

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS

FELIPE ERNESTO ARTUZI

**EFEITO DOS SULFATOS DE CONDROITINA E DE GLICOSAMINA SOBRE
A PROGRESSÃO DA OSTEOARTRITE QUIMICAMENTE INDUZIDA NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE COELHOS**

Porto Alegre

2017

FELIPE ERNESTO ARTUZI

**EFEITO DOS SULFATOS DE CONDROITINA E DE GLICOSAMINA SOBRE
A PROGRESSÃO DA OSTEOARTRITE QUIMICAMENTE INDUZIDA NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE COELHOS**

LINHA DE PESQUISA
BIOMATERIAIS E TÉCNICAS TERAPÊUTICAS EM ODONTOLOGIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Concentração Clínica Odontológica / Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Deise Ponzoni

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Artuzi, Felipe Ernesto

Efeito dos sulfatos de condroitina e de glicosamina sobre a progressão da osteoartrite quimicamente induzida na articulação temporomandibular de coelhos / Felipe Ernesto Artuzi. -- 2017.

88 f.

Orientadora: Deise Ponzoni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Osteoartrite. 2. Cartilagem. 3. Sulfatos de condroitina. 4. Glicosamina. 5. Articulação temporomandibular. I. Ponzoni, Deise, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FELIPE ERNESTO ARTUZI

**EFEITO DOS SULFATOS DE CONDROITINA E DE GLICOSAMINA SOBRE
A PROGRESSÃO DA OSTEOARTRITE QUIMICAMENTE INDUZIDA NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE COELHOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Deise Ponzoni (UFRGS)

Profa. Dra. Edela Puricelli

Profa. Dra. Marcia Gaiger de Oliveira

Profa. Dra. Isabel Cristina de Macedo

Profa. Dra. Karen Loureiro Weigert

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio e contínuo incentivo na realização deste trabalho. Agradeço aos meus irmãos e especialmente aos meus pais, que me orientaram sempre lutar com muito empenho pelos meus objetivos e buscaram proporcionar o melhor para minha formação profissional.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Edela Puricelli, minha orientadora de profissão.
Obrigado por tudo, desde o início como aluno de graduação na Faculdade de Odontologia da UFRGS, direcionando-me sempre a seguir seu exemplo de ética e excelência profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço novamente à família, meus irmãos Vanessa e Carlos Eduardo, ao Marcelo e à Lívia, pela amizade, apoio constante e bons momentos de convivência.

À Prof^a. Dr^a. Deise Ponzoni, minha orientadora na etapa final de doutorado. Agradeço pela prestatividade e pelos ensinamentos tão valiosos em minha formação profissional, transmitidos desde o meu curso de graduação.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, meu orientador em grande parte do doutorado, pela disponibilidade na orientação.

Ao Prof. Dr. Alexandre Silva Quevedo, pela contribuição na realização desta tese, pelo incentivo constante e amizade construída.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Baraldi, que participou da coordenação de atividades no início da pós-graduação.

Aos Profs. Drs. Michael Everton Andrades e Patrícia Koehler dos Santos da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela viabilização da etapa de quantificação dos glicosaminoglicanos.

À Prof^a. Dr^a. Francine Hehn de Oliveira pela disponibilidade na interpretação das lâminas histológicas. À equipe de técnicos do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À Enfermeira Marta Giotti Cioato e a toda equipe de profissionais da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela disponibilidade e todo apoio no cuidado com os animais durante o período do experimento.

À técnica de laboratório Silvia Barbosa, do Instituto de Ciências Básicas da UFRGS, pela captura das lâminas histológicas.

Aos colegas Maitê e Mateus, pelo auxílio na execução de atividades relacionadas ao manejo dos animais e aos experimentos laboratoriais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Faculdade de Odontologia e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao FIPE-Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA/UFRGS, pelo apoio financeiro concedido, permitindo que eu pudesse desenvolver esta tese.

A todos que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho,

Muito obrigado...

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Cronograma do estudo.....	55
FIGURA 02: Avaliação da severidade da OA nos diferentes grupos, por meio do escore de Pritzker <i>et al.</i> (2006)	56
FIGURA 03: Aspecto histológico da superfície dos côndilos mandibulares	57
FIGURA 04: Aspecto histológico da superfície dos côndilos mandibulares.	58
FIGURA 05: Análise do peso corpóreo dos animais no tempo de 40 dias	59
FIGURA 06: Análise do peso corpóreo dos animais no tempo de 100 dias	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Concentração de GAG's na comparação GC x GO.....	61
TABELA 02: Concentração de GAG's na comparação GC x GT	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACR** - American College of Rheumatology
- AINES** - Antiinflamatórios não esteróides
- ATM** - Articulação temporomandibular
- BMPs** - Bone morphogenetic proteins
- COX-2** - Cicloxigenase 2
- DNA** - Deoxyribonucleic acid
- DMB** - Dimethylmethylene blue
- DMOADs** - Disease-modifying osteoarthritis drugs
- EDTA** - Ethylenediamine tetraacetic acid
- EULAR** - European Lique Against Rheumatism
- GAG's** - Glicosaminoglicanos
- IGF-1** - Insulin like growth factor 1
- IL-1** - Interleucina 1
- IL-1 β** - Interleucina 1 beta
- IL-6** - Interleucina 6
- IL-8** - Interleucina 8
- MMP-1** - Metaloproteinase 1
- MMP-3** - Metaloproteinase 3
- OA** - Osteoartrite
- PGE₂** - Prostaglandina E₂
- SCG** - Sulfatos de condroitina e de glicosamina
- SYSADOA** - Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis
- TGF-1 β** - Fator de necrose tumoral 1 beta
- TIMP's** - Tissue inhibitors of metalloproteinases
- TNF- α** - Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa caracterizada por apresentar variados níveis de inflamação, resultando em erosão de cartilagem articular e concomitante osteogênese subcondral reparativa/adaptativa. A perda da função é a consequência de alterações anatômicas nos tecidos das articulações com OA. Frente às limitações funcionais e à sintomatologia dolorosa geradas pelo processo inflamatório na OA, os sulfatos de condroitina e de glicosamina (SCG) surgem como opção terapêutica, considerados drogas modificadoras de sintomas, com efeitos positivos em pacientes que os utilizam em longo prazo. Entretanto, tais componentes vêm sendo testados também como substâncias modificadoras de estrutura, os quais poderiam ser capazes de prevenir, retardar, ou reverter alterações morfológicas das estruturas articulares provocadas pela OA. Assim, os estudos têm avaliado sua ação sobre a cartilagem, o tecido ósseo subcondral e sobre os mecanismos inflamatórios da doença. Esta tese avaliou a influência da terapêutica com os SCG sobre as alterações teciduais provocadas pela OA quimicamente induzida em articulação temporomandibular (ATM) de coelhos. O artigo abordou especificamente o efeito dos SCG sobre a cartilagem articular degenerada, bem como sobre o conteúdo total de glicosaminoglicanos (GAG's) do disco e da cartilagem. Os resultados encontrados mostram que os derivados sulfatados apresentam resultados positivos sobre a OA. Além disso, este estudo permite considerar os sulfatos de condroitina e de glicosamina como substâncias modificadoras de estrutura (DMOADs), os quais podem ser indicados aos pacientes que apresentam osteoartrite de articulação temporomandibular (OA-ATM).

Palavras-Chave: Osteoartrite, Cartilagem, Sulfatos De Condroitina, Glicosamina, Articulação Temporomandibular, Coelhos

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease characterized by present varied levels of inflammation, resulting in erosion of articular cartilage and concomitant subchondral repair/adaptative osteogenesis. Loss of function is the consequence of anatomical changes in the tissues of the joints with OA. Facing the functional limitations and the painful symptomatology generated by the inflammatory process in OA, chondroitin and glucosamine sulfates (CGS) appear as a therapeutic option, considered as symptom modifying drugs, with positive effects in patients who use them in the long term. However, such components have also been tested as structural modifying substances, which could be capable of preventing, retarding, or reversing morphological changes in joint structures caused by OA. Thus, studies have evaluated its action on cartilage, subchondral bone tissue and on the inflammatory mechanisms of the disease. This thesis evaluated the influence of therapy with CGS on tissue changes caused by chemically induced OA in temporomandibular joint (OA-TMJ) of rabbits. The article specifically addressed the effect of CGS on degenerated joint cartilage as well as on the total glycosaminoglycan content (GAG) of the disc and cartilage. The results demonstrate that the sulfated derivatives present positive results on OA. In addition, this study allows us to consider CGS as structure modifying substances (DMOADs), which may be indicated for patients with OA-TMJ.

Keywords: Osteoarthritis, Cartilage, Chondroitin Sulfates, Glucosamine, Temporomandibular Joint, Rabbits

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS	14
1.1. ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (ATM).....	14
1.1.1. Anatomia e Fisiologia.....	14
1.1.2. Fibrocartilagem.....	16
1.1.3. Disco Articular	19
1.2. OSTEOARTRITE	21
1.3. SULFATOS DE CONDROITINA E DE GLICOSAMINA	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. GERAL.....	27
2.2. ESPECÍFICOS	27
3. ARTIGO CIENTÍFICO: Redução da severidade da osteoartrite na articulação temporomandibular de coelhos submetidos à terapêutica com sulfatos de condroitina e de glicosamina	28
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERÊNCIAS	80

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1.1. ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (ATM)

1.1.1 Anatomia e Fisiologia

A articulação temporomandibular (ATM) é uma diartrose bilateral entre os côndilos da mandíbula, as eminências articulares do osso temporal e as fossas mandibulares (Avery, 2005). As duas articulações presentes, embora anatomicamente distintas, funcionam em conjunto, sem a realização de movimentos independentes. O processo mastigatório exige que a mandíbula seja capaz de realizar não somente movimentos de abertura e fechamento, mas também protrusivos, retrusivos, laterais e uma combinação deles. Para consegui-los, o côndilo realiza movimentos de translação e rotação (Nanci, 2013).

A ATM é classificada como sendo articulação do tipo sinovial, que geralmente permite movimentos significativos. Nela, dois ossos são unidos e circundados por uma cápsula e, desse modo, criam uma cavidade articular. Esta é preenchida por líquido sinovial e formada por uma membrana que reveste as superfícies não articulares (Nanci, 2013). A cápsula articular, juntamente com ligamentos e tendões e outros tecidos moles, proporciona estabilidade articular. Tais estruturas permitem manter um alinhamento adequado das superfícies ósseas durante o movimento e evitam a ocorrência da perda do líquido sinovial (Kuroda *et al.*, 2009). Diferentemente de outras articulações, na ATM as superfícies ósseas são separadas por um disco articular fibrocartilaginoso que apresenta espessura não uniforme. O disco está conectado

superiormente ao osso temporal e inferiormente ao côndilo por estruturas fibrosas que compõem a cápsula articular, podendo se mover suavemente juntamente com o côndilo ao longo da eminência articular (Schmolke, 1994; Ingawale e Goswami, 2009).

As estruturas ósseas da ATM são a fossa glenóide no osso temporal e a cabeça do côndilo da mandíbula, suportado pelo processo condilar. Anteriormente, a fossa é limitada por uma crista óssea, descrita como eminência articular, também envolvida na articulação. O côndilo é a superfície articulante da mandíbula. A superfície articular da cabeça do côndilo é bastante convexa ântero-posteriormente e levemente convexa médio-lateralmente (Nanci, 2013). Ela cresce pelo desenvolvimento de novos condroblastos, que aparecem dispersos na camada de cartilagem. Posteriormente, há o surgimento de nova matriz de cartilagem e substituição por osso, ocorrendo uma ossificação do tipo endocondral (Avery, 2005).

Os movimentos mandibulares proporcionam um metabolismo fisiológico da cartilagem condilar, o que resulta em crescimento endocondral, com consequente desenvolvimento da ATM e da mandíbula (Takada; Miyawaki; Tatsuta, 1994). Basicamente, o crescimento condilar é influenciado pela manipulação mecânica da mandíbula, função mastigatória, oclusão dentária, relação com a fossa glenóide, ação hormonal e pela idade do indivíduo (Sinsel *et al.*, 2002).

O remodelamento da superfície condilar pode ocorrer em resposta às mudanças funcionais e fisiológicas. A formação óssea sobre o côndilo aumenta a dimensão vertical da face, representando um remodelamento condilar progressivo da ATM (Hall *et al.*, 1993). O remodelamento regressivo, ao contrário, leva à perda de dimensão vertical da face. Já o remodelamento periférico provoca a neoformação óssea às margens da articulação. Frequentemente, tais eventos estão associados a alterações

degenerativas e ocorrem como tentativa de compensar a relação inadequada entre os maxilares e seu desequilíbrio na distribuição de forças oclusais (Arnett *et al.*, 1996; Nanci, 2013).

1.1.2. Fibrocartilagem

Diferentemente da maioria das articulações sinoviais, em que as superfícies articulares são cobertas com cartilagem hialina, a articulação temporomandibular é coberta por fibrocartilagem, uma combinação de tecido conjuntivo fibroso denso superficial e cartilagem hialina (Nanci, 2013). A fibrocartilagem condilar é o mais importante local de crescimento da mandíbula (Luder, 1993). Ao contrário da cartilagem epifisária, a fibrocartilagem se desenvolve a partir das membranas ósseas durante a embriogênese, sendo considerada uma cartilagem secundária (Ramirez-Yañez, 2004).

A fibrocartilagem que reveste o côndilo mandibular é subdividida em camadas fibrosa, proliferativa, madura e hipertrófica. Na área fibrosa são observados núcleos celulares, correspondendo aos fibroblastos. A zona proliferativa serve como uma parte que delimita a região fibrosa e a camada hialina, apresentando uma reserva celular importante. É composta por células mesenquimais precursoras das camadas subjacentes. Na camada madura são encontrados condroblastos que sintetizam a matriz cartilaginosa, principalmente o colágeno tipo II. Os condroblastos se hipertrofiam e alcançam a zona hipertrófica. Essa área é conhecida como zona de ossificação endocondral. Em um corte contendo fibrocartilagem, podem ser observados condrócitos

e uma pequena quantidade de material amorfo da matriz extracelular circunvizinha (Luder, 1993; Kuroda *et al.*, 2009).

A matriz extracelular da fibrocartilagem contém quantidades significativas de colágeno tipo I, colágeno tipo II, água, proteoglicanos, glicoproteínas, lipídios e componentes inorgânicos. As células na fibrocartilagem sintetizam uma ampla variedade de moléculas da matriz extracelular, permitindo que o tecido responda às alterações no ambiente externo (Dijkgraaf *et al.*, 1995a; Ross, Pawlina, 2009). O colágeno está diretamente relacionado com a propriedade de resistência à tração. Enquanto que os proteoglicanos, juntamente com suas cadeias laterais de glicosaminoglicanos possibilitam uma expansão tecidual, devido à pressão osmótica (Paegle *et al.*, 2003).

Os proteoglicanos são macromoléculas complexas. Esses contêm uma proteína no seu núcleo, na qual estão ligadas, de forma covalente, uma ou mais cadeias de polissacarídeos denominadas glicosaminoglicanos. Os polissacarídeos são formados por repetidas unidades de dissacarídeos, os quais são compostos por um açúcar aminado e um ácido urônico, geralmente sulfatados. Há quatro principais grupos de glicosaminoglicanos: ácido hialurônico, sulfato de condroitina e dermatan sulfato, sulfato de heparano e heparina; e sulfato de queratina (Shankland, 1998).

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano que não apresenta ligação covalente na sua molécula de proteína do núcleo. É o principal componente estrutural da matriz extracelular da cartilagem. Uma molécula de ácido hialurônico pode ser constituída por uma quantidade máxima de 50.000 dissacarídeos. O sulfato de condroitina é um glicosaminoglicano que contém múltiplos dissacarídeos. Estes são compostos pelos monossacarídeos D-ácido glicurônico e N-acetil-D-galactosamina com

grupos de sulfatos (OSO_3^-), localizados nos carbonos 4 e 6, formando os dois isômeros do condroitin-sulfato na cartilagem articular: condroitin-4-sulfato (CS4) e condroitin-6-sulfato (CS6). Há aproximadamente 60 unidades repetidas por molécula de sulfato de condroitina (Shankland, 1998).

O monossacarídeo glicosamina é o principal componente dos glicosaminoglicanos da cartilagem articular. Os seus efeitos incluem a estimulação de síntese de proteoglicanos e a redução da atividade de enzimas catabólicas, como as metaloproteinases (Rezende *et al.*, 2006). Considerando-se a função da articulação temporomandibular, os glicosaminoglicanos atraem grande quantidade de água aos proteoglicanos, conferindo resistência contra as forças de compressão exercidas sobre a superfície articular. Além disso, a hidratação das superfícies articulares permite a difusão de nutrientes para a matriz cartilaginosa avascular (Shankland, 1998).

Assim, a fibrocartilagem da ATM é adaptável a alterações mecânicas e de posição apresentando uma especial capacidade de crescimento e remodelamento multidirecional (Sakamoto, Takano, 2002). Ela desempenha um papel fundamental na ATM, facilitando a articulação com o disco e reduzindo a pressão causada sobre o tecido ósseo subcondral (Singh, Detamore, 2008). Basicamente, são três os tipos de forças exercidas sobre a superfície da fibrocartilagem: tensão, compressão e cisalhamento. Em situações funcionais normais, a cartilagem responde positivamente à absorção e distribuição de tais forças mecânicas. Dessa forma, a fala e a mastigação geram forças dinâmicas que provocam um efeito anabólico sobre os tecidos articulares. Entretanto, forças excessivas, geralmente cargas estáticas, como as geradas pelo bruxismo, podem causar fadiga e conseqüente efeito catabólico à fibrocartilagem (Van Eijden, 2000).

1.1.3. Disco Articular

O disco da ATM é formado por dois principais meios: uma matriz extracelular, que contém principalmente uma rede organizada de fibras colágenas, e glicosaminoglicanos (GAG's); além de fluido intersticial, em que predomina a água. Diferentemente de outras articulações, 70 a 80% de seu peso seco são constituídos por colágeno tipo I, enquanto que 0,6 a 10% são compostos por GAG's (Fazaeli *et al.*, 2016). Na região intermediária do disco, as fibras colágenas são alinhadas no sentido ântero-posteriormente, enquanto que na região posterior e anterior, as fibras estão alinhadas no sentido médio-lateralmente e circunferencialmente (Scapino *et al.*, 2006).

O disco articular é capaz de absorver e distribuir as forças mecânicas geradas pela funcionalidade da ATM (Breul, 2007). São três os tipos de forças geradas sobre o disco articular: tensão, compressão e cisalhamento. Naturalmente, durante o movimento articular, ocorre combinação destas forças (Tanaka e Van Eijden, 2003). As propriedades mecânicas de compressão têm sido atribuídas à presença dos glicosaminoglicanos (Tanaka *et al.*, 2003), enquanto que as fibras colágenas do tecido são responsáveis por resistir às forças de tração (Detamore e Athanasiou, 2003). Regionalmente, os GAG's são encontrados em grande quantidade nas regiões laterais da zona intermediária do disco da ATM (Almarza *et al.*, 2006). Apesar de apresentar a maior quantidade de GAG's, a região lateral do disco não apresenta o mais alto módulo de compressão (Kalpakci *et al.*, 2011). Os glicosaminoglicanos localizam-se entre os feixes de fibras colágenas, sendo que o mais abundante no disco articular é o condroitin-6-sulfato (CS6) (Axelsson, 1993), seguido pelo dermatan sulfato (Nakano e Scott, 1996). Os GAG's apresentam a característica de serem hidrofílicos, promovendo

absorção de água e mantendo a pressão hidrostática ideal do fluido intersticial. Assim, contribuem para manutenção da viscoelasticidade do tecido discal (Nishimura *et al.*, 1998).

A síntese tecidual de GAG's pode ser afetada por um estresse mecânico, alterando-se a quantidade de condroitin-6-sulfato (CS6), ácido hialurônico e dermatan sulfato (Carvalho *et al.*, 1995). Dessa forma, em resposta a uma sobrecarga articular, o disco apresenta a capacidade de modificar continuamente sua composição de GAG's e, por conseguinte, suas propriedades biomecânicas (Nakano e Scott, 1996). Embora a resposta tecidual dependa da magnitude e duração das forças de compressão, além da capacidade de adaptação do hospedeiro, o estresse mecânico é o principal fator causal de alterações em componentes estruturais da articulação temporomandibular (Arnett *et al.*, 1996).

Estudos avaliando componentes teciduais e bioquímicos de discos da ATM de humanos e de animais mostraram que alterações no conteúdo de GAG's sulfatados estão diretamente relacionadas a alterações estruturais degenerativas (Kopp, 1978; Axelsson *et al.*, 1992). Além disso, a quebra de cadeias de GAG's por meio de condroitinase ABC evidenciaram uma redução significativa nas propriedades compressivas na zona intermediária de discos articulares da ATM de suínos, resultando em queda na resposta viscoelástica de tais estruturas (Willard *et al.*, 2012).

Apesar de a patogênese do deslocamento do disco ser incerta, discos deslocados são morfologicamente mais curtos e espessos do que os normais, sofrendo um extenso remodelamento de fibras colágenas e redução na quantificação de GAG's tecidual (Axelsson *et al.*, 1992a; Mills *et al.*, 1994). Assim, a função mecânica do disco seja

provavelmente dependente da organização e distribuição de tais componentes (Blaustein e Scapino, 1986).

1.2. OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa caracterizada por apresentar variados níveis de inflamação, resultando em erosão de cartilagem articular e concomitante osteogênese subcondral reparativa/adaptativa (Fujisawa *et al.*, 2003; Vernal *et al.*, 2008). Na ATM, é compreendida como sendo resultado primário ou secundário ao trauma ou sobrecarga articular aguda ou crônica (Mercuri, 2008).

O deslocamento anterior do disco e a osteoartrite causam a liberação de citocinas e fatores de crescimento no líquido sinovial articular, tais como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Kardel *et al.*, 2003). A liberação de tais mediadores ocorre primeiramente a partir da membrana sinovial inflamada, e posteriormente por ativação de condrócitos, desempenhando um importante papel no processo de patofisiologia da OA. (Pelletier e Abramson, 2001). As citocinas participam de vários processos inflamatórios, induzindo síntese e liberação de proteases, as quais podem causar a depleção de proteoglicanos e de colágeno, provocando a degradação da cartilagem articular observada na OA (Kardel *et al.*, 2003).

Em um estágio mais precoce da osteoartrite, a síntese de componentes da matriz extracelular é excedida pela síntese e atividade de proteases liberadas pelos condrócitos, resultando em degeneração e perda da cartilagem articular. O conteúdo de tais enzimas

inclui fosfatase ácida, proteases séricas, metaloproteinases, proteoglicanase e colagenase. O colapso do colágeno é predominantemente mediado pela colagenase. Ela causa a clivagem das fibras colágenas. O colapso dos proteoglicanos é mediado pelas metaloproteases, proteases séricas, enzimas lisossômicas e outras proteases. Os fenômenos de degradação e síntese são modulados por citocinas, em particular TNF- α e IL-1, e por fatores de crescimento, como IGF-1 e BMPs, além dos inibidores das MMPs (TIMPs). O nível de proteoglicanos na cartilagem com osteoartrite é reduzido proporcionalmente à severidade da doença. As fibras colágenas tornam-se desprotegidas, resultando no desgaste da superfície articular, observada histologicamente. A perda dos proteoglicanos resulta em redução da quantidade de água na cartilagem e em subsequente perda das características biomecânicas, tais como a resiliência e a elasticidade (Silva Junior, 2007; Dijkgraaf *et al.*, 1995b). Como resposta ao processo degenerativo, a síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo proteoglicanos, colágeno e glicoproteínas estruturais, e a síntese de DNA são aumentadas proporcionalmente à severidade da doença. Entretanto, a composição das subunidades dos proteoglicanos sintetizados é anormal (Dijkgraaf *et al.*, 1995b).

No estágio mais avançado da osteoartrite a redução dos componentes da matriz extracelular, incluindo água, proteoglicanos e colágeno é acentuada. Histologicamente observa-se degeneração de condrócitos, fibrilação da cartilagem e, eventualmente, o descobrimento do tecido ósseo subcondral. O colágeno é severamente desorganizado e desintegrado. Bioquimicamente ocorre um aumento continuado da síntese de proteases. A membrana sinovial pode aparecer hipervascularizada e hipertrófica. Esta fase, clinicamente, é caracterizada pela dor e dificuldade de movimento da articulação. Ruídos podem estar presentes, em caso de deslocamento ou perfuração do disco

(Dijkgraaf *et al.*, 1995b). As alterações condilares incluem achatamento ósseo, esclerose, erosão da cortical e formação de osteofitos marginais (Cho *et al.*, 2009). A exposição óssea leva ao seu achatamento e também à esclerose. O fluido sinovial pode entrar no espaço medular através de microperfurações. Tal processo resulta em cavitação e erosão, com alteração na morfologia condilar. A tentativa de reparação pode levar a formação de osteófitos (Ishimaru e Goss, 1992).

1.3. SULFATOS DE CONDROITINA E DE GLICOSAMINA

A perda da função é a consequência de alterações anatômicas nos tecidos das articulações com OA (Verbruggen, 2006). As modalidades terapêuticas para controle e manejo da OA são variadas e estão relacionadas ao estágio da doença, envolvendo a educação do paciente, restrição dos movimentos, exercícios físicos e fármacos, tais como analgésicos, anti-inflamatórios não-esteróides (AINES), e inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Machado *et al.*, 2012; Camino *et al.*, 2013). Eventualmente, as técnicas cirúrgicas com interposição (Sawhney, 1986; Puricelli, 1997; Erdem e Alkan, 2001) ou sem interposição (Tasanen e Lamberg, 1974) podem ser indicadas.

Frente às limitações funcionais e à sintomatologia dolorosa gerada pelo processo inflamatório na OA, os sulfatos de condroitina e de glicosamina (SCG) surgem como opção terapêutica, indicados principalmente para OA de joelho (Mantovani *et al.*, 2016). Os SCG são considerados drogas modificadoras de sintomas (SYSADOA), com efeitos positivos em pacientes que os utilizam em longo prazo (Lequesne *et al.*, 1994).

Entretanto, tais componentes vêm sendo testados também como substâncias modificadoras de estrutura (DMOADs), os quais poderiam ser capazes de prevenir, retardar, ou reverter alterações morfológicas das estruturas articulares provocadas pela OA (Brandt, 1995). Assim, os estudos têm avaliado sua ação sobre a cartilagem, o tecido ósseo subcondral e sobre os mecanismos inflamatórios da doença (Davies *et al.*, 2013).

Recomendações tanto do ACR (“American College of Rheumatology”) como da EULAR (“European Ligue Against Rheumatism”) não reconhecem nenhuma DMOADs. Segundo a recomendação da EULAR, porém, o sulfato de glicosamina é tido como a droga para a qual existe o maior nível de evidência e força de recomendação para seu uso. Contudo, não existe consenso, e o benefício tanto de glicosamina como sulfato de condroitina é controverso na literatura (Silva Junior, 2007).

O sulfato de condroitina tem efeito modulatório direto ou indireto sobre o processo de inflamação das articulações. Também, sugere-se que o mesmo seja capaz de promover o aumento da expressão de TGF- β 1, favorecendo a síntese de ácido hialurônico de alto peso molecular e de colágeno tipo II (Du Souich, 2014). Já algumas evidências indicam que o sulfato de glicosamina inibe a interleucina 1 (IL-1), as cascatas de sinalização intracelular e a expressão gênica (Fenton *et al.*, 2002). Além disso, estudos *in vitro* avaliando a ação do sulfato de glicosamina sobre a cartilagem e condrócitos, indicam que a glicosamina inibe a destruição do tecido cartilaginoso, estimulando os condrócitos e fibroblastos na síntese do sulfato de condroitina, proteoglicanos e colágeno (Bassleer *et al.*, 1998).

Apesar de vários ensaios clínicos apresentarem resultados positivos desta terapêutica, seja em associação ou de forma individual, (Hochberg *et al.*, 2015; Herrero-Beaumont *et al.*, 2007; Uebelhart *et al.*, 1998; Reginster *et al.*, 2001; Morreale *et al.*, 1996), outros estudos mostram resultados pouco efetivos (Wandel *et al.*, 2010; Clegg *et al.*, 2006). Também, o efeito anti-inflamatório dos sulfatos de condroitina e de glicosamina ocorre quando são administrados somente em altas doses, observando-se em estudos *in vitro* e em modelos experimentais (Roman-Blas *et al.*, 2017). Além disso, os resultados apresentados em testes sobre a eficácia desta associação, ou em uso isolado, como substância modificadora de estrutura ainda são controversos (Mantovani *et al.*, 2016), sendo geralmente obtidos a partir de estudos experimentais em membros inferiores de animais (Roman-Blas *et al.*, 2017; Terencio *et al.*, 2016; Kamarul *et al.*, 2011; Largo *et al.*, 2010; Herrero-Beaumont *et al.*, 2008; Torelli *et al.*, 2005).

Alguns ensaios clínicos avaliaram o uso de sulfato de glicosamina (Thie *et al.*, 2001) ou a associação dos sulfatos de condroitina e de glicosamina (Shankland, 1998; Nguyen *et al.*, 2001; Damlar *et al.*, 2015) no tratamento da sintomatologia causada pela disfunção da articulação temporomandibular, obtendo diferentes resultados quanto à eficácia. Porém, ainda não há estudos que mostrem seus efeitos como terapêutica modificadora de estrutura sobre a osteoartrite da articulação temporomandibular. O disco articular é uma das estruturas anatômicas fundamentalmente afetadas pela disfunção da articulação temporomandibular. As alterações de forma e de composição bioquímica, como de colágeno e de proteoglicanos, são observadas quando o disco é submetido à inflamação crônica, provocando a deterioração de suas propriedades biomecânicas (Wang *et al.*, 2012). Os módulos de tensão e de compressão são significativamente reduzidos nestas condições, indicando um incipiente processo

degenerativo articular, que posteriormente evolui para a cartilagem (Silver *et al.*,2002). A alteração do conteúdo de colágeno e de proteoglicanos é mediado por ação de citocinas inflamatórias, entre elas TNF- α e IL-1. Processo este que poderia ser modificado pela ação dos sulfatos de condroitina e de glicosamina.

Considerando-se a escassez de produções científicas relacionando o uso dos sulfatos de condroitina e de glicosamina como agentes modificadores de progressão da osteoartrite na articulação temporomandibular, torna-se essencial a realização de estudos com modelos animais que envolvam a utilização dessa terapêutica, avaliando-se a resposta a níveis celular e molecular.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o efeito do uso dos sulfatos de condroitina e de glicosamina sobre a progressão da osteoartrite quimicamente induzida nas estruturas anatômicas da articulação temporomandibular de coelhos.

2.2. ESPECÍFICOS

a) Avaliar histologicamente as estruturas anatômicas da articulação temporomandibular de coelhos.

b) Quantificar os glicosaminoglicanos do disco articular e da camada de cartilagem do côndilo mandibular da articulação temporomandibular.

c) Comparar os níveis da variável peso corpóreo dos coelhos, entre os diferentes tempos para cada grupo.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Redução da severidade da osteoartrite na articulação temporomandibular de coelhos submetidos à terapêutica com sulfatos de condroitina e de glicosamina

Felipe Ernesto Artuzi^{1,2}, Alexandre Silva Quevedo^{1,2}, Manoel Sant'Ana Filho^{1,2}, Deise Ponzoni^{1,2,3}

¹ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

² Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴ Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Este estudo foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).
Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência: Felipe Ernesto Artuzi, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2492, Santa Cecília, 90035-004, Porto Alegre, RS, Brasil. feartuzi@yahoo.com.br. Tel./fax: +55 51 3308-5010

RESUMO

A osteoartrite é a mais severa das desordens da articulação temporomandibular, podendo causar sintomatologia, tais como dor e limitação funcional. As características patológicas da osteoartrite da articulação temporomandibular incluem principalmente a degeneração da cartilagem condilar e a esclerose óssea subcondral. Os sulfatos de condroitina e de glicosamina são substâncias que têm sido utilizadas amplamente no tratamento da osteoartrite. O objetivo do presente estudo foi investigar a ação dos sulfatos de condroitina e de glicosamina sobre a progressão da osteoartrite da articulação temporomandibular em coelhos Nova Zelândia. Os animais foram divididos em três grupos, controle (injeção de soro fisiológico na articulação), osteoartrite (indução de osteoartrite articular) e grupo tratamento (indução de osteoartrite e tratamento com sulfatos de condroitina e de glicosamina). A osteoartrite foi induzida por injeção intra-articular de monoiodoacetato de sódio. Os animais foram mortos nos tempos de 30 e 90 dias após o início do tratamento. O tratamento promoveu a reversão do processo degenerativo articular em longo prazo, bem como alterou a concentração de glicosaminoglicanos presentes no disco articular dos animais. O peso corpóreo dos animais não foi influenciado pelos tratamentos utilizados. Os resultados do presente estudo permitem afirmar que os sulfatos de condroitina e de glicosamina podem ter efeito como drogas modificadoras de estrutura dos tecidos alterados pela osteoartrite da articulação temporomandibular em modelo animal.

Palavras-chave: Osteoartrite, Cartilagem, Articulação Temporomandibular, Sulfatos De Condroitina, Glicosamina, Glicosaminoglicanos, Coelhos

INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma desordem severa da ATM, que pode causar dor e limitação funcional, os quais comprometem a qualidade de vida do indivíduo. As características patológicas da osteoartrite da articulação temporomandibular (OA-ATM) incluem principalmente a degeneração da cartilagem condilar e a esclerose óssea subcondral¹. A cartilagem hialina apresenta uma limitada capacidade de reparo, frente às alterações degenerativas provocadas pela OA². Entretanto, a fibrocartilagem da ATM apresenta uma capacidade multidirecional de crescimento e remodelamento, sendo adaptável a alterações mecânicas e de posição, por meio da condrogênese e posterior ossificação³. Além disso, a ATM pode recuperar sua função normal mesmo após a superfície condilar fibrocartilaginosa apresentar degeneração³.

O tratamento ideal para a OA envolveria a redução dos sintomas e também a alteração da história natural da doença, os níveis inflamatórios e os efeitos degenerativos sobre a cartilagem e os tecidos articulares⁴. As substâncias que protegem a cartilagem durante a evolução da OA são denominadas de agentes condroprotetores. Quando tais agentes alteram o curso da doença (por exemplo, modificando as cascatas bioquímicas que contribuem para a OA), eles são chamados de “Disease-modifying osteoarthritis drugs” (DMOADs). Tais agentes visam proteger a cartilagem articular juntamente com o osso subcondral e a membrana sinovial, que são as principais estruturas articulares⁵.

Os sulfatos de condroitina e de glicosamina (SCG) são substâncias que têm sido utilizadas amplamente no tratamento da OA, sendo consideradas mais como suplementos alimentares a medicamentos, uma vez que causam poucos efeitos

adversos⁶. São duas categorias principais de agentes potencialmente condroprotetores ou DMOADs. Embora muitos estudos tenham sido publicados mostrando um efeito significativo no tratamento, ainda há controvérsias sobre sua eficácia em comparação com placebo ou outros tratamentos e sua relação custo-benefício⁷⁻⁸⁻⁹. Os efeitos positivos de uso do SCG como DMOADs em humanos, geralmente são observados em estudos clínicos em longo prazo, sendo testados isoladamente ou em associações, sendo avaliados por meio de exames de imagem¹⁰⁻¹¹⁻¹²⁻¹³. Estudos experimentais em animais testando o SCG como DMOADs mostram resultados controversos e geralmente envolvem avaliação de membros inferiores¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹.

Os sulfatos de condroitina e de glicosamina (SCG) são glicosaminoglicanos encontrados na matriz extracelular da cartilagem articular. Sugere-se que a administração de SCG é capaz de atuar contra a OA a partir de três mecanismos principais: estimulação da produção de componentes moleculares da matriz extracelular da cartilagem pelos condrócitos, inibição da degeneração da cartilagem por meio da modulação de enzimas catabólicas e supressão de mediadores inflamatórios²⁰⁻²¹⁻²². Entretanto, a fibrocartilagem da ATM possui aspectos que a diferencia em estrutura e função em relação à cartilagem hialina²³, sugerindo que os mecanismos de ação e efeitos modulatórios do SCG sobre a OA poderiam não ser os mesmos. A principal característica é que o côndilo mandibular é recoberto por uma fina camada de tecido conjuntivo fibroso, que apresenta células mesenquimais²⁴, as quais se diferenciam em cartilagem secundariamente²⁵. Alguns estudos sugerem que os SCG ou sulfato de condroitina associado ao ácido hialurônico possam estimular a diferenciação de células progenitoras, proporcionando processos de reparo tecidual de forma mais rápida e eficaz em defeitos articulares²⁵⁻²⁶.

Em relação ao tratamento da sintomatologia causada pela disfunção de ATM, alguns ensaios clínicos avaliaram o uso do SCG, obtendo diferentes resultados quanto à eficácia²⁷⁻²⁸⁻²⁹⁻³⁰. Porém, ainda não há estudos que mostrem seus efeitos como DMOAD sobre a OA-ATM. Assim, o presente estudo investigou, em longo prazo, a ação do SCG sobre a progressão da OA-ATM em coelhos submetidos à indução da doença por meio da injeção de monoiodoacetato de sódio intra-articular. Foram avaliados aspectos histológicos da cartilagem da ATM, bem como realizada quantificação de glicosaminoglicanos (GAG's) da cartilagem e do disco articular dos animais, em 30 e 90 dias de tratamento. A hipótese é que a indução da doença possa reduzir a quantidade total de GAG's no disco e na cartilagem articular, devido ao colapso da matriz extracelular. Além disso, espera-se que os SCG provoquem a recuperação dos GAG's perdidos, bem como tenham efeitos anabólicos sobre a cartilagem, revertendo a degeneração causada pela OA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho Experimental

Foram utilizados um total de 36 coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus L.*), machos, adultos, com quatro meses de idade, pesando entre 3 e 4 quilos. Os animais foram mantidos sob alimentação *ad libitum* à base de água, ração para coelhos e de folhas verdes, em gaiolas individuais, com ambiente sob ciclo de luz claro/escuro de 12h, temperatura (21°C±1) e umidade relativa do ar entre 40-60%. Este

estudo está em acordo com a Lei 11794/2008, que estabelece os procedimentos para uso científico de animais, conforme legislação vigente no Brasil. Também, foi submetido à avaliação e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em pesquisa (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o número 160238.

Os coelhos foram randomizados de forma aleatória entre os grupos controle (GC, n=12), que recebeu a injeção de soro fisiológico na ATM, grupos osteoartrite (GO, n=12) e tratamento (GT, n=12), que receberam a injeção de solução de monoiodoacetato de sódio na ATM, bilateralmente. Os animais do GT iniciaram tratamento com injeção, via subcutânea, de sulfatos de condroitina e de glicosamina (SCG) dez dias após a indução da OA. Os animais dos grupos GC e GO receberam soro fisiológico pela mesma via. Cada grupo foi subdividido aleatoriamente e catalogado em outros três subgrupos, conforme o tratamento e tempo de morte dos coelhos, em 40 e 100 dias após a indução da OA (figura 01). Os tempos de morte dos animais foram definidos a partir dos estudos de Uebelhart *et al.*¹⁰ e Artuzi, *et al.*³¹.

Indução da OA

Os animais foram anestesiados com uma associação de Cetamina (20mg/kg), Meperidina (3mg/kg) e Midazolam (1mg/kg), via intramuscular. Após a tricotomia, foi localizado o processo zigomático por palpação digital e demarcada na pele a extensão deste processo até o conduto auditivo externo com azul de metileno. Em seguida, a cinco milímetros para distal e superior ao limite posterior do processo zigomático, marcou-se o ponto de introdução da agulha para infiltração das soluções. Por fim, uma

solução de 50 µl de soro fisiológico e 0,5mg de MIA (10mg/ml) foi lentamente injetada na articulação temporomandibular, bilateralmente, dos coelhos dos grupos GO e GT. O grupo GC recebeu a mesma quantidade de 50 µl de soro fisiológico na ATM. Conforme estudo previamente realizado³¹, em que foi descrito esse modelo de indução da OA, os animais não apresentaram alterações clínicas indicando sofrimento, dor ou perda de peso. Dessa forma, não foi utilizada medicação analgésica nesta etapa.

Tratamento

Os animais do GT receberam, via subcutânea, uma injeção de 0,1 ml/kg de Condroton® a cada três dias, a qual corresponde a aproximadamente 7,5 mg/kg de sulfato de condroitina e 7,5 mg/kg de sulfato de glicosamina. A administração desta medicação foi iniciada dez dias após a indução da OA. As doses foram calculadas de acordo com a posologia recomendada na bula do medicamento³² e conforme dose utilizada em estudo previamente realizado³³. Devido à provável variação de peso dos animais e à necessidade de ajuste da dose do medicamento, foi realizado um controle de peso semanal dos mesmos, bem como nos tempos de 0, 10, 40 e 100 dias, que corresponderam, respectivamente, aos tempos de indução da OA, início do tratamento e de morte dos animais. Os animais dos grupos GC e GO receberam, por via subcutânea, apenas um volume de solução fisiológica, de acordo com o peso corpóreo. Posteriormente, conforme os tempos pré-determinados, os animais foram anestesiados com uma associação de Cetamina (20mg/kg), Meperidina (3mg/kg) e Midazolam (1mg/kg), num volume final aproximado de 2ml, via intramuscular, e mortos por

sobredose anestésica de Propofol (5mg/kg), seguida da injeção de Cloreto de Potássio (1ml/kg), por via intravenosa.

Análise Histológica

As articulações temporomandibulares, lado direito, foram removidas após hemisseção do crânio dos coelhos, fixação em formalina tamponada a 10% e descalcificadas em ácido nítrico a 5%. Posteriormente, foram seccionadas no plano sagital, dividindo-as em dois fragmentos, um medial e outro lateral. As lâminas foram preparadas com coloração histoquímica de Safranina-O/*Fast-green* e hematoxilina e eosina. Para a avaliação do grau de lesão articular foi realizada uma análise histológica qualitativa das lâminas por meio de aplicação de uma escala proposta por Pritzker *et al.*³⁴. Esse score representa uma avaliação de severidade da osteoartrite dividida em graus, de 0 (sem a doença) até 6 (grau máximo de osteoartrite). Foram realizadas leitura e análise cega das lâminas por uma professora de patologia experiente, considerando-se a referida escala (Anexo C).

Preparo das Amostras

As articulações temporomandibulares, lado esquerdo, foram dissecionadas até a exposição de suas estruturas anatômicas. Na sequência, os discos e a fibrocartilagem dos côndilos mandibulares foram totalmente removidos com auxílio de material

cirúrgico apropriado. Prosseguiu-se com a pesagem (mg) das peças (discos: $46,3 \pm 22,54$; cartilagens: $11,14 \pm 11,39$) em balança de precisão. Após, os discos e as cartilagens foram seccionados ao meio, em sentido coronal, em porções anteriores e posteriores. Assim, foram selecionados 10 mg de disco articular e 5 mg de fibrocartilagem de cada uma das porções anteriores. Eventualmente, as fibrocartilagens apresentaram um peso total da peça de 5 mg, sendo utilizada toda a amostra na quantificação dos GAG's. Em seguida, as peças foram armazenadas e congeladas a uma temperatura de -80°C .

Quantificação dos GAG's

Para quantificação dos GAG's, utilizou-se o método proposto por de Jong, Wevers e Liebrand-van Sambeek³² modificado, baseado na reação dos GAG's com azul de dimetilmetileno. Os fragmentos dos discos e cartilagens selecionados foram novamente pesados em balança de precisão (discos: $9,5 \pm 2,18$; cartilagens: $5,78 \pm 10,19$). A seguir, as peças foram fragmentadas com auxílio de bisturi, maceradas e incubadas em banho seco a uma temperatura de 60°C por 24h, em solução contendo $150\mu\text{l}$ de tampão fosfato 50mM pH 6,5 com $0,24\text{ g/L}$ de L-cysteína, $0,4\%$ de EDTA $0,5\text{M}$ e papaína $0,0607\text{ mg/ml}$ ($15\mu\text{l}$ de papaína para os discos e $9\mu\text{l}$ para as cartilagens). Os GAG's foram separados após acréscimo de $300\mu\text{l}$ de clorofórmio e centrifugação a $10,000\text{ G}$ ($9,000\text{ rpm}$) por 15 minutos a temperatura de 4°C e seguido por separação do sobrenadante. Em seguida, os GAG's foram quantificados pela técnica de azul de dimetilmetileno (DMB), na qual $5\mu\text{l}$ da amostra de sobrenadante foram misturados a

uma solução de DMB (DMB 0.3 mol/L com hidroximetil aminometano - tris 2 mol/L) e realizada leitura em comprimento de onda de 530 nm (Spectramax M3 – *multi-mode microplate reader*, Molecular Devices, China). Os resultados foram expressos em µg de GAGs/mg de peso úmido dos tecidos.

Análise do Peso Corpóreo dos Animais

Durante o estudo foi realizado, semanalmente, o controle de peso corpóreo dos animais, para fins de posologia do SCG e de comparação entre os níveis desta variável entre os diferentes tempos (0, 10, 40 e 100 dias), para cada grupo. Tais tempos correspondem, respectivamente, ao da indução da OA, ao de início dos tratamentos e a cada um dos tempos de morte dos animais.

Análise Estatística

As medianas obtidas a partir da aplicação do escore na análise histológica dos grupos controle, osteoartrite e tratamento foram comparados pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguida pelo teste *post hoc* de Dunn. Nas comparações gerais das medianas entre os grupos (GC vs. GO, GO vs. GT, GC vs. GT), desconsiderando-se o tempo, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. A análise da comparação dos GAGs entre os grupos (GC vs. GO, GC vs. GT) foi realizada através do *t-test* para medidas independentes. Para análise do peso corpóreo dos animais utilizou-se Anova de medidas

repetidas mista, seguida pelo teste *post-hoc* LSD (*Least Significance Difference*) de Fisher, com uma variável dependente. O pacote estatístico SPSS, versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), foi utilizado para a avaliação dos dados. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Severidade da OA

Foi realizado teste de normalidade dos dados, sendo que não houve distribuição normal ($p < 0.05$). Os resultados referentes à severidade da degeneração articular por meio do grau de OA estão expressos na figura 02. Na comparação entre os diferentes grupos houve diferença significativa no grau de OA ($\chi^2 = 12.239$, $p = 0.032$).

Na comparação entre os grupos (GC vs. GO), houve diferença estatisticamente significativa nos dois tempos avaliados: ($GC_{40} < GO_{40}$, $z = -1.973$, $p = 0.049$) e ($GC_{100} < GO_{100}$, $z = -2.338$, $p = 0.019$), o que indica estabilidade na manutenção da doença e confiabilidade do modelo de indução de OA. Na avaliação entre os grupos (GC vs. GT) houve forte tendência em ter diferença significativa na comparação ($GC_{40} = GT_{40}$, $z = -1.964$, $p = 0.050$). Não houve diferença significativa na comparação ($GC_{100} = GT_{100}$, $z = -0.383$, $p = 0.702$). Este resultado pode indicar a efetividade do tratamento com os sulfatos de condroitina e de glicosamina em longo prazo. Na comparação entre os grupos (GO vs. GT) os animais do GO_{40} apresentaram grau de OA sem diferença com o GT_{40} ($z = -0.331$, $p = 0.741$), mostrando que o tratamento não foi eficaz após 30 dias de

administração. Quando realizada comparação GO₁₀₀ vs. GT₁₀₀ observou-se que o GT₁₀₀ apresentou um grau de OA significativamente menor em relação ao GO₁₀₀ ($z=-2.035$, $p=0.042$), evidenciando que a terapêutica com SCG foi eficaz em reverter as alterações teciduais provocadas pela OA. Entretanto, houve um efeito similar do tratamento ao longo do tempo (GT₄₀=GT₁₀₀, $z=-1.551$, $p=0.121$). A OA se manteve constante na comparação entre os grupos GO₄₀ e GO₁₀₀, ($z=-0.494$, $p=0.621$). O GC não apresentou alterações degenerativas significativas nos tecidos articulares, mantendo o mesmo padrão tecidual ao longo do tempo (GC₄₀=GC₁₀₀, $z=-0.638$, $p=0.523$).

Avaliação Histológica

Os animais do GC apresentaram cêndilos mandibulares com aspecto morfológico normal, apresentando convexidade na região anterior (figura 03A). As superfícies articulares mantiveram histologia característica, nos dois tempos avaliados. A fibrocartilagem mostrou regularidade, apresentando coloração intensa por safranina-O no tecido conjuntivo fibroso e na camada de cartilagem hialina subjacente, evidenciando matriz extracelular cartilaginosa sem alterações em sua composição molecular de proteoglicanos (figuras 04A e B). A espessura da cartilagem com a subdivisão das camadas celulares e o processo de ossificação não foram alterados (figura 04C).

A avaliação da ATM dos animais do GO evidenciou a presença de alterações degenerativas importantes na fibrocartilagem. Em relação à morfologia, observou-se modificação anatômica dos cêndilos, como efeito do processo de remodelamento do

tecido ósseo subcondral (figuras 03B e D). A camada de cartilagem mostrou ausência de definição de estrutura (figura 04D), redução de espessura (figura 04G), ou perda total em certas áreas (figura 04E) com tentativas de reparo em outras. Além disso, a superfície da cartilagem apresentou deformações, fendas em profundidade e áreas de ossificação heterotópica (figura 04F). No aspecto celular, observou-se principalmente degeneração (figuras 04H e I) e tentativas de proliferação, com formação de agrupamentos celulares (figura 04H). A matriz extracelular apresentou redução na coloração por safranina-O, evidenciando a perda de proteoglicanos. Também, observou-se a formação de áreas de edema na região intercelular. Além disso, o tecido ósseo subcondral mostrou intenso remodelamento, observando-se a presença de osteoblastos e lacunas de Howship contendo osteoclastos em atividade. Entre as trabéculas ósseas, houve a formação de tecido conjuntivo fibroso. Nas articulações com maior severidade de OA, cistos articulares intra-ósseos evidenciaram um avançado estado de degeneração (figura 03B).

Os animais do GT₄₀ apresentaram alterações degenerativas muito semelhantes ao GO₄₀, com severo grau de OA. Assim, a doença permaneceu de certa forma estável, evidenciando a ausência de efeitos favoráveis do SCG em curto prazo. Entretanto, houve forte tendência em não haver diferença significativa na comparação entre GC₄₀ e GT₄₀, indicando uma tendência para recuperação dos tecidos articulares. Nos animais do GT₄₀ observou-se deformação dos côndilos mandibulares, descontinuidade da superfície da cartilagem pela presença de fendas invadindo as camadas intermediárias e profundas (Figura 3C). Também, alterações como fibrilação e erosão estavam presentes. Em alguns sítios houve áreas de formação de tecido cartilaginoso como tentativas de reparos, próximos a regiões com degeneração celular (figura 04J). Também, foram

observadas perdas de definição da camada de cartilagem (figura 04K) e formações ósseas heterotópicas (figura 04L) No tecido ósseo subjacente, observou-se tecido conjuntivo fibroso entre as trabéculas ósseas. A presença de perda de proteoglicanos da cartilagem também pode ser encontrada. No grupo GT₁₀₀, a maioria das articulações não apresentou alterações histológicas compatíveis com OA, os cêndilos apresentaram-se com morfologia normal e a cartilagem sem alterações em sua espessura (figura 03E). Em outras, houve degeneração compatível com OA de baixo grau, evidenciando-se a recuperação dos tecidos articulares pós-tratamento com SCG. Esse resultado permite inferir que os SCG têm algum efeito como droga modificadora de estrutura (DMOAD) na cartilagem com OA, em longo prazo. Diferentemente do GO₁₀₀, em que os animais mantiveram severa degeneração articular. Em certas regiões dos cêndilos do GT₁₀₀ houve discreta redução da espessura da cartilagem hialina e foram observados pontos de fibrilação. Eventualmente, os condrócitos apresentaram-se agrupados, formando agrupamentos celulares próximos a áreas de redução do número de células. Houve coloração normal na cartilagem articular por safranina-O, sugerindo-se a recuperação dos proteoglicanos da matriz extracelular (figura 04M). Em geral, a camada de cartilagem apresentou aspecto histológico sem alterações degenerativas (figuras 04N e O), bem como o tecido ósseo subcondral.

Quantificação de GAG's

Considerando-se os tempos, não foram observadas alterações significativas na quantidade de GAG's no disco e na cartilagem articular entre os grupos estudados.

Assim, pode-se considerar que, com a amostra avaliada, tanto a indução da OA quanto o tratamento com SCG não provocaram alteração na quantidade de GAG's em 40 e em 100 dias. Na comparação entre GC ($3,02 \pm 0,82$) vs. GO ($4,04 \pm 1,37$), desconsiderando-se os tempos, houve aumento significativo na quantificação dos GAG's dos discos articulares após a indução da OA ($t=2,207$; $p=0,041$), (tabela 01). Em relação à comparação GC ($3,02 \pm 0,82$) vs. GT ($3,64 \pm 1,54$) não houve diferença estatística, sugerindo-se que no grupo de animais tratados, houve normalização da quantidade de GAG's nos discos articulares ($t=1,217$; $p=0,241$), (tabela 02). Em igual análise na cartilagem articular, na comparação entre GC ($7,57 \pm 4,25$) vs. GO ($8,78 \pm 3,73$) não houve diferença significativa ($t=0,739$; $p=0,468$), bem como na comparação entre GC ($7,57 \pm 4,25$) vs. GT ($8,83 \pm 2,61$), ($t=0,875$; $p=0,391$).

Análise do Peso Corpóreo dos Animais

Os resultados referentes à análise do peso corpóreo mostraram que houve um comportamento similar entre todos os animais independentemente do grupo tanto aos 40 dias (interação grupo x tempo: $F=1.455$; $p=0.141$) quanto aos 100 dias (interação grupo x tempo: $F=1.758$; $p=0.122$). Tanto no G_{40} ($p<0,001$) quanto do G_{100} ($p<0,001$) os coelhos tiveram um ganho significativo de peso ao longo do tempo, com início da verificação antes da indução da OA (figura 05 e 06). Além disso, houve diferença significativa entre os grupos de forma geral, em todas as aferições, tanto no G_{40} (efeito de grupo: $F=2.871$; $p=0,031$), quanto no G_{100} (efeito de grupo: $F=4.380$; $p=0,032$).

DISCUSSÃO

Os dados mostram que houve um efeito benéfico do SCG sobre os tecidos da ATM em longo prazo, com administração subcutânea nos coelhos. Os animais não tiveram efeitos colaterais, tolerando muito bem a medicação, o manejo e a via de administração utilizada. A via oral de administração do SCG é amplamente utilizada por pacientes e geralmente testada em muitos estudos experimentais em animais¹⁴⁻¹⁶⁻³⁶. Entretanto, envolve o preparo de alimentos específicos para coelhos, contendo o princípio ativo, ou a administração por gavagem. As desvantagens são o custo elevado para preparo das dietas e eventuais iatrogenias, como possíveis perfurações e criação de falsas-vias durante a gavagem em longo prazo. Além disso, o manejo dos coelhos para realização da técnica poderia tornar-se difícil ao longo do tempo, impedindo a administração. Dessa forma, se optou pela via subcutânea, mais prática e segura para os animais, obtendo-se êxito na execução, até o fim do experimento.

Os resultados do presente estudo sugerem que o uso dos SCG pode ser uma opção de tratamento para a OA da ATM, possibilitando uma ação protetora sobre a cartilagem articular. Até então, alguns estudos haviam mostrado efeitos positivos na melhora da sintomatologia²⁷⁻³⁰. Entretanto, este é o primeiro trabalho que mostra os efeitos benéficos dos SCG sobre a progressão da OA na ATM em modelo animal. A forma de indução da doença em tal estrutura, utilizando o MIA, está bem descrito na literatura³¹⁻³⁷, e resulta em degeneração semelhante à observada em humanos³⁸. O MIA tem efeito citotóxico sobre os condrócitos, provocando apoptose celular de forma dose-dependente³⁹. Além disso, aumenta o estresse oxidativo da célula, a perda de proteoglicanos da matriz extracelular e a expressão de citocinas pró-inflamatórias tais

como IL-6, IL-17A, TNF- α e metaloproteinases (MMP-1, MMP-3 e MMP-13), causando o colapso da cartilagem⁴⁰. Tal processo degenerativo foi observado nos grupos GO₄₀ e GO₁₀₀, em que houve diferença significativa em relação ao GC, evidenciando a efetividade do MIA como substância indutora de OA e a estabilidade do modelo em longo prazo.

Em contrapartida ao processo degenerativo provocado pelo MIA, os SCG apresentam um efeito anabólico sobre a cartilagem, estimulando a produção de matriz extracelular, provocando a supressão de mediadores inflamatórios e inibindo a degeneração tecidual²¹. Porém, em 30 dias de tratamento não houve melhora no grau de OA no GT₄₀ quando comparado ao GO₄₀. Após a injeção do MIA, a concentração máxima de metaloproteinases da matriz (MMP) e aggrecanases, que causam a clivagem dos proteoglicanos, ocorre entre o terceiro e o sétimo dias⁴¹. O processo inflamatório e os efeitos histológicos já são encontrados, respectivamente, no primeiro e sétimo dias em joelhos de ratos, após a injeção do MIA⁴². Na ATM, foi observada redução da espessura da cartilagem e presença de invasão no tecido ósseo subcondral a partir do décimo dia³⁷. Esse foi o mesmo período esperado para o início da administração do SCG, após a injeção do MIA, no presente estudo. A ação dos SCG como droga modificadora de sintoma (SYSADOA) inicia em longo prazo, em torno de duas a três semanas após o início do uso⁴³. Entretanto, no presente estudo houve uma tendência de os animais apresentarem melhora na severidade da doença após 30 dias de tratamento (GO₄₀ vs. GT₄₀).

Embora os mecanismos fisiopatológicos pelos quais os SCG agem sobre a OA não terem ainda sido totalmente esclarecidos⁴⁴, a terapêutica testada mostrou resultados positivos sobre os tecidos da ATM danificados pela OA no GT₁₀₀. Os animais que

receberam o tratamento apresentaram degeneração significativamente reduzida (GO₁₀₀ vs. GT₁₀₀). Dessa forma, pode-se sugerir que tenha ocorrido uma atuação dos SCG como DMOADs. Porém, observou-se um efeito similar do tratamento ao longo do tempo (GT₄₀ vs. GT₁₀₀). No estudo de Taşkesen *et al.*³⁶, os autores observaram um processo de reparo do tendão extensor digital longo de coelhos submetidos à lesão cirúrgica e tratamento com SCG. Houve significativa formação de cartilagem, bem como redução na quantidade de vasos sanguíneos, após seis semanas de tratamento. Porém, tais diferenças não foram observadas na comparação com o grupo controle após 12 semanas de uso dos SCG. Ainda que o grupo tratado também apresentasse melhora tecidual, semelhante ao observado no presente trabalho após 90 dias de tratamento. Já no estudo de Roman-Blas *et al.*¹⁴, os autores induziram OA em joelho de coelhos por meio de transecção do ligamento cruzado e meniscectomia parcial medial e testaram o uso da associação SCG por 14 semanas, via oral. Os parâmetros histológicos não mostraram redução na severidade da doença na cartilagem hialina que pudesse indicar efeitos terapêuticos do SCG como DMOADs. Além disso, o uso em longo prazo dos SCG não reduziu os altos níveis de citocinas inflamatórias IL-1 β e COX2 presentes na membrana sinovial dos animais com OA.

Entretanto, há que se considerar a via oral de administração dos SCG nesses estudos. Diferentemente do presente, em que se utilizou a via subcutânea para administração do fármaco. Além disso, a cartilagem hialina é desprovida de tecido conjuntivo fibroso. Na ATM, a fibrocartilagem pode apresentar um comportamento semelhante ao pericôndrio, tornando-se uma fonte de células mesenquimais precursoras de novos condrócitos⁴⁵. Assim, sugere-se que o efeito dos SCG associados às

características da fibrocartilagem tenha favorecido a reversão do processo degenerativo da ATM dos animais no presente estudo.

As características da OA geralmente estão associadas a efeitos degenerativos em relação aos componentes teciduais e bioquímicos das estruturas articulares²⁰. Alguns estudos têm observado uma redução total de GAG's da matriz extracelular, tanto na cartilagem articular com níveis severos de OA⁴⁶⁻⁴⁷, quanto em discos articulares degenerados ou deslocados⁴⁸. Entretanto, no presente estudo, observou-se um aumento significativo de GAG's dos discos articulares no GO em relação ao GC, quando analisados os dois tempos em conjunto. Tal resultado também foi observado por Axelsson⁴⁹, em que o autor provocou perfuração do disco articular da ATM de coelhos como forma de indução da OA e após 16 semanas encontrou maior quantidade de GAG's quando comparado ao grupo controle. Nos discos articulares experimentais, os proteoglicanos maiores apresentaram taxa de síntese ligeiramente maior e de degradação mais baixa, refletindo os resultados encontrados pelo autor.

Em um estágio inicial da doença ou como tentativa de reparo tecidual, ocorre bioquimicamente um aumento na síntese de componentes da matriz extracelular e de DNA, caracterizada por proliferação, mitoses e agrupamentos celulares, resultando em intensificação da atividade metabólica dos condrócitos⁵⁰, o que poderia justificar os resultados encontrados no estudo. Assim, frente ao modelo de OA utilizado, pode-se sugerir que os condrócitos poderiam responder com aumento da produção de GAG's. Em um estudo *in vitro*, os autores observaram que em cultura celular, os condrócitos respondem com maior liberação de GAG's na presença de interleucina 1 (IL-1)⁵¹. Entretanto, tais processos são observados na cartilagem, onde os resultados não foram os mesmos, sendo que não houve diferença de GAG's entre GC e GO, sugerindo-se que

a cartilagem possa sofrer maiores alterações com a OA, reduzido sua capacidade de resposta frente à doença. Ainda que em certas regiões da cartilagem observaram-se áreas de tentativa de reparo, com proliferação celular e formação de agrupamentos celulares (figura 04H), o que poderia refletir em maior produção de componentes moleculares, tais como os GAG's. O processo de tentativa de reparo é mediado por fatores de crescimento, os quais fazem difusão da matriz extracelular até atingirem os condrócitos. Na OA a difusão de fatores de crescimento é maior do que o normal devido à perda de integridade tecidual⁵⁰.

Na comparação das médias da concentração de GAG's dos discos articulares entre os grupos GC e GT não houve diferença significativa, considerando-se os dois tempos de análise. Este resultado permite sugerir que a melhora na severidade da OA, como efeito da terapêutica com os SCG e observada histologicamente, possa ter provocado a redução da liberação de GAG's pelos condrócitos. Tais agentes exercem efeito pela intensificação de respostas celulares, no caso dos condrócitos, quando em meio à ambiente adverso, como na presença da OA, e não em cartilagem normal⁵². Assim, estimulam o *turnover* da matriz extracelular com maior produção de GAG's na presença da OA e posterior normalização do seu metabolismo, retornando-se a níveis normais de componentes moleculares⁴⁶. Estudos *in vitro* mostram que a presença de interleucina 1 (IL-1) induz a liberação de GAG's e que, tanto o sulfato de glicosamina isolado ou a combinação de altas doses de SCG podem reduzir a liberação de tais componentes moleculares pelos condrócitos nos tecidos⁵³⁻⁵¹. Entretanto, no presente estudo novamente não houve diferença significativa na quantidade de GAG's da cartilagem articular, quando comparados os grupos GC e GT. Uma das possibilidades para justificar as diferenças observadas na quantificação dos GAG's entre os discos e as

cartilagens articulares poderia ser a falta de especificidade da reação do azul de dimetilmetileno por subprodutos do metabolismo dos GAG's ou falta de sensibilidade do método⁵². Em relação às análises dos GAG's em cada tempo, não houve diferença estatística entre os grupos estudados, o que poderia ser explicado pelo tamanho da amostra utilizada. Este resultado permite sugerir a realização de outros estudos com uma quantidade maior de animais para esta variável.

Os animais apresentaram uma boa tolerância em relação ao tratamento utilizado, não ocorrendo reações adversas ao monoiodoacetato utilizado na indução da OA, nem aos SCG. Além disso, a dieta oferecida foi bem aceita, o que refletiu em ganho significativo de peso corpóreo dos coelhos, tanto ao final dos 40 quanto dos 100 dias de análise em comparação ao início do experimento. Os resultados sugerem que a OA induzida não tenha provocado sintomatologia dolorosa ou comprometimento funcional da ATM que pudesse acarretar a não aceitação da dieta e conseqüente redução de peso corpóreo total. Assim, os diferentes tratamentos testados não influenciaram a ocorrência de alteração de peso dos animais, não havendo, portanto, qualquer interação entre as variáveis avaliadas. Também, observou-se no presente estudo uma diferença significativa na comparação dos pesos entre os grupos em todos os tempos analisados. Esta discrepância esteve presente no início do experimento e manteve-se constante. A falta de equilíbrio em relação ao peso inicial dos grupos pode explicar esta diferença. Entretanto, devido à distribuição aleatória dos animais, ocasionalmente houve concentração desigual dos pesos entre os grupos.

O presente estudo é facilmente reprodutível, não envolvendo procedimentos cirúrgicos para sua execução. O modelo de indução da OA, por meio da injeção direta do MIA na cavidade articular da ATM reduz custos e evita realização de etapa cirúrgica

como forma de indução da doença. Além disso, os resultados obtidos com a terapêutica utilizada permitem afirmar que os SCG provocam a reversão de alterações degenerativas das estruturas articulares da ATM, podendo ser considerados como agentes modificadores de estrutura. Entretanto, no tratamento da doença, há que considerar outros fatores relacionados à OA-ATM, especialmente idade, sexo, oclusão dentária e hábitos comportamentais, os quais também interferem na etiopatogenia da doença. Além disso, frente à reduzida capacidade de reparo da cartilagem e aos mecanismos complexos que levam ao desenvolvimento da OA, outros estudos são necessários para avaliar o efeito dos SCG sobre os tecidos articulares com OA e seus mecanismos de ação como agentes modificadores de estrutura.

Financiamento

Esta pesquisa foi apoiada pela seguinte agência de financiamento brasileira: Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA / FIPE), sob a concessão no. 160238. O financiador não teve nenhum papel no design do estudo, na coleta e análise de dados, na decisão de publicação ou na elaboração do manuscrito.

CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum

APROVAÇÃO ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comitê de Cuidados e Uso Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e realizado de acordo com o disposto na Lei nº. 11794/2008, que estabelece a legislação atual sobre o uso de animais na pesquisa.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Não requerido.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pelas seguintes agências de financiamento brasileiras: o Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / FIPE (160238). Também queremos agradecer ao Grupo de Pós-Graduação em Faculdade de Odontologia (PPGO) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Unidade de Experimentação Animal (UEA), à Unidade de Patologia Experimental e à Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do HCPA.

REFERÊNCIAS

- 1- Bechtold TE, Saunders C, Decker RS, Um HB, Cottingham N, Salhab I. Osteophyte formation and matrix mineralization in a TMJ osteoarthritis mouse model are associated with ectopic hedgehog signaling. *Matrix Biol.* May 2016; 52-54: 339-54
- 2- Kuroda S, Tanimoto K, Izawa T, Fujihara S, Koolstra JH, Tanaka E. Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* Nov 2009; 17: 11: 1408-15.
- 3- Robinson PD. Articular cartilage of the temporomandibular joint: can it regenerate? *Ann R Coll Surg Engl.* Jul 1993;75: 4: 231-6.
- 4- Manno RL, Bingham CO, Paternotte S, Gossec L, Halhol H, Giacobelli G, Rovati L, Mazzuca SA, Clegg DO, Shi H, Messi ET, Lanzarotti A, Dougados M. OARSI-OMERACT initiative: defining thresholds for symptomatic severity and structural changes in disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD) clinical trials. *Osteoarthritis Cartilage.* Feb 2012;20: 2: 93-101.
- 5- Davies PS, Graham SM, MacFarlane RJ, Lonidou A, Mantalaris A, Tsiridis E. Disease-modifying osteoarthritis drugs: in vitro and in vivo data on the development of DMOADs under investigation. *Expert Opin Investig Drugs.* Apr 2013;22: 4: 423-41.
- 6- Simanek V, Křenb V, Ulrichová J, Galloc J. The efficacy of glucosamine and chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: are these saccharides drugs or nutraceuticals. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149: 1: 51-56.
- 7- Towheed TE, Anastassiades TP, Shea B, Houpt J, Welch V, Hochberg MC. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (2): CD002946.
- 8- Reichenbach S, *et al.* Meta-analysis: chondroitin for osteoarthritis of the knee or hip. *Ann Intern Med.* Apr 2007;146: 8: 580-90.
- 9- Wandel S, *et al.* Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network metaanalysis. *BMJ.* Sep 2010;16: 341, c4675.
- 10- Uebelhart D, *et al.* Protective effect of exogenous chondroitin 4,6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage.* May 1998;6: 3: 6-13.
- 11- Pavelká K, *et al.* Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med.* Oct 2002;162:18:2113-23.
- 12- Kahan A, *et al.* Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism.* Feb 2009;60: 2: 524-33,
- 13- Martel-Pelletier J, *et al.* First-line analysis of the effects of treatment on progression of structural changes in knee osteoarthritis over 24 months: data from the osteoarthritis initiative progression cohort. *Ann Rheum Dis.* Mar 2015;74: 3: 547-56.
- 14- Roman-Blas JA, *et al.* The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. *Eur J Pharmacol,* Jan 2017;5: 794, p. 8-14.

- 15- Terencio MC, *et al.* Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. *Biomed Pharmacother*, Apr 2016;79: 120-8.
- 16- Kamarul T, *et al.* A preliminary study of the effects of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate on surgically treated and untreated focal cartilage damage. *Eur Cell Mater*. Mar 2011;15: 21: 259-71.
- 17- Largo R, *et al.* Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen-induced arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. Jun 2010;18: 1:17-23
- 18- Herrero-Beaumont G, *et al.* Effect of chondroitin sulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. *British Journal of Pharmacology*. 2008;154: 843-51.
- 19- Torelli SR, *et al.* Histopathological Evaluation of Treatment with Chondroitin Sulphate for Osteoarthritis Induced by Continuous Immobilization in Rabbits. *J Vet Med A*. 2005;52:45–51.
- 20- Uitterlinden EJ, *et al.* Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*. Mar 2006.;14: 3:250-57,
- 21- Kubo M, *et al.* Chondroitin sulfate for the treatment of hip and knee osteoarthritis: current status and future trends. *Life Sci*. Sep 2009;85:13-14: 477-83.
- 22- Imagawa K, *et al.* The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes-implications for osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 405, no. 3, p. 362-67, Feb 2011.
- 23- Shen G, Darendeliler MA. The adaptive remodeling of condylar cartilage— a transition from chondrogenesis to osteogenesis. *J Dent Res*. Aug 2005;84: 8: 691-9.
- 24- Nanci A. *Ten Cate Histologia Oral: Desenvolvimento, estrutura e função*. Rio de Janeiro: Elsevier, 8ª edição, 2013.
- 25- Delatte M, *et al.* Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: the femoral head and the mandibular condyle. *Eur J Oral Sci*. Apr 2004;112: 2: 156-62.
- 26- Tosun HB, *et al.* The effect of sodium hyaluronate chondroitin sulfate combined solution on cartilage formation in osteochondral defects of the rabbit knee: an experimental study. *Ther Clin Risk Manag*. Apr 2017;18: 13: 523-32.
- 27- Damlar, I.; Esen, E.; Tatli, U. Effects of glucosamine-chondroitin combination on synovial fluid IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. May 2015;20: 3: e278-283.
- 28- Nguyen P, *et al.* A randomized double-blind clinical trial of the effect of chondroitin sulfate and glucosamine hydrochloride on temporomandibular joint disorders: a pilot study. *Cranio*. Feb 2001;19: 2: 130-139.
- 29- Thie NM, Prasad NG.; Major PW. Evaluation of glucosamine sulfate compared to ibuprofen for the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis: a randomized double blind controlled 3 month clinical trial. *J Rheumatol*. Jun 2001;28: 6:1347-1355.
- 30- Shankland WE. The effects of glucosamine and chondroitin sulfate on osteoarthritis of the TMJ: a preliminary report of 50 patients. *Cranio*. Oct 1998: 16: 4:230-235,
- 31- Artuzi FE, *et al.* Rabbit model for osteoarthrosis of the temporomandibular joint as a basis for assessment of outcomes after intervention. *Br J Oral Maxillofac Surg*. Jun 2016;54:5:e33-7,
- 32- Viana FB. *Guia Terapêutico Veterinário*. Lagoa Santa: Cem, 2ª edição, 2007.

- 33- Veiga PHA. Influência do Sulfato de Condroitina e da Lectina de Semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) em Relação à Crioterapia de Ultrassom Terapêutico sobre lesão em Cartilagem do Joelho de Coelhos. Recife: UFPE, 2012. 104 p. Tese (Doutorado).
- 34- Pritzker, KPH, *et al.* Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. Jan 2006;14: 1: 13-29.
- 35- Jong JG, Wevers RA, Sambeek, RL. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem*. Jun 1992;38: 6: 803-7.
- 36- Taşkesen A, *et al.* Glucosamine-chondroitin sulphate accelerates tendon-to-bone healing in rabbits. *Eklemler Hastalıkları*. 2015;26: 2:77-83,
- 37- Cledes G, *et al.* Validation of a chemical osteoarthritis model in a rabbit temporomandibular joint: a compliment to biomechanical models. *Int J Oral Maxillofac Surg* Nov 2006;35: 11: 1026-1033
- 38- Guingamp C, *et al.* Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum*. Sep 1997;40: 9:1670-1679.
- 39- Jiang L, *et al.* Monosodium iodoacetate induces apoptosis via the mitochondrial pathway involving ROS production and caspase activation in rat chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*. Mar 2013;31: 3: 364-9.
- 40- Chiu PR, *et al.* Vitamin C Protects Chondrocytes against Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis by Multiple Pathways. *Int J Mol Sci*. Dec 2016;18:1.
- 41- Janusz MJ, *et al.* Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage*. Nov 2001;9:8:751-760.
- 42- Bove SE, *et al.* Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. Nov 2003;11: 11: 821-830.
- 43- Lequesne M, *et al.* Guidelines for testing slow acting drugs in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*. Sep 1994;41:65-71.
- 44- Chan PS, Caron JP, Orth MW. Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate. *J Rheumatol*. Jul 2006;33:7: 1329-40.
- 45- Taylan FG, *et al.* Chondrogenic effect of the perichondrium graft on the internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint of the rabbit. *J Craniomaxillofac Surg*. Jul 2011;39: 5: 351-58.
- 46- Oegema TR Jr., *et al.* Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits. *Arthritis & Rheumatism*. Sep 2002;46: 9: 2495–503.
- 47- Mittelstaedt D, Kahn D, Xia Y. Topographical and depth-dependent glycosaminoglycan concentration in canine medial tibial cartilage 3 weeks after anterior cruciate ligament transection surgery—a microscopic imaging study. *Quant Imaging Med Surg*. Dec 2016;6:6:648-60.
- 48- Axelsson S, Holmlund A, Hjerpe A. Glycosaminoglycans in normal and osteoarthritic human temporomandibular joint disks. *Acta Odontol Scand*. Apr 1992a;50: 2: 113-9.
- 49- Axelsson S. Human and experimental osteoarthrosis of the temporomandibular joint: morphological and biochemical studies. *Swed Dent J Suppl*. 1993;92: 1.

- 50- Axelsson S. Human and experimental osteoarthritis of the temporomandibular joint: morphological and biochemical studies. *Swed Dent J Suppl.* 1993;92: 1.
- 51- Dijkgraaf LC, *et al.* The structure, biochemistry, and metabolism osteoarthritic cartilage: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg Oct* 1995b;53:10:1182-1192.
- 52- Bascoul-Colombo C, *et al.* Glucosamine hydrochloride but not chondroitin sulfate prevents cartilage degradation and inflammation induced by interleukin-1 α in bovine cartilage explants. *Cartilage.* Jan 2016;7: 1: 70-81.
- 53- Lippiello L, Han S. Articular cartilage response to glucosamine HCL and chondroitin sulfate under simulated conditions of joint stress. American Orthopaedic Society for Sports Medicine 28th Annual Meeting, Orlando, FL. June 30–July 3, 2002.
- 54- Dechant JE, *et al.* Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage metabolism. *Equine Vet J.* May 2005;37: 3: 227-31.

ANEXO A - Figuras e Tabelas

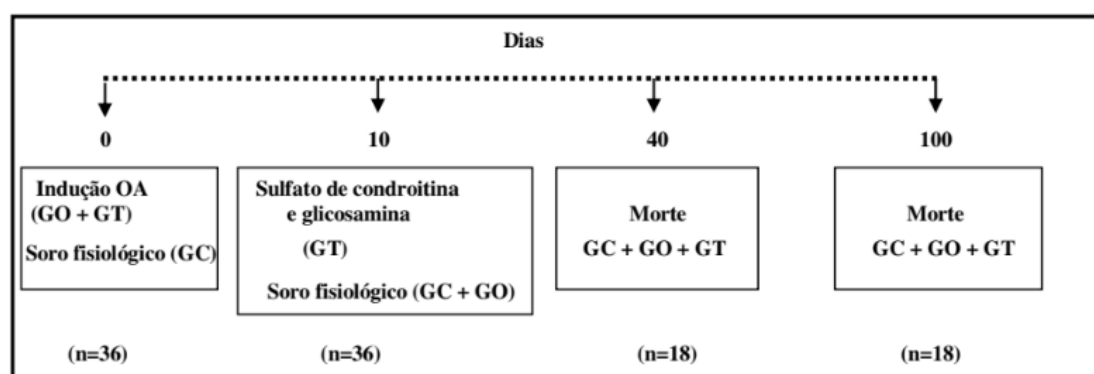


Figura 01: Cronograma do estudo.

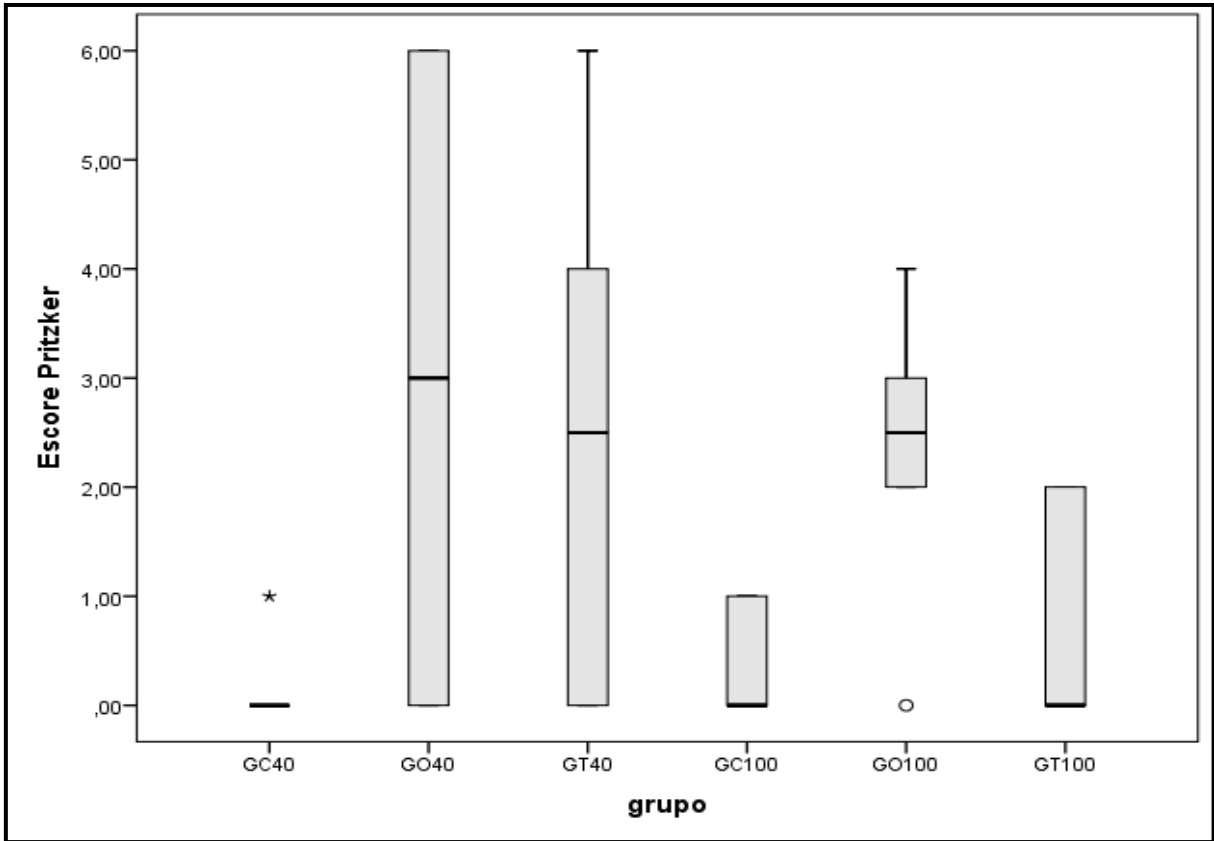


Figura 02: Avaliação da severidade da OA nos diferentes grupos, por meio do escore de Pritzker *et al.*(2006)

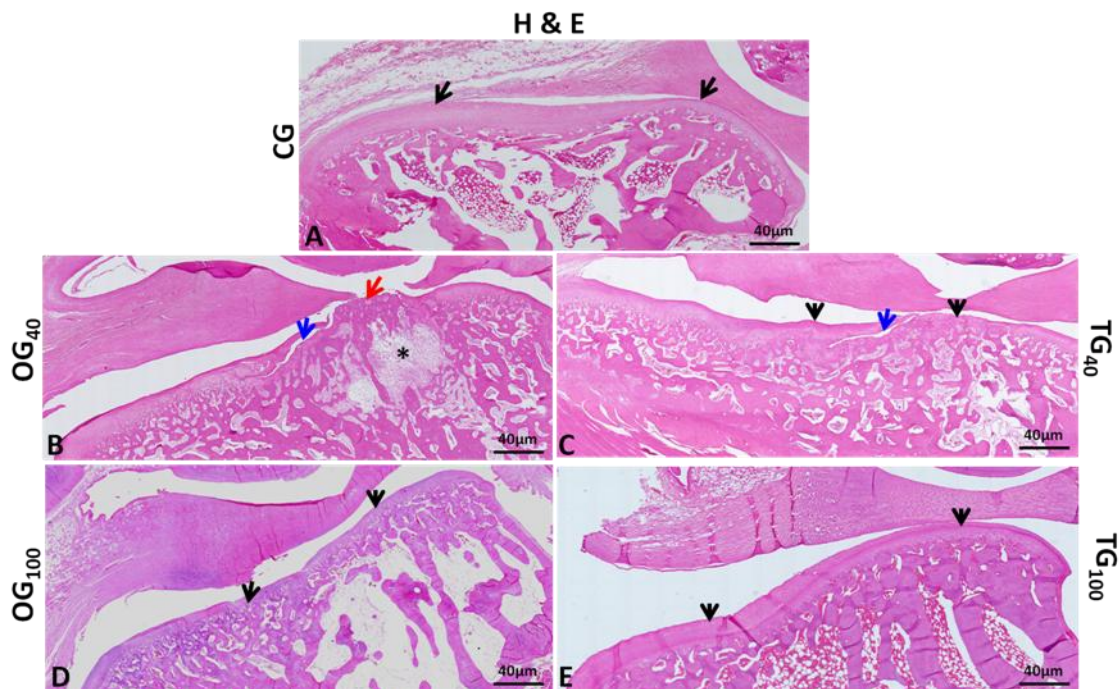


Figura 03: Aspecto histológico da superfície dos côndilos mandibulares. (A) ATM apresentando estruturas teciduais normais e côndilo anatômico; convexidade característica na região anterior; camada de cartilagem normal (setas) e disco articular íntegro. (B e D) ATM apresentando alterações anatômicas provocadas pela OA. Achatamento e deformação condilar; redução de espessura da camada de cartilagem (setas pretas); perda da camada de cartilagem (seta vermelha); fenda atingindo o tecido ósseo subcondral (seta azul); irregularidades subcondrais; degeneração de trabéculas ósseas com formação de cisto intra-articular (*); rompimento do disco articular. (C) GT₄₀ – Observa-se redução da espessura da camada de cartilagem articular (setas pretas); presença de importante fenda iniciando na superfície articular e estendendo-se em profundidade (seta azul); disco articular constricto na região intermediária. (E) GT₁₀₀ – Observa-se a normalidade dos tecidos; côndilo articular anatômico; convexidade típica condilar na região anterior; camada de cartilagem sem alterações (setas); disco articular íntegro. (ATM: articulação temporomandibular; OA: osteoartrite; GT₄₀: grupo tratamento 40 dias; GT₁₀₀: grupo tratamento 100 dias).

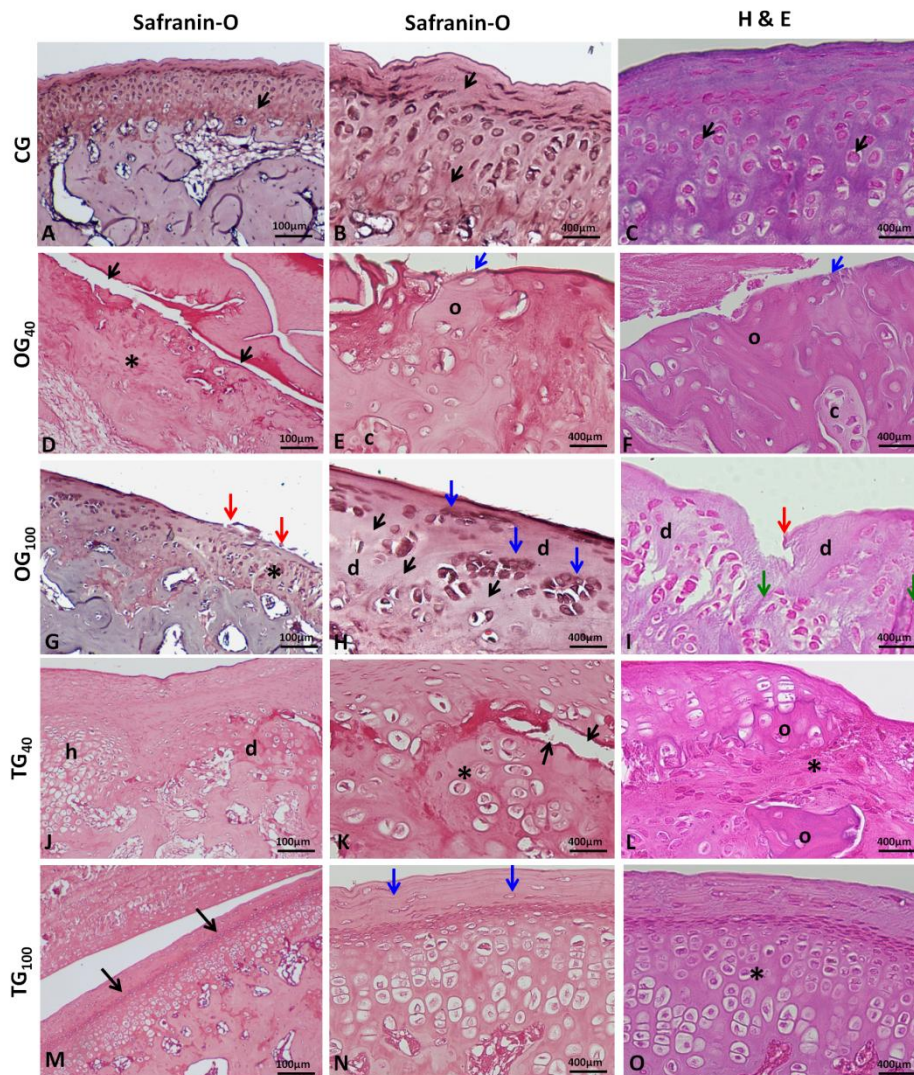


Figura 04: Aspecto histológico da superfície dos côndilos mandibulares. (A, B e C) Camada de cartilagem articular normal; coloração marcante por safranina-O, indicando presença normal de proteoglicanos (setas pretas); presença de condrócitos e processo de ossificação dentro do padrão de normalidade (setas vermelhas). (D, E e F) Ausência de definição da camada de cartilagem articular e degeneração celular (*); presença de fendas (setas pretas); perda da camada de cartilagem e do tecido conjuntivo fibroso (setas azuis); áreas de ossificação heterotópicas superficiais (o) envolvendo regiões de cartilagem (c). (G, H e I) Redução da espessura da cartilagem e irregularidades subcondrais (*); redução da coloração por Safranina-O, indicando perda de proteoglicanos (setas pretas); erosão e descontinuidade da superfície da cartilagem (setas vermelhas); formação de *clusters* celulares (setas azuis) próximos a áreas de degeneração celular (d); formação de fibrilações (setas verdes). (J, K e L) Área hipertrófica (h) como tentativa de reparo da cartilagem em área de degeneração (d); fenda em profundidade (setas pretas); perda da definição da camada de cartilagem (*); formação óssea heterotópica em meio à cartilagem degenerada (o). (M, N e O) Coloração normal por Safranina-O, indicando presença de proteoglicanos (setas pretas); superfície articular uniforme e tecido conjuntivo fibroso organizado (setas azuis); camada de cartilagem com espessura e subdivisões dentro da normalidade (*).

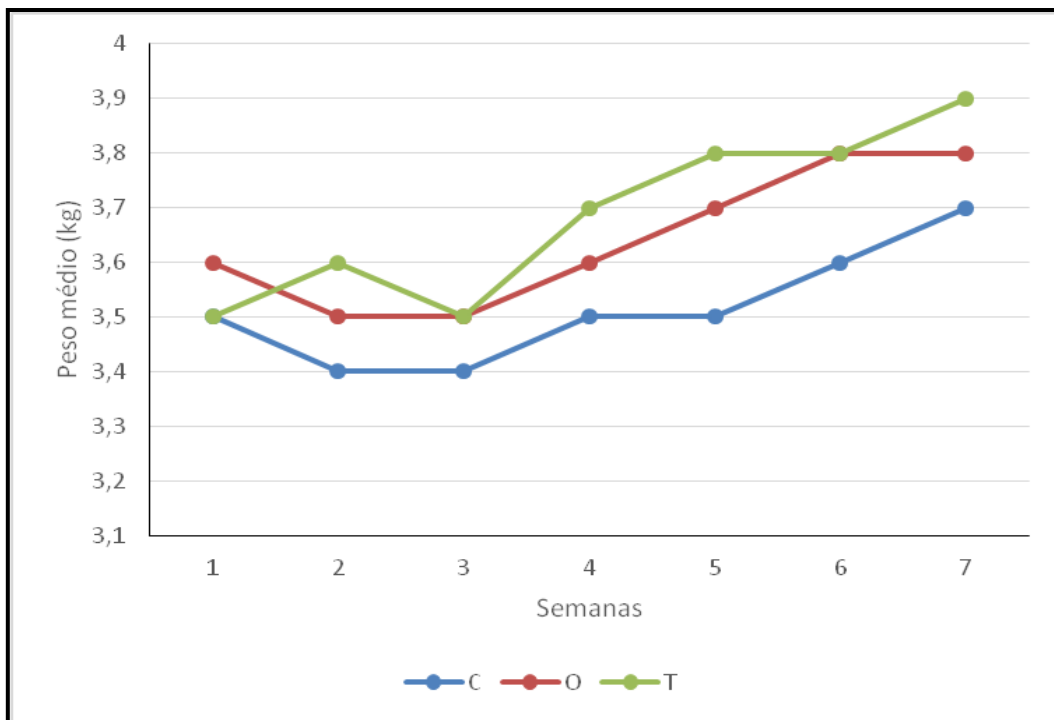


Figura 05: Análise do peso corpóreo dos animais no tempo de 40 dias.

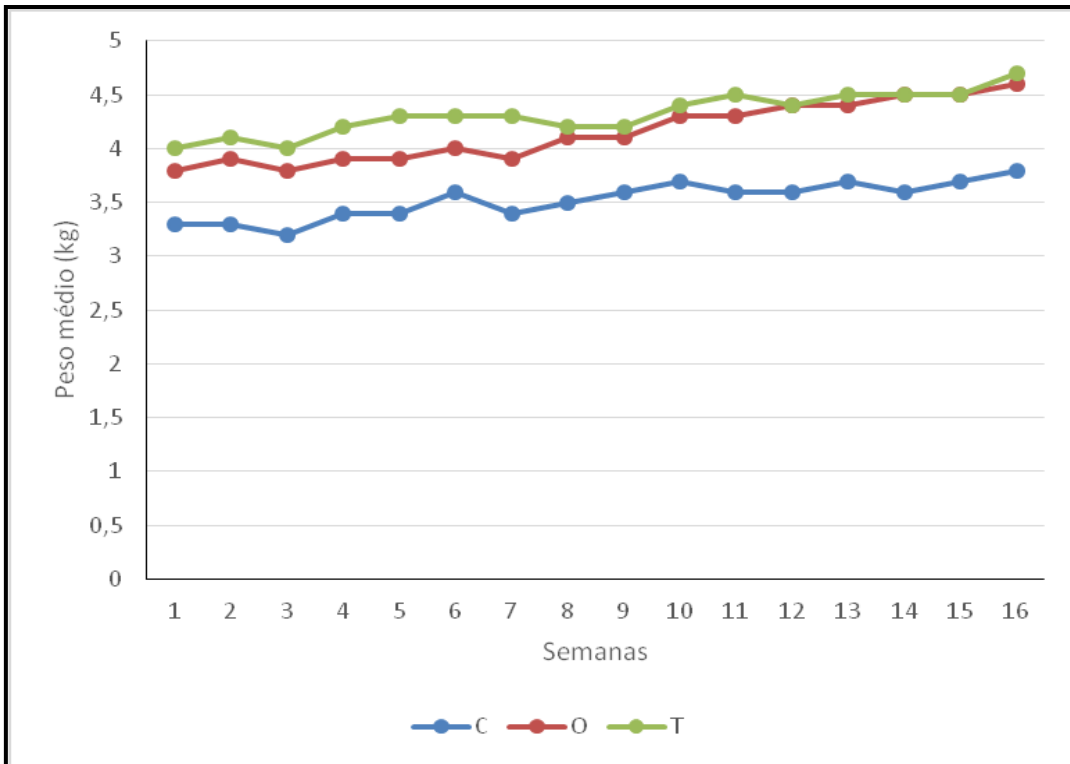


Figura 06: Análise do peso corpóreo dos animais no tempo de 100 dias.

Tabela 01: Concentração de GAG's na comparação GC x GO.

<i>Tratamento</i>	<i>40 + 100 dias</i>	
	<i>Disco</i>	<i>Cartilagem</i>
<i>Controle</i>	$3,02 \pm 0,82^*$	$7,57 \pm 4,25$
<i>Osteoartrite</i>	$4,04 \pm 1,37$	$8,78 \pm 3,73$
<i>p ($\leq 5\%$)</i>	<i>0,041</i>	<i>0,468</i>

* $m \pm dp$ (μ GAG's/mg peso úmido)

Tabela 02: Concentração de GAG's na comparação GC x GT.

<i>Tratamento</i>	<i>40 + 100 dias</i>	
	<i>Disco</i>	<i>Cartilagem</i>
<i>Controle</i>	<i>3,02±0,82*</i>	<i>7,57±4,25</i>
<i>Tratamento</i>	<i>3,64±1,54</i>	<i>8,83±2,61</i>
<i>p (≤ 5%)</i>	<i>0,241</i>	<i>0,391</i>

**m±dp (μ GAG's/mg peso úmido)*

GUIDE FOR AUTHORS

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed. Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online

Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms>. For additional enquiries please visit our Support Center. Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office (ijoms@elsevier.com) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial

Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload the declarations page (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate that ethical approval was given – all studies involving patients must have patient consent and ethical committee approval, please refer to the section on ‘Ethics’ below. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements

section with the headings below. Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest, and to indicate whether ethical approval and patient consent were given and you must also upload with it the IRB approval or exemption letter. This applies to original research articles carried out on humans, including observational studies and case series. Ethical committee approval or exemption is not needed for systematic review articles or articles that are not based on humans or animals. Research on animal studies should be uploaded with the appropriate ethical approval for the study. If the ethical approval or exemption letter is not in English please provide the text in English. Lastly you must confirm that all authors have agreed to the submission.

PLEASE NOTE that all funding must be declared at first submission, as the addition of funding at acceptance stage may invalidate the acceptance of your manuscript.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data
(2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content
(3) final approval of the version to be submitted.

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. (pdf version or word version) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics

Any manuscript concerned with human subjects, medical records, or human tissue that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles stated in the Declaration of Helsinki “Ethical Principles for Medical Research Involving ‘Human Subjects’”, adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and as amended most recently by the 64th World Medical Assembly, Fontaleza, Brazil, October 2013.

The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate Ethical Committee related to the institution(s) in which the work was performed, and that subjects gave informed consent to the work. The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery requires institutional Ethics Committee approval for all human studies. For retrospective studies of records either a statement of approval or a statement of exemption from the Committee is appropriate. This statement should be provided upon submission of the manuscript.

Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

Patient

confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, The Editor and Publisher must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the Editorial Office on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. *If consent for publication has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.*

Language

Editing

Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices/translationservices> or visit our Support Center for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions.

Article

Types

The following contributions will be accepted for publication. *Please take careful note of the maximum length where applicable.* Overlength articles will be returned to the authors without peer review:

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 3000 words and 30 references
- research papers: no more than 3000 words and 40 references
- review papers - no limit on length or number of references
- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 1500 words, 10 references and 2 figures
- case reports - no more than 1500 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

All authors must have contributed to the paper, not necessarily the patient treatment. Technical notes and case reports are limited to a maximum of 4 authors, in exceptional circumstances, 5.

Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be:

- focused
- based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analysing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion
- well written in simple, scientific English grammar and style
- presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal

• Note the comment above relating to case reports. • Please include a paragraph in your cover letter where you explain what is new about your study and why it will have an impact on your field of research.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within **3 months**; in exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round. Each line must be numbered.

Format

Observational or Case Cohort Studies, as well as Case Series must be presented in conformance with STROBE guidelines: <http://www.strobe-statement.org>

Randomized Controlled Trials must be presented in conformance with CONSORT guidelines: <http://www.consort-statement.org>

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be presented according to PRISMA guidelines: <http://www.prisma-statement.org>

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page:

- title page
- abstract
- text
- acknowledgements

- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title *page*

The title page should give the following information:

- title of the article
- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent
- sources of support in the form of grants
- key words.

If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section.

Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated
- Review briefly the pertinent literature
- State the rationale for the study
- Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
- Should be written in the present tense

Materials

and

Methods

- Give the full details, limit references
- Should be written in the past tense
- Include

exact technical specifications, quantities and generic names• Limit the number of subheadings, and use the same in the results section• Mention statistical method• Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results• Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data• Show how results agree/contrast with previous work• Discuss the implications of your findings• State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F=2.34$; $df=3,46$; $P<0.001$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK). The minus sign should be -.

If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the

latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with 1 for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen¹⁴ showed..."; "each technique has advantages and disadvantages⁵⁻¹³." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al³⁷ identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov.uk) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Data References This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent

identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Examples:

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476.

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. *Fundamentals of oral surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220.

Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: *Fluorine chemistry*. New York: Academic Press, 1965: 135.

Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

Please note you can only include up to a maximum of 6 tables and/ or figures within your article.

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly. **The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.**

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in).

The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. **The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.**

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within **48 hours**. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted

for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a customize Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on Science Direct. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final version of the article is available open access on Science Direct and can be shared through the article DOI link.

Accepted

Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html> There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed:

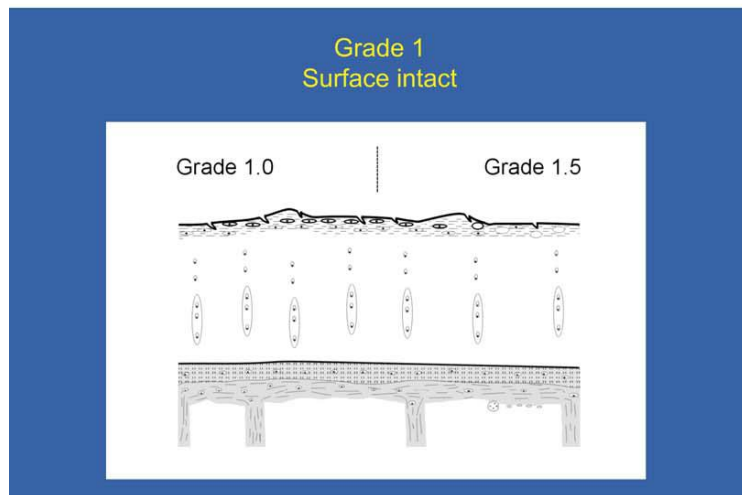
1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.
2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.
3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary

research or large clinical studies rather than a case report.

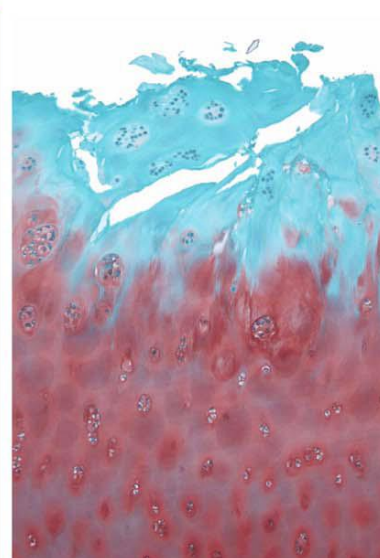
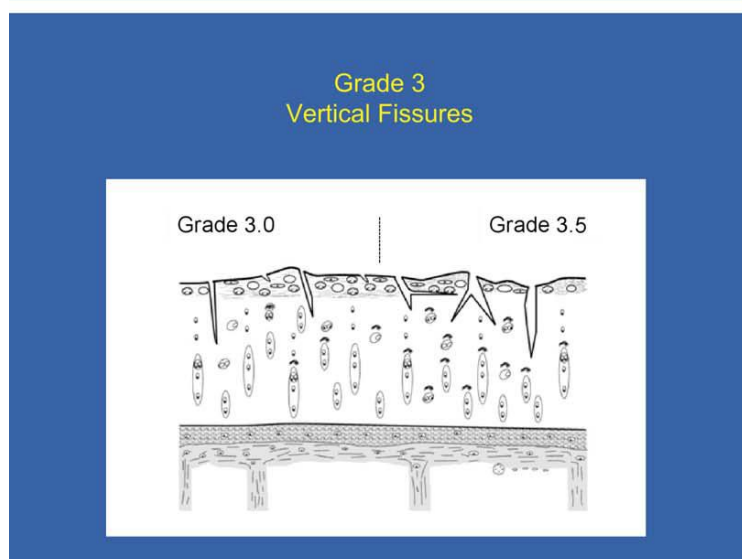
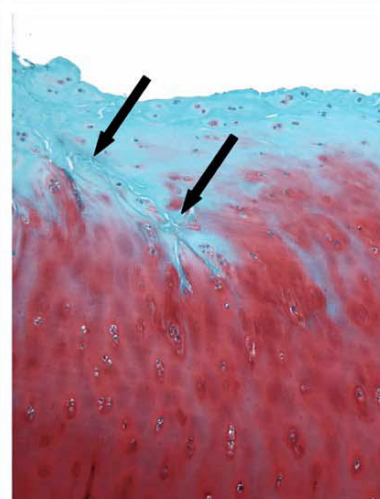
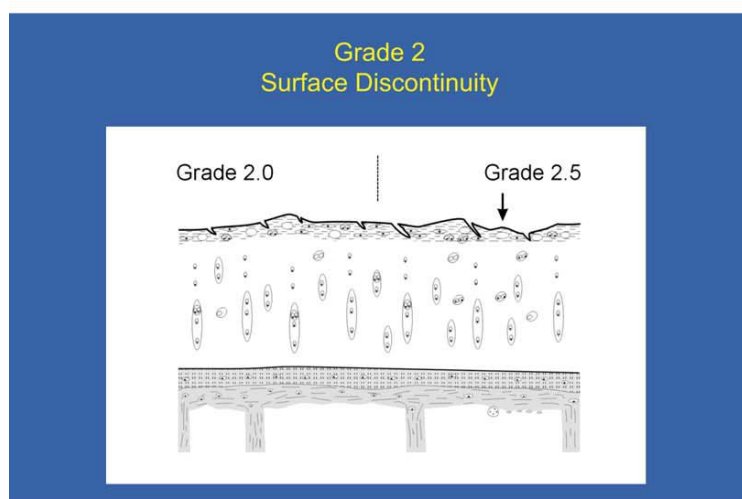
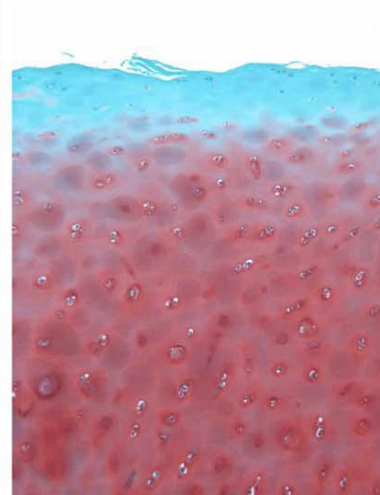
4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.
5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.
6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.
7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.
8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.

ANEXO C – Cortes histológicos referentes à escala proposta por Pritzker *et al.*, (2006) utilizada para determinação da severidade da OA, compreendida em graus de 0 a 6.

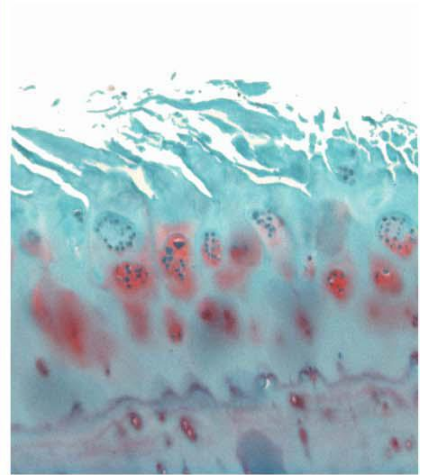
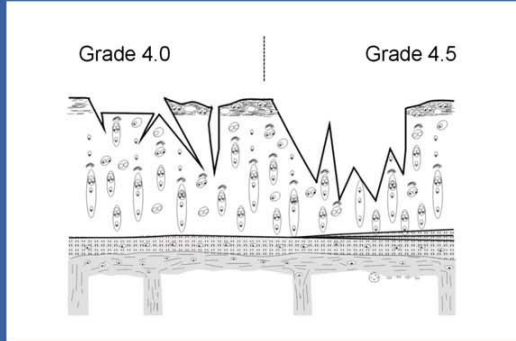
A



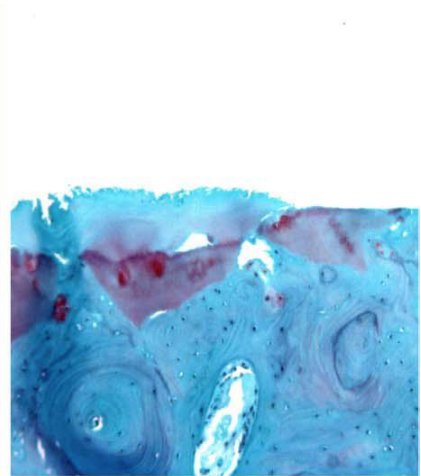
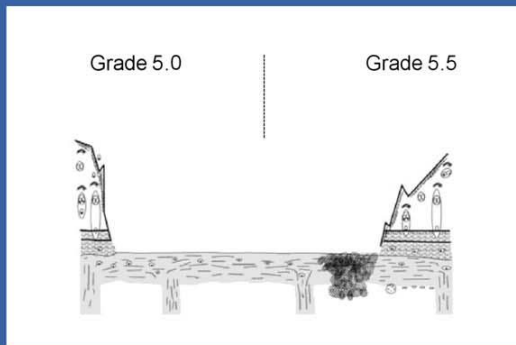
B



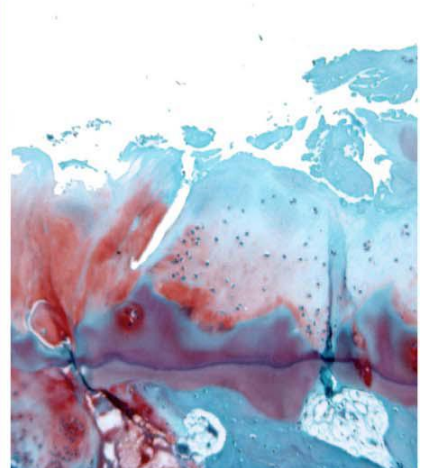
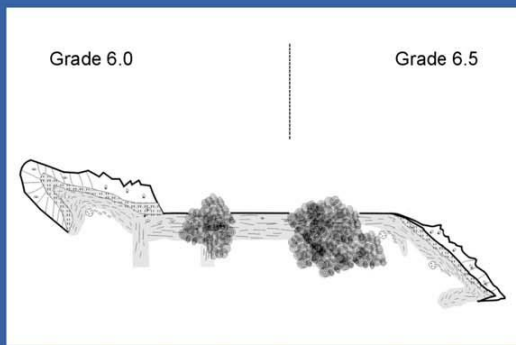
Grade 4
Erosion



Grade 5
Denudation



Grade 6
Deformation



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A OA é uma doença articular crônica de alta prevalência na população de indivíduos com 60 anos de idade ou mais. Entretanto, numerosos estudos epidemiológicos têm mostrado o aumento da ocorrência na população mais jovem. Segundo a Sociedade Europeia de Desenvolvimento Clínico e Econômico para aspectos relacionados à Osteoporose e Osteoartrite, os custos desta patologia são substanciais, incluindo prevenção, tratamento farmacológico, exames médicos e também custos indiretos, como menor produtividade resultante da restrição ao trabalho (Mantovani *et al.*, 2016).

A AO-ATM é uma doença muito prevalente. Estudos mostram que, em torno de 75% da população mundial adulta apresenta pelos menos um sintoma relacionado à disfunção temporomandibular (Sheets *et al.*, 2006). As alterações degenerativas decorrentes da OA não são totalmente compreendidas e, portanto, ainda requerem a busca de novos tratamentos e possibilidades de regeneração dos tecidos articulares. Ao mesmo tempo, há uma necessidade crescente de tratamentos com intervenções menos invasivas e com resultados mais favoráveis aos pacientes. Entretanto, a condução dos tratamentos é desafiadora devido ao baixo potencial de reparo da cartilagem e à sua ausência de vascularização (Vasiliadis e Tsikopoulos, 2017).

Assim, a tendência das pesquisas é a realização de estudos voltados à bioengenharia dos tecidos, testando processos de reparo, envolvendo novos medicamentos, técnicas e biomateriais, os quais visam o restabelecimento da função e a qualidade de vida dos pacientes. Com a proposta de avaliar o efeito dos SCG na progressão da OA-ATM como droga modificadora de estrutura dos tecidos articulares, o

presente estudo mostrou resultados favoráveis à indicação dessa terapêutica na prática clínica. Todavia, frente ao uso pouco frequente dos SCG para a OA-ATM e à escassa quantidade de publicações que testem seus efeitos sobre esta articulação, novos estudos são fundamentais para avaliar sua real eficácia como agentes que possam reverter alterações degenerativas dos tecidos articulares.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almarza, A. J. *et al.* Biochemical analysis of the porcine temporomandibular joint disc. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 44, no. 2, p. 124–128, Apr 2006.

Arnett, G. W.; Milam, S. B.; Gottesman, L. Progressive mandibular retrusion: idiopathic condylar resorption. Part II. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, v. 110, no. 2, p. 117-27, Aug 1996.

Artuzi, F. E. *et al.* Rabbit model for osteoarthritis of the temporomandibular joint as a basis for assessment of outcomes after intervention. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 54, no. 5, p. e33-7, Jun 2016.

Avery, J. K. *Desenvolvimento e Histologia Bucal*. Porto Alegre: Artmed, 3ª edição, 2005.

Axelsson, S.; Holmlund, A.; Hjerpe, A. An experimental model of osteoarthritis in the temporomandibular joint of the rabbit. *Acta Odontol Scand*, v. 50, no. 5, p. 273-80, Oct 1992.

Axelsson, S.; Holmlund, A.; Hjerpe, A. Glycosaminoglycans in normal and osteoarthritic human temporomandibular joint disks. *Acta Odontol Scand*, v. 50, no. 2, p. 113-9, Apr 1992a.

Axelsson, S. Human and experimental osteoarthritis of the temporomandibular joint: morphological and biochemical studies. *Swed Dent J Suppl*, v. 92, no. 1, 1993.

Bascoul-Colombo, C. *et al.* Glucosamine hydrochloride but not chondroitin sulfate prevents cartilage degradation and inflammation induced by interleukin-1 α in bovine cartilage explants. *Cartilage*, v. 7, no. 1, p. 70-81, Jan 2016.

Bassleer, C.; Rovati, L.; Franchimont, P. Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 6, no. 6, p. 427-34, Nov 1998.

Bechtold, T. E. *et al.* Osteophyte formation and matrix mineralization in a TMJ osteoarthritis mouse model are associated with ectopic hedgehog signaling. *Matrix Biol*, v. 52-54, p. 339-54, May 2016.

Blaustein, D. I.; Scapino, R. P. Remodeling of the temporomandibular joint disk and posterior attachment in disk displacement specimens in relation to glycosaminoglycan content. *J Plast Recon Surg*, v. 78, no. 6, p. 756-64, Dec 1986.

Bove, S. E. *et al.* Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 11, no. 11, p. 821-830, Nov 2003.

Brandt, K. D. Toward pharmacologic modification of joint damage in osteoarthritis. *Ann Intern Med*, v. 122, no. 11, p. 874-5, Jun 1995.

Breul, R. Biomechanical analysis of stress distribution in the temporomandibular joint. *Annals of Anatomy*, v. 189, no. 4, p. 329–35, 2007.

Camino, J. C. A.; Delgado, E. V.; Escoda, C. G. Use of autologous conditioned serum (Orthokine) for the treatment of the degenerative osteoarthritis of the temporomandibular joint. Review of the Literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 18, no. 3, p. e433-e438, May 2013.

Carvalho, R. S.; Yen, E. H.; Suga, D. M. Glycosaminoglycan synthesis in the rat articular disk in response to mechanical stress. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, v. 107, no. 4, p. 401-10, Apr 1995

Chan, P. S.; Caron, J. P.; Orth, M. W. Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate. *J Rheumatol*, v. 33, no. 7, p. 1329-40, Jul 2006.

Chiu, P. R. *et al.* Vitamin C Protects Chondrocytes against Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis by Multiple Pathways. *Int J Mol Sci*, v. 18, no. 1, Dec 2016.

Cho, B. H.; Ahn, Y. W.; Jung, Y. H. Comparison of mandibular morphology between patients with temporomandibular joint osteoarthritis and asymptomatic normal subjects. *Quintessence Int.*, v. 40, no. 8, p. 49-54, Sep 2009.

Cledes, G. *et al.* Validation of a chemical osteoarthritis model in a rabbit temporomandibular joint: a compliment to biomechanical models. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 35, no. 11, p. 1026-1033, Nov 2006.

Clegg, D. O. *et al.* Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med*, v. 354, no.8, p. 795-808, Feb 2006.

Damlar, I.; Esen, E.; Tatli, U. Effects of glucosamine-chondroitin combination on synovial fluid IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 20, no. 3, p. e278-283, May 2015.

Davies, P. S. *et al.* Disease-modifying osteoarthritis drugs: in vitro and in vivo data on the development of DMOADs under investigation. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 22, no. 4, p. 423-41, Apr 2013.

Dechant, J. E. *et al.* Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage metabolism. *Equine Vet J*, v. 37, no. 3, p. 227-31, May 2005.

Delatte, M. *et al.* Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: the femoral head and the mandibular condyle. *Eur J Oral Sci*, v. 112, no. 2, p. 156-62, Apr 2004.

Detamore, M. S.; Athanasiou, K. A. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng*, v. 9, no. 6, p. 1065-1087, Dec 2003.

Dijkgraaf, L.C., *et al.* Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 53, no. 8, p. 924-929, Aug 1995a.

Dijkgraaf, L.C., *et al.* The structure, biochemistry, and metabolism osteoarthritic cartilage: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 53, no. 10, p. 1182-1192, Oct 1995b.

Erdem, E.; Alkan, A. The use of acrylic marbles for interposition arthroplasty in the treatment of temporomandibular joint ankylosis: follow-up of 47 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, v. 30, no. 1, p. 32-36, Feb 2001.

Fazaeli, S. *et al.* The contribution of collagen fibers to the mechanical compressive properties of the temporomandibular joint disc. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 24, no. 7, p. 1292-301, Jul 2016.

Fenton, J. I. *et al.* Effect of glucosamine on interleukin-1-conditioned articular cartilage. *Equine Vet J Suppl*, v. 34, p. 219-23, Sep 2002.

Fujisawa, T. *et al.* A repetitive, steady mouth opening induced an osteoarthritis-like lesion in the rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res*, v. 82, no. 9, p. 731-735, Sep 2003.

Guingamp, C. *et al.* Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum*, v. 40, no. 9, p.1670-1679, Sep 1997.

Hall, D. H.; Nickerson, JR.; McKenna, S. J. Modified condylotomy for treatment of the painful temporomandibular joint with a reducing disc. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 51, no. 2, p. 133-142, Feb 1993.

Herrero-Beaumont, G. *et al.* Glucosamine sulfate in the treatment of knee osteoarthritis symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled study using acetaminophen as a side comparator. *Arthritis Rheum*, v. 56, no. 2, p. 555-67, Feb 2007.

Herrero-Beaumont, G. *et al.* Effect of chondroitin sulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 843-51, 2008.

Hochberg, M. C. *et al.* Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. *Ann Rheum Dis*, v. 75, no. 1, p. 37-44, Jan 2016.

- Imagawa, K. *et al.* The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes-implications for osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 405, no. 3, p. 362-67, Feb 2011.
- Ingawalé, S.; Goswami, T. Temporomandibular joint: disorders, treatments, and biomechanics. *Ann Biomed.Eng*, v. 37, no. 5, p. 976–96, May 2009.
- Ishimaru, J.; Goss, A. N. A model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 50, no. 11, p. 1191-1195, Nov 1992.
- Janusz, M. J. *et al.* Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 9, no. 8, p. 751-760, Nov 2001.
- Jiang, L. *et al.* Monosodium iodoacetate induces apoptosis via the mitochondrial pathway involving ROS production and caspase activation in rat chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*, v. 31, no. 3, p. 364-9, Mar 2013.
- Jong, J.G.; Wevers, R. A.; Liebrand-van Sambeek, R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem*, v. 38, no. 6, p. 803-7, Jun 1992.
- Kahan, A. *et al.* Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*, v. 60, no. 2, p. 524–33, Feb 2009.
- Kalpakci, K. N. *et al.* An interspecies comparison of the temporomandibular joint disc. *J Dent Res*, v. 90, no. 2, p. 193–98, Feb 2011.
- Kamarul, T. *et al.* A preliminary study of the effects of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate on surgically treated and untreated focal cartilage damage. *Eur Cell Mater*, v. 15, no. 21, p. 259-71, Mar 2011.
- Kardel, R. *et al.* Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with painful clicking and osteoarthritis in the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 32, no. 4, p. 390-6, Aug 2003.
- Kopp, S. Topographical distribution of sulfated glycosaminoglycans in human temporomandibular joint disks: a histochemical study of an autopsy material. *J Oral Pathol*, v. 7, no. 5, p. 283-94, Oct 1978.
- Kubo, M. *et al.* Chondroitin sulfate for the treatment of hip and knee osteoarthritis: current status and future trends. *Life Sci*, v. 85, no. (13-14), p. 477-83, Sep 2009.
- Kuroda, S. *et al.* Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 17, no. 11, p. 1408-15, Nov 2009.

- Largo, R. *et al.* Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen-induced arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 18, Suppl 1, S17-23, Jun 2010.
- Lequesne, M. *et al.* Guidelines for testing slow acting drugs in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*, v. 41, p. 65-71, Sep 1994.
- Lippiello, L. *et al.* In vivo chondroprotection and metabolic synergy of glucosamine and chondroitin sulfate. *Clinical Orthop Relat Res*, no. 381, p. 229-40, Dec 2000.
- Lippiello, L.; Han, S. Articular cartilage response to glucosamine HCL and chondroitin sulfate under simulated conditions of joint stress. American Orthopaedic Society for Sports Medicine 28th Annual Meeting, Orlando, FL. June 30–July 3, 2002.
- Luder, H. U. Postnatal development, aging, and degeneration of the temporomandibular joint in humans, monkeys and rats. Ann Arbor: The University of Michigan; 1993.
- Machado, E.; Machado, P.; Cunali, P. A. Utilização de sulfato de condroitina e sulfato de glicosamina nas alterações degenerativas da ATM: uma revisão sistemática. *Dental Press J Orthod*, v. 17, n. 4, p. 19.e1-19.e5, Jul-Ago 2012.
- Manno, R. L. *et al.* OARSI-OMERACT initiative: defining thresholds for symptomatic severity and structural changes in disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD) clinical trials. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 20, no. 2, p. 93-101, Feb 2012.
- Mantovani, V.; Maccari, F.; Volpi, N. Chondroitin Sulfate and Glucosamine as Disease Modifying Anti- Osteoarthritis Drugs (DMOADs). *Curr Med Chem*, v. 23, no. 11, p. 1139-51, 2016.
- Martel-Pelletier, J. *et al.* First-line analysis of the effects of treatment on progression of structural changes in knee osteoarthritis over 24 months: data from the osteoarthritis initiative progression cohort. *Ann Rheum Dis*, v. 74, no. 3, p. 547-56, Mar 2015.
- Mercuri, L. G. Osteoarthritis, osteoarthrosis, and idiopathic condylar resorption. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, v. 20, no. 2, p. 169-183, May 2008.
- Mills, D. K. *et al.* An animal model for studying mechanisms in human temporomandibular joint disc derangement. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 52, no. 12, p. 1279-92, Dec 1994.
- Mittelstaedt, D.; Kahn, D.; Xia, Y. Topographical and depth-dependent glycosaminoglycan concentration in canine medial tibial cartilage 3 weeks after anterior cruciate ligament transection surgery—a microscopic imaging study. *Quant Imaging Med Surg*, v. 6, no. 6, p. 648-60, Dec 2016.
- Morreale, P. *et al.* Comparison of the antiinflammatory efficacy of chondroitin sulfate and diclofenac sodium in patients with knee osteoarthritis. *J Rheumatol*, v. 23, no. 8, p. 1385-91, Aug 1996.

- Nakano, T.; Scott, P. G. Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. *Arch Oral Biol*, v. 41, no. 8-9, p. 845-53, Aug 1996.
- Nanci A. Ten Cate *Histologia Oral: Desenvolvimento, estrutura e função*. Rio de Janeiro: Elsevier, 8ª edição, 2013.
- Nguyen, P. *et al.* A randomized double-blind clinical trial of the effect of chondroitin sulfate and glucosamine hydrochloride on temporomandibular joint disorders: a pilot study. *Cranio*, v. 19, no. 2, p. 130-139, Feb 2001.
- Nishimura, M. *et al.* Role of chondroitin sulfate-hyaluronan interactions in the viscoelastic properties of extracellular matrices and fluids. *Biochim Biophys Acta*, v. 1380, no. 1, p. 1-9, Mar 1998.
- Oegema, T. R. Jr. *et al.* Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits. *Arthritis & Rheumatism*, v. 46, no. 9, p. 2495-503, Sep 2002.
- Paegle, D.I.; Holmlund, A. B.; Hjerpe, A. Matrix glycosaminoglycans in the temporomandibular joint in patients with painful clicking and chronic closed lock. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 32, no. 4, p. 397-400, Aug 2003.
- Pavelká, K. *et al.* Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med*, v. 162, no. 18, p. 2113-23, Oct 2002.
- Pelletier, Pelletier, Abramson. Osteoarthritis, an Inflammatory Disease. *Arthritis & Rheumatism*, v. 44, no. 6, p. 1237-47, Jun 2001.
- Pritzker, K. P. H. *et al.* Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 14, no. 1, p. 13-29, Jan 2006.
- Puricelli, E. Artroplastia biconvexa para tratamento da anquilose da articulação têmporo-mandibular. *Rev Fac Odontol Porto Alegre*, v. 38, n. 1, p. 23-27, Jul 1997.
- Ramirez-Yañez, G. O. Cartilagem condilar da mandíbula: uma revisão. *Rev Int Ortop Func*, v. 1, no. 1, p. 85-94, 2004.
- Reginster, J. Y. *et al.* Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*, v. 357, no. 9252, p. 251-256, Jan 2001.
- Reichenbach, S. *et al.* Meta-analysis: chondroitin for osteoarthritis of the knee or hip. *Ann Intern Med*, v. 146, no. 8, p. 580-90, Apr 2007.
- Rezende, M. U. *et al.* Diacerhein versus glucosamine in a rat model of osteoarthritis. *Clinics*, v. 61, no. 5, p. 461-466, Oct 2006.

Robinson, P. D. Articular cartilage of the temporomandibular joint: can it regenerate? *Ann R Coll Surg Engl*, v. 75, no. 4, p. 231-6, Jul 1993.

Roman-Blas, J. A. et al. The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. *Eur J Pharmacol*, v. 5, no. 794, p. 8-14, Jan 2017.

Ross, M. H.; Pawlina, W. *Histologia: texto e atlas: em correlação com a biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 5ª edição, 2009.

Sakamoto, Y.; Takano, Y. Morphological influence of ascorbic acid deficiency on endochondral ossification in osteogenic disorder Shionogi rat. *Anat Rec*, v. 268, no. 2, p. 93-104, Oct 2002.

Sawhney, C.B. Bony ankylosis of the temporomandibular joint: follow-up of 70 patients treated with arthroplasty and acrylic spacer interposition. *Plast Reconstr Surg*, v. 77, no. 1, p. 29-40, Jan 1986.

Scapino, R. P.; Obrez, A.; Greising, D. Organization and function of the collagen fiber system in the human temporomandibular joint disk and its attachments. *Cells Tissues Organs*, v. 182, no. (3-4), p. 201-25, 2006.

Schmolke, C. The relationship between the temporomandibular joint capsule, articular disc and jaw muscles. *J Anat*, v. 184, (pt 2). 335-45, Apr 1994.

Sheets Jr, D. W.; Okamoto, T.; Dijkgraaf, L.C. et al. Free radical damage in facsimile synovium: correlation with adhesion formation in osteoarthritic TMJs. *Journal of Prosthodontics*, v.15. no.1, p. 9-19, 2006.

Silva Junior, Francisco Saraiva. *Osteoartrite experimental em ratos: efeito de sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina sobre a incapacitação articular e a lesão da cartilagem articular*. São Paulo: USP, 2007. 84 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Simánek, V. *et al.* The efficacy of glucosamine and chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: are these saccharides drugs or nutraceuticals? *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v. 149, no. 1, p. 51-6, Jun 2005.

Singh, M.; Detamore, M. S. Tensile properties of the mandibular condylar cartilage. *J Biomech Eng*, v. 130, no. 1, Feb 2008.

Silver, F. H.; Bradica, G.; Tria, A. Elastic energy storage in human articular cartilage: estimation of the elastic modulus for type II collagen and changes associated with osteoarthritis. *Matrix Biol*, v. 21, no. 2, p. 129-37, Mar 2002.

- Sinsel, N. K.; Opdebeeck, H.; Guelinckx, P. J, N. K.; Opdebeeck, H.; Guelinckx, P. J. Mandibular condylar growth alterations after unilateral partial facial paralysis: an experimental study in the rabbit. *Plast Reconstr Surg*, v. 109, no. 1, p. 181-9, Jan 2002.
- Shankland, W. E. The effects of glucosamine and chondroitin sulfate on osteoarthritis of the TMJ: a preliminary report of 50 patients. *Cranio*, v. 16, no. 4, p. 230-235, Oct 1998.
- Shen, G.; Darendeliler, M. A. The adaptive remodeling of condylar cartilage— a transition from chondrogenesis to osteogenesis. *J Dent Res*, v. 84, no. 8, p. 691-9, Aug 2005.
- Souich, P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. *Pharmacol Ther*, v. 142, no. 3, p. 362-74, Jun 2014.
- Takada, K.; Miyawaki, S.; Tatsuta, M. The effects of food consistency on jaw movement and posterior temporalis and inferior orbicularis oris muscle activities during chewing in children. *Arch Oral Biol*, 1994, v. 39, no. 9, p. 793-805, Sep 1994.
- Tanaka, E. *et al.* The proteoglycan contents of the temporomandibular joint disc influence its dynamic viscoelastic properties. *J Biomed Mater Res Part A*, v. 65, no. 3, p. 386-92, Jun 2003.
- Tanaka, E, van Eijden, T. Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. *Oral Biology & Medicine*, v. 14, no. 2, p. 138–50, 2003.
- Tasanen, A.; Lamberg, M. A. Closed condylotomy in the treatment of osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Int J Oral Surg.*, v. 3, no. 3, p. 102-110, 1974.
- Taşkesen, A. *et al.* Glucosamine-chondroitin sulphate accelerates tendon-to-bone healing in rabbits. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi*, v. 26, no. 2, p. 77-83, 2015.
- Taylan, F. G. *et al.* Chondrogenic effect of the perichondrium graft on the internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint of the rabbit. *J Craniomaxillofac Surg*, v. 39, no. 5, p. 351-58, Jul 2011.
- Terencio, M. C. *et al.* Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. *Biomed Pharmacother*, v. 79, p. 120-8, Apr 2016.
- Thie, N. M.; Prasad, N. G.; Major, P. W. Evaluation of glucosamine sulfate compared to ibuprofen for the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis: a randomized double blind controlled 3 month clinical trial. *J Rheumatol*, v. 28, no. 6, p. 1347-1355, Jun 2001.
- Torelli, S. R. *et al.* Histopathological Evaluation of Treatment with Chondroitin Sulphate for Osteoarthritis Induced by Continuous Immobilization in Rabbits. *J Vet Med A*, v. 52, p. 45–51, 2005.

- Tosun, H. B. *et al.* The effect of sodium hyaluronate Chondroitin sulfate combined solution on cartilage formation in osteochondral defects of the rabbit knee: an experimental study. *Ther Clin Risk Manag*, v. 18, no. 13, p. 523-32, Apr 2017.
- Towheed, T. E. *et al.* Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (2): CD002946.
- Uebelhart, D. *et al.* Protective effect of exogenous chondroitin 4,6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 6, no. 3, p. 6-13, May 1998.
- Uitterlinden, E. J. *et al.* Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 14, no. 3, p. 250-57, Mar 2006.
- Van Eijden, T. M. Biomechanics of the mandible. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 11, no. 1, p. 123-36, 2000.
- Vasiliadis, Tsikopoulos. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. **World J Orthop**, v. 8, no. 1, p. 1-11, Jan 2017.
- Veiga, Paulo Henrique Altran. Influência do Sulfato de Condroitina e da Lectina de Semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) em Relação à Crioterapia de Ultrassom Terapêutico sobre lesão em Cartilagem do Joelho de Coelhos. Recife: UFPE, 2012. 104 p. Tese (Doutorado).
- Vernal, R. *et al.* Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*, v. 53, no. 10, p. 910-5, Oct 2008.
- Verbruggen, G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology*, v. 45, no. 2, p. 129-138, Feb 2006.
- Viana, F. B. Guia Terapêutico Veterinário. Lagoa Santa: Cem, 2ª edição, 2007.
- Wandel, S. *et al.* Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network metaanalysis. *BMJ*, v. 341, c4675, Sep 2010.
- Wang JHC, Guo Q, Li B. Tendon biomechanics and mechanobiology—a minireview of basic concepts and recent advancements. *Journal of hand therapy*, v. 25, n. 2, p. 133-141, 2012. Willard *et al.*, 2012
- Wolff, R. B. Glucosamine and chondroitin sulfate association increases tibial epiphyseal growth plate proliferation and bone formation in ovariectomized rats. *Clinics*, v. 69, no. 12, p. 847-53, 2014.