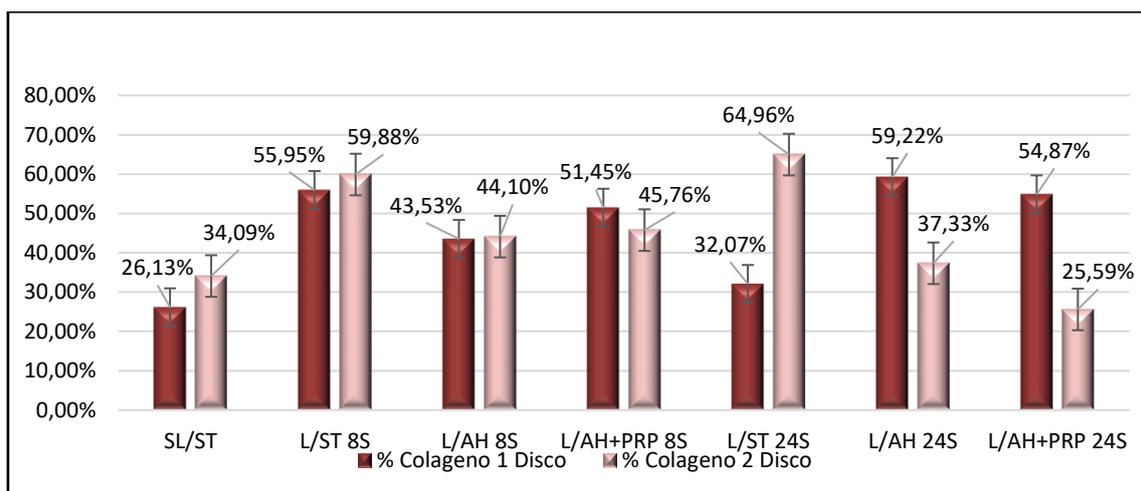
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8 - Análise de variância ANOVA dois fatores do disco da ATM para a expressão do colágeno II

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|---------|----|----------|----------|---------|---------|
| Grupos | 6 | 0,63532 | 0,10589 | 2,18 | 0,071 |
| Período | 1 | 0,01092 | 0,01092 | 0,22 | 0,639 |
| Erro | 32 | 1,55511 | 0,04860 | | |
| Total | 39 | 2,24915 | | | |

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15 - Gráfico das medias de porcentagens de marcação para colágeno I e II no disco da ATM na área da perfuração



Fonte: Elaborada pelo autor.

A porcentagem da expressão do colágeno I no cômulo, na área correspondente à perfuração do disco, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos e os períodos (Tabela 9). Para destacar onde houve diferença, o teste de comparação múltipla de Tukey foi realizado (Tabela 10). O grupo L/AH+PRP de 24 semanas apresentou maior porcentagem de marcação que era diferente dos

grupos SL/ST e L/ST, porém sem diferença estatística com relação ao L/AH (Tabela 10).

Tabela 9 - Análise de variância ANOVA dois fatores do côndilo mandibular para a expressão do colágeno I

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|---------|----|----------|----------|---------|---------------|
| Grupos | 4 | 0,47796 | 0,119491 | 12,73 | *0,000 |
| Período | 1 | 0,03716 | 0,037160 | 3,96 | *0,055 |
| Erro | 34 | 0,31923 | 0,009389 | | |
| Total | 39 | 0,87469 | | | |

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias; (*): diferença significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 10 - Análise comparativa múltipla de Tukey do côndilo mandibular para a expressão do colágeno I

| Grupos | N | Média | Agrupamento | |
|----------|----|-----------------|-------------|---|
| L/AH+PRP | 12 | 0,395347 | A | |
| L/AH | 12 | 0,312845 | A | B |
| L/ST 24S | 6 | 0,173458 | B | C |
| SL/ST | 4 | 0,125139 | | C |
| L/ST 8S | 6 | 0,122890 | | C |

Legenda: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A porcentagem da expressão imuno-histoquímica do colágeno II no côndilo, na área correspondente a perfuração do disco, não apresenta diferença estatística entre os grupos (Tabela 11), embora se tenha observado que o grupo SL/ST e L/ST apresentaram menor porcentagem de marcação para o colágeno II em relação aos demais grupos (Figura 16).

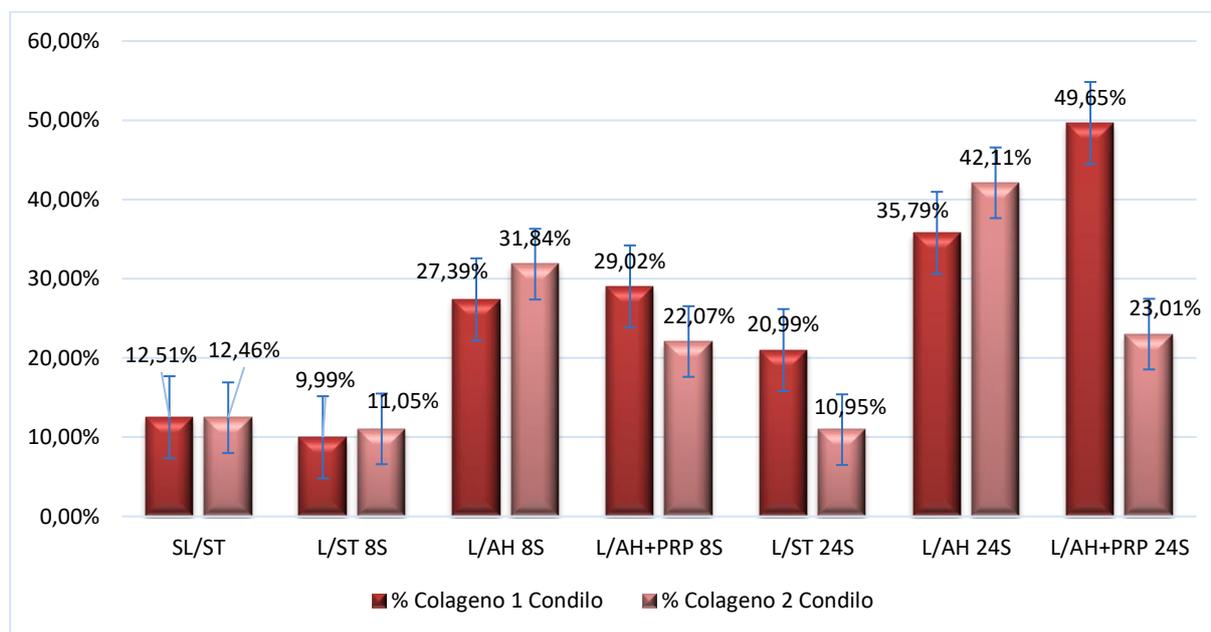
Tabela 11 - Análise de variância ANOVA dois fatores do cômulo mandibular para a expressão do anticorpo colágeno II

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|---------|----|----------|----------|---------|---------|
| Grupos | 4 | 0,28508 | 0,07127 | 2,00 | 0,118 |
| Período | 1 | 0,02092 | 0,02092 | 0,59 | 0,449 |
| Erro | 32 | 1,13807 | 0,03556 | | |
| Total | 37 | 1,46082 | | | |

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado das medias; (*): diferença significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 - Gráfico das medias de porcentagens de colágeno I e II do cômulo mandibular na área da perfuração



Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos o efeito da associação do hidrogel de ácido hialurônico com o plasma rico em plaquetas na regeneração do disco articular e da superfície osteocondral da ATM na osteoartrite em coelhos.

Procedimentos regenerativos baseados em *scaffolds* estão emergindo como uma possível opção terapêutica para o tratamento de lesões condrais e osteocondrais. Em geral, podemos resumir a maioria dos desenvolvimentos recentes para alcançar a aplicação clínica em duas grandes tendências: o uso de diferentes fontes celulares ou a aplicação de biomateriais como uma abordagem sem células (Kon et al., 2015). Uma abordagem sem células, se comprovada a sua eficácia, facilitaria o tratamento de pacientes, minimizando tempo e custo.

Várias modalidades de tratamento foram consideradas para melhorar a fraca capacidade de cicatrização da cartilagem articular, como o uso de ácido hialurônico, plasma rico em plaquetas, fatores de crescimento comerciais e o uso de células mesenquimais (Chen et al., 2013; Kutuk et al., 2014; Cugat et al., 2015; Kon et al., 2015; Duan et al., 2017). Estes trabalhos foram dirigidos para avaliar o efeito protetor e regenerador sobre a superfície osteocondral e poucos sobre o disco articular. Desta forma foi difícil realizar uma comparação com estudos anteriores na análise do disco da ATM. No presente trabalho foi avaliado o potencial dos tratamentos com AH e AH associado ao PRP sobre a regeneração do disco articular em função, diferente do realizado por (Wu et al., 2014) que removeram o disco e avaliaram a sua regeneração após implantação no tecido subcutâneo.

Para obter um modelo de osteoartrite foi realizado uma perfuração do disco assim como realizado em estudos anteriores (Narinobou et al., 2000; Kutuk et al., 2014; Embree et al., 2015). Após a perfuração do disco, neste estudo, não

se observou infecção pós-operatória, e todos os coelhos apresentaram função de mastigação normal, assim como observado por Narinobou et al. (2000).

Na análise macroscópica do disco articular foi possível observar que os grupos que receberam tratamento com AH após 8 e 24 semanas e os que receberam tratamento com AH+PRP após 24 semanas apresentaram melhor resposta quando comparados com os grupos sem tratamento e AH+PRP (8 semanas), obtendo maior quantidade de espécimes com reparação parcial ou total do defeito criado.

Na análise macroscópica do côndilo mandibular foi possível observar que após 8 e 24 semanas da perfuração do disco articular o côndilo apresenta sinais degenerativos, como irregularidade da superfície osteocondral, assim como observado por Narinobou et al. (2000) e Embree et al. (2015). O tratamento com AH isolado ou associado ao PRP foi implementado neste estudo com a hipótese de que poderiam atuar como protetores da superfície osteocondral. Porém, estes não apresentaram resultados satisfatórios, pois a maioria dos espécimes apresentou irregularidades nesta superfície, assim como observado por Duan et al. (2017).

Radiograficamente, o disco articular apresenta uma área central radiolúcida circundada por uma área radiopaca, porém quando lesionado, apresenta focos de radiopacidade central que podem ser compatíveis com material radiopaco ou tecido mineralizado (Embree et al., 2015). No presente estudo, na análise radiográfica do disco articular, foi possível observar que após perfuração discal, áreas de radiopacidade foram observadas só após 24 semanas em todos os grupos, sendo em menor quantidade nos grupos com tratamento. Isso indicaria que o tratamento com AH isolado ou associado ao PRP contribui de alguma forma para evitar a formação de material mineralizado ou calcificação atípica no disco articular da ATM.

No estudo de Narinobou et al. (2000), na análise histológica foi observado que a perfuração do disco foi seguida inicialmente por hipertrofia da cartilagem

condilar e, posteriormente, pela degeneração da superfície condilar. No estudo de Embree et al. (2015), observaram irregularidade na superfície osteocondral, agrupamento celular e áreas de matriz acelular após os períodos de 4 e 8 semanas e degeneração após 12 semanas. No presente estudo, diferentemente do estudo acima citado, a maioria dos côndilos respondeu com atrofia da superfície osteocondral e desorganização das zonas e células da matriz, nos grupos que sofreram lesão sem e com tratamento. Isso confirma que o tratamento com AH isolado ou associado ao PRP não fornece propriedades protetoras para superfície osteocondral na perfuração discal (Kutuk et al., 2014; Duan et al., 2017). Porém, no estudo apresentado por Kałużnyński et al. (2016), os autores concluíram que o AH tem propriedades anti-degenerativas da superfície osteocondral.

Na análise histológica do disco foi observado que o grupo que foi tratado com AH após 8 semanas apresentou características semelhantes ao disco normal. Os demais grupos apresentaram diminuição da celularidade, alteração da matriz e por vezes áreas de mineralização. Estes achados também foram observados em um estudo anterior, onde os discos apresentaram mudanças morfológicas importantes, incluindo celularidade reduzida, hialinização de feixes de fibras colágenas e calcificação (Natiella et al., 2009). Infiltrado inflamatório não foi observado em nenhum dos grupos, o que difere do resultado obtido por Almeida et al. (2008) quando avaliou discos articulares sintomáticos de humanos.

Na análise da porcentagem das fibras colágenas por *Picrosirius Red* do disco da ATM na área da perfuração, observou-se que predominava o colágeno I (vermelho) em todos os grupos, sendo que o grupo tratado com PRP associado ao AH apresentou uma porcentagem média próxima à da ATM normal, porém, sem resultado estatístico significativo. Estes achados foram similares aos resultados obtidos por Almeida et al. (2008). Quanto ao colágeno III (verde) o grupo tratado com PRP + AH (8 semanas) apresentou uma porcentagem média próxima à ATM normal.

A presença das fibras de colágeno do tipo I e III no disco é comumente observada em articulações jovens, especialmente na banda anterior e posterior. (Hamaya et al., 2001). Segundo Gage et al. (1990) o colágeno do tipo III é observado em áreas de reparação e se entrelaçando entre as fibras do colágeno tipo I. Neste estudo ainda foram observadas fibras colágenas do tipo III na área de reparação, em todos os grupos, indicando que o processo de regeneração ainda não tinha se completado.

O côndilo mandibular, semelhante ao observado no disco articular, apresentou na análise da porcentagem de colágeno I e III, por *Picrosirius Red*, uma prevalência do colágeno I (vermelho) em todos os grupos. Os grupos tratados apresentaram uma porcentagem de colágeno I significativamente maior ($p=0,000$) quando comparado ao grupo sem tratamento (L/ST). Quanto ao colágeno III (verde), o grupo sem tratamento não teve diferença estatística com relação à ATM normal, assim como os grupos tratados também não apresentaram diferença com relação à ATM normal. Entretanto, a porcentagem do colágeno III no grupo sem tratamento se aproximou mais da ATM normal do que os grupos tratados.

No estudo realizado por Salo e Raustia (1995), observaram no côndilo de pacientes com patologia de ATM, a síntese de colágeno tipo II ocorreu principalmente na hipertrofia condilar e no estágio intermediário de desarranjo interno da ATM, e o colágeno III era expresso no tecido de reparo fibroso e em locais de reparação da cartilagem. No presente estudo observou-se que o colágeno III também está presente na ATM normal de coelho.

Na superfície osteocondral do côndilo mandibular da ATM normal, o colágeno tipo I foi expresso nas camadas da fibrocartilagem exceto na zona hipertrófica, enquanto o colágeno tipo II foi expresso principalmente na zona hipertrófica e na zona madura. Relatos semelhantes foram descritos no estudo de Wang KH et al. (2017), com a diferença de que os autores só encontraram o colágeno II na zona hipertrófica.

No disco, o colágeno do tipo I foi expresso na forma de fibras colágenas onduladas no interior do tecido. O colágeno tipo II foi expresso no núcleo e em torno de células condroides. O estudo de Wang KH et al. (2017) apresentou resultados semelhantes, porém, o colágeno II foi expresso em torno de grupos de condroblastos poligonais na parte externa do disco.

Neste trabalho foi utilizado um modelo experimental para indução de osteoartrite em ATM de coelhos, por meio da perfuração do disco articular bilateralmente, para simular a mesma condição de osteoartrite e assim obter uma carga funcional semelhante em ambas articulações. Os discos dos grupos tratados apresentaram, de modo geral, sinais mais evidentes de reparação do que o grupo não tratado, embora não se tenha obtido uma regeneração completa das estruturas articulares. Quanto ao côndilo, os tratamentos não evitaram a alteração estrutural da superfície osteocondral.

6 CONCLUSÃO

A utilização do AH e do PRP associado ao AH mostra resultados promissores para o tratamento da osteoartrite em ATM de coelhos, ajudando na redução do defeito criado no disco, porém, sem resultados satisfatórios na proteção da superfície osteocondral, na presença de perfuração discal.

REFERÊNCIAS*

- Almeida LE, Baioni CS, Martins AP, Line SR, Noronha L, Trevilatto PC, et al. Histologic and histomorphometric analysis of posterior region of the human temporomandibular disc. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Apr;105(4):e6-11. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.10.004.
- Berkovitz BK, Pacy J. Ultrastructure of the human intra-articular disc of the temporomandibular joint. *Eur J Orthod.* 2002; 24:151–8.
- Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jun;13(7):1121-30. Review.
- Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011;377:2115-26.
- Blakeney BA, Tambralli A, Anderson JM, Andukuri A, Lim DJ, Dean DR, et al. Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold. *Biomaterials.* 2011;32:1583–90.
- Bousnaki M, Bakopoulou A, Koidis P. Platelet-rich plasma for the therapeutic management of temporomandibular joint disorders: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Oct 20. pii: S0901-5027(17)31638-7. doi:10.1016/j.ijom.2017.09.014.
- Brooks SL, Westesson PL, Eriksson L, Hansson LG, Barsotti JB. Prevalence of osseous changes in the temporomandibular joint of asymptomatic persons without internal derangement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;73:118–22.
- Chen K, Man C, Zhang B, Hu J, Zhu SS. Effect of in vitro chondrogenic differentiation of autologous mesenchymal stem cells on cartilage and subchondral cancellous bone repair in osteoarthritis of temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Feb;42(2):240-8.
- Chiu LLY, Chu Z, Radisic M. Tissue engineering. In: David LA, Gregory DS, Gary PW (eds). *Comprehensible Nanoscience and Thecnology.* Amsterdam: Academic Press.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Cugat R, Cuscó X, Seijas R, Álvarez P, Steinbacher G, Ares O, et al. Biologic Enhancement of Cartilage Repair: The Role of Platelet-Rich Plasma and Other Commercially Available Growth Factors. *Arthroscopy*. 2015 Apr;31(4):777-83
- Duan X, Sandell LJ, Chinzei N, Holguin N, Silva MJ, Schiavinato A, et al. Therapeutic efficacy of intra-articular hyaluronan derivative and platelet-rich plasma in mice following axial tibial loading. *PLoS One*. 2017 Apr 13;12(4):e0175682. doi: 10.1371/journal.pone.0175682
- Elmallah RK, Cherian JJ, Jauregui JJ, Pierce TP, Beaver WB, Mont MA. Genetically modified chondrocytes expressing TGF- β 1: a revolutionary treatment for articular cartilage damage? *Expert Opin Biol Ther*. 2015 Mar;15(3):455-464.
- Embree MC, Iwaoka GM, Kong D, Martin BN, Patel RK, Lee AH, et al. Soft tissue ossification and condylar cartilage degeneration following TMJ disc perforation in a rabbit pilot study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Apr;23(4):629-39. doi: 10.1016/j.joca.2014.12.015
- Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Oct;469(10):2706-15. doi: 10.1007/s11999-011-1857-3.
- Gage JP, Viridi AS, Triffitt JT, Howlett CR, Francis MJ. Presence of type III collagen in Disk connections of human temporomandibular joints. *Arch Oral Biol*. 1990;35(4):283-8.
- Gotterbarm T, Richter W, Jung M, Berardi Vilei S, Mainil-Varlet P, Yamashita T, et al. An in vivo study of a growth-factor enhanced, cell free, two-layered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defects. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(18):3387-95. Epub 2006 Feb 20.
- Guarda-Nardini L, Manfredini D, Stifano M, Staffieri A, Marioni G. Intra-articular injection of hyaluronic acid for temporomandibular joint osteoarthritis in elderly patients. *Stomatologija*. 2009;11(2):60-5.
- Hamaya M, Takahashi I, Sasano Y, Kuwabara M, Iijima M, Hayashi K, et al. An immunohistochemical study of the localization of types I, II and III collagen in the temporomandibular joint of growing monkeys. *Acta Histochem Cytochem*. 2001;34(6):405-411. DOI: 10.1267/ahc.34.405
- Huang S, Fu X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J Control Release*. 2010 Mar 3;142(2):149-59.
- Jonnalagadda JB, Rivero IV. Effect of cryomilling times on the resultant properties of porous biodegradable poly(ϵ -caprolactone)/poly(glycolic acid)

scaffolds for articular cartilage tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 Dec;40:33-41.

Kalpakci KN, Willard VP, Wong ME, Athanasiou KA. An interspecies comparison of the temporomandibular joint disc. *J Dent Res.* 2011; 90:193–8.

Kalużyński K, Trybek G, Smektała T, Masiuk M, Myśliwiec L, Sporniak-Tutak K. Effect of methylprednisolone, hyaluronic acid and pioglitazone on histological remodeling of temporomandibular joint cartilage in rabbits affected by drug-induced osteoarthritis. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016 Feb 11;70:74-9. doi: 10.5604/17322693.1194616.

Klinge RF. The structure of the mandibular condyle in the monkey (*Macaca mulatta*). *Micron.* 1996 Oct;27(5):381-7.

Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, et al. Platelet-rich plasma: intraarticular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;4:472-9

Kon E, Roffi A, Filardo G, Tesei G, Marcacci M. Scaffold-based cartilage treatments: with or without cells? A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Arthroscopy.* 2015 Apr;31(4):767-75. doi: 10.1016/j.arthro.2014.11.017. Epub 2015 Jan 27.

Kütük N, Baş B, Soylu E, Gönen ZB, Yilmaz C, Balcioğlu E, et al. Effect of platelet-rich plasma on fibrocartilage, cartilage, and bone repair in temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Feb;72(2):277-84. doi: 10.1016/j.joms.2013.09.011. Epub 2013 Nov 13.

Legré-Boye V. Viscosupplementation: Techniques, indications, results. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2015 Feb;101(1 Suppl):S101-8. doi: 10.1016/j.otsr.2014.07.027. Epub 2015 Jan 14

Li C, Long X, Deng M, Li J, Cai H, Meng QJ. Osteoarthritic changes after superior and inferior joint space injection of hyaluronic acid for the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis with anterior disc displacement without reduction: a cone-beam computed tomographic evaluation. *Oral Maxillofac Surg.* 2015 Feb;73(2):232-44.

Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JMS. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. Review Article. *Trends Biotechnol.* 2015 Jan;33(1):35-42. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.11.003. Epub 2014 Nov 29. Review.

Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489–496

Manfredini D, Chiappe G, Bosco M. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) axis I diagnoses in an Italian patient population. *J Oral Rehabil.* 2006 Aug;33(8):551-8.

Mesallati T, Buckley CT, Kelly DJ. A comparison of self-assembly and hydrogel encapsulation as a means to engineer functional cartilaginous grafts using culture expanded chondrocytes. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014 Jan;20(1):52-63. doi: 10.1089/ten.TEC.2013.0118. Epub 2013 Jul 12.

Murphy MK, MacBarb RF, Wong ME, Athanasiou KA. Temporomandibular disorders: a review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Nov-Dec;28(6):e393-414. doi: 10.11607/jomi.te20.

Narinobou M, Takatsuka S, Nakagawa K, Kubota Y, Terai K, Yamamoto E. Histological changes in the rabbit condyle following posterolateral disk perforation. *J Craniomaxillofac Surg.* 2000 Dec; 28(6):345-51.

Natiella JR, Burch L, Fries KM, Upton LG, Edsberg LE. Analysis of the collagen I and fibronectin of temporomandibular joint synovial fluid and discs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Jan;67(1):105-13. doi: 10.1016/j.joms.2008.08.029.

Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 Jun;14(2):149-65.

Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg.* 2005 Nov;16(6):1043-54. Review.

Roh HS, Kim W, Kim YK, Lee JY. Relationships between disk displacement, joint effusion, and degenerative changes of the TMJ in TMD patients based on MRI findings. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40:283.

Roth S, Muller K, Fischer DC, Dannhauer KH. Specific properties of the extracellular chondroitin sulphate proteoglycans in the mandibular condylar growth centre in pigs. *Arch Oral Biol.* 1997;42:63-76.

Salo LA, Raustia AM. Collagen type II and type III in the mandibular condylar cartilage of patients with temporomandibular joint pathology. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Jan;53(1):39-44

Shu W, Liu L, Bao G, Kang H. Tissue engineering of the temporomandibular joint disc: current status and future trends. *Int J Artif Organs.* 2015 Feb;38(2):55-68. doi: 10.5301/ijao.5000393. Epub 2015 Mar 2.

Shu, XZ, Ahmad S, Liu YC, Prestwich GD. Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2006 15 de Dez;79(4):902-12.

Sindelar BJ, Evanko SP, Alonzo T, Herring SW, Wight T. Effects of intraoral splint wear on proteoglycans in the temporomandibular joint disc. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 379:64–70.

Smyth NA, Murawski CD, Fortier LA, Cole BJ, Kennedy JG. Platelet-rich plasma in the pathologic processes of cartilage: review of basic science evidence. *Arthroscopy*. 2013 Aug;29(8):1399-409. doi: 10.1016/j.arthro.2013.03.004. Epub 2013 May 11.

Takafuji H, Suzuki T, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. Regeneration of articular cartilage defects in the temporomandibular joint of rabbits by fibroblast growth factor-2: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Oct;36(10):934-7.

Teramoto M, Kaneko S, Shibata S, Yanagishita M, Soma K. Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J Bone Miner Metab*. 2003;21(5):276-86.

Wang KH, Chan WP, Chiu LH, Tsai YH, Fang CL, Yang CB, et al. Histological and immunohistochemical analyses of repair of the disc in the rabbit temporomandibular joint using a collagen template. *Materials (Basel)*. 2017 Aug;10(8):924. Published online 2017 Aug 9. doi: 10.3390/ma10080924

Wang L, Detamore MS. Tissue engineering the mandibular condyle. *Tissue Eng* 2007 Ago;13(8): 955-71

Wang L, Lazebnik M, Detamore MS. Hyaline cartilage cells outperform mandibular condylar cartilage cells in a TMJ fibrocartilage tissue engineering application. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Mar;17(3):346-53. doi: 10.1016/j.joca.2008.07.004. Epub 2008 Aug 28.

Wang SZ, Chang Q, Kong XF, Wang C. The chondrogenic induction potential for bone marrow-derived stem cells between autologous platelet-rich plasma and common chondrogenic induction agents: a preliminary comparative study. *Stem Cells Int*. 2015;2015:589124.

Woodall J Jr, Tucci M, Mishra A, Benghuzzi H. Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells. *Biomed Sci Instrum*. 2007;43:266-71.

Wu Y, Gong Z, Li J, Meng Q, Fang W, Long X. The pilot study of fibrin with temporomandibular joint derived synovial stem cells in repairing TMJ disc perforation. *Biomed Res Int*. 2014;2014:454021. doi: 10.1155/2014/454021. Epub 2014 Apr 15.

Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and

osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Nov;21(11):1627-37. doi: 10.1016/j.joca.2013.07.017

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **09/2015-CEUA/ICT-CJSC-UNESP**, sobre "**Regeneração de defeitos do disco articular e da superfície osteocondral causados pela osteoartrite na articulação temporomandibular (ATM)**", sob responsabilidade de **YASMIN RODARTE CARVALHO**, tendo como colaboradora Milagros del Valle El Abras Ankha, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 12 de junho de 2015



Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora

Obs:- Para este trabalho serão utilizados:- 75(setenta e cinco) coelhos machos, nova zelândia – 6 meses – 2,5 kg.