UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

LUDIMILLA ROCHA DUTRA NARDOTTO

AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE PROTEOGLICANOS E COLÁGENO TIPO I NA MATRIZ EXTRACELULAR DA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL

VITÓRIA/ES

2019

## LUDIMILLA ROCHA DUTRA NARDOTTO

# AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE PROTEOGLICANOS E COLÁGENO TIPO I NA MATRIZ EXTRACELULAR DA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Clínica Odontológica do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Nogueira da Gama de Souza Bautz

VITÓRIA/ES

2019

## LUDIMILLA ROCHA DUTRA NARDOTTO

# AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE PROTEOGLICANOS E COLÁGENO TIPO I NA MATRIZ EXTRACELULAR DA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Clínica Odontológica do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovada em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Nogueira da Gama de Souza Bautz - Universidade Federal do Espírito Santo – Orientadora

Prof. Dr. Willian Grassi Bautz -Universidade Federal do Espírito Santo -Co-orientador

Prof. Dr. Marcos da Silva Pacheco -Universidade Federal do Espírito Santo Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossiene Motta Bertollo -Universidade Federal do Espírito Santo

Ao coração que bate dentro de mim,

minha filha Laura.

### AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, me iluminando e guiando os meus passos. Agradeço sempre pela saúde e por me dar forças para alcançar meus objetivos.

Ao meu marido, Bruno, meu companheiro de vida, meu porto seguro e meu maior incentivador. Sem seu apoio incondicional certamente eu não teria chegado até aqui. Dele vêm todo o amor e apoio. Construímos uma linda história, uma família, um lar e uma vida de conquistas.

Aos meus pais, Odiléa e José Celso, que me deram a base e me fizeram tudo o que sou hoje. Por todo amor e carinho. Eu sei de todas as dificuldades que eles enfrentaram no caminho, mas sempre priorizaram nossos estudos.

As minhas irmãs, Samira e Samantha, que mesmo sem saber, têm enorme participação em todas as minhas vitórias, e aos quais eu amo incondicionalmente. Obrigada por estarem na minha vida e por dividirem todos os momentos comigo.

Aos meus familiares, meus avós Odilon e Léa, amigos da vida e amigos do mestrado que tive o prazer de conviver e fazer com que os dias se tornassem mais leves. Cunhados e cunhadas que mesmo que indiretamente contribuíram passa essa conquista.

Aos meus sogros, Ester e Samuel, por todo incentivo, apoio e carinho.

A minha orientadora, Leticia, por sempre estar disponível quando precisamos, pelos conselhos e grandes ensinamentos. Ensinamentos esses que levarei por toda a vida. Muito obrigada por confiar em mim e pela dedicação total nesta caminhada. Você me acolheu e fez de mim uma pessoa melhor, me ensinou verdadeiramente a correr atrás dos meus objetivos e aqui estamos.

Ao Willian, meu co-orientador por me ensinar toda a etapa de imuno-histoquímica com dedicação e paciência. Por sempre estar disposto a ajudar, pelas suas sugestões e colocações sempre sábias e valiosas e por desenvolver etapas anteriores dessa pesquisa as quais foram imprescindíveis para que eu pudesse chegar até aqui. Ao professor Marcos Pacheco, coordenador dos meus dois estágios em docência, sempre calmo, atencioso, compreensivo e disposto a ajudar.

A Carolina Brioschi Mathias, uma grande companheira do mestrado, que desenvolveu etapas anteriores dessa pesquisa com muita dedicação, esforço e esmero, que foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui. Obrigada.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia da UFES, Viviane, Lucienne e Rafaela, por sempre me receberem com carinho e respeito e me auxiliarem nas atividades do Laboratório de Histotécnicas.

A minha amiga Mariana por sempre estar ao meu lado e ouvindo os meus desabafos.

A Universidade Federal do Espírito Santo por me oferecer a infraestrutura desde a Graduação para concretização da minha educação.

#### RESUMO

Introdução: A cartilagem articular da mandíbula (CAM) é reconhecida por sua capacidade adaptativa diferencial frente a situações de sobrecarga devido a sua organização estrutural, na qual as camadas mais superficiais apresentam células que secretam uma matriz extracelular (MEC) rica em colágeno tipo I, enquanto a matriz de colágeno tipo II é secretada pelos condrócitos nas camadas subjacentes. Apesar disso, condições anômalas que promovam demanda funcional capaz de exceder as propriedades adaptativas da CAM podem desencadear distúrbios na articulação temporomandibular (ATM), as desordens temporomandibulares, como a osteoartrite (OA). Os objetivos do estudo foram avaliar a deposição de proteoglicanos e colágeno tipo I na CAM de ratos em condições de normalidade e submetidos a má oclusão em dois tempos experimentais. Métodos: Foram utilizadas 24 fêmeas de ratos Wistar com 8 semanas de vida divididas em grupos controle e tratado, sendo definidos dois tempos experimentais (2 e 4 semanas). Nos grupos tratados, as más oclusões sagitais foram criadas ortodonticamente, causando movimentação mesial dos primeiros molares e distalização dos terceiros molares unilateralmente e em lados opostos das arcadas. Para análise microscópica, cortes sagitais das ATMs foram obtidos e submetidos ao método de coloração com azul de toluidina/fast green para estudo dos proteoglicanos e, técnica de imuno-histoquímica para avaliação do colágeno tipo I. Para as análises da expressão proteica, foram obtidas imagens da CAM e definida a fração de área marcada, em seguida os grupos controle e tratados foram comparados através do teste t de Student. Resultados: Animais que não sofreram interferência oclusal mantiveram padrões microscópicos compatíveis com os aspectos de normalidade da CAM. O depósito de proteoglicanos foi observado em áreas da matriz territorial com característica de halo ao redor dos condrócitos. Nos animais tratados por 2 semanas, a matriz cartilaginosa apresentou redução ou até mesmo ausência dos proteoglicanos, principalmente na matriz territorial do terço posterior da CAM. Já no grupo tratado por 4 semanas, foi detectado novo depósito. Em relação ao colágeno tipo I, na camada fibrosa do terço posterior dos animais tratados por 2 semanas o depósito da

proteína foi maior do que nos animais tratados por 4 semanas (p=0,0351). Ainda, animais do grupo controle de 2 semanas também apresentaram menor fração de área de colágeno tipo I em relação aos tratados por 2 semanas (p=0,0020). No tempo experimental de 4 semanas não foi detectada diferença na expressão do colágeno tipo I entre controle e tratado. **Conclusão:** A má oclusão experimental parece ter sido capaz de induzir alterações na MEC da CAM, com efeitos iniciais de redução de proteoglicanos na matriz territorial e aumento da fração de colágeno tipo I, e tardios de novo depósito de proteoglicanos. Esses achados demonstram que os tecidos responderam às mudanças funcionais, provavelmente no sentido de se adaptar frente ao desajuste oclusal, sem o estabelecimento da OA. Contudo, devese ressaltar que o fator tempo é importante para que o processo deixe de ser fisiológico e resulte no aparecimento de lesões degenerativas.

**Palavras-chave:** Articulação Temporomandibular, Cartilagem Articular da Mandíbula, Osteoartrite, Má Oclusão, Proteoglicanos, Colágeno tipo I

### ABSTRACT

Introduction: The mandible articular cartilage (MAC) is recognized for its differential adaptive capacity against overload situations due to its structural organization, in which the superficial layers present cells that secrete an extracellular matrix (ECM) rich in type I collagen, while the type II collagen matrix is secreted by the chondrocytes in the underlying layers. Nevertheless, anomalous conditions that promote functional demand that exceeds the adaptive properties of CAM may trigger temporomandibular joint (TMJ) disorders such as osteoarthritis (OA). The objectives of the study were to evaluate the deposition of proteoglycans and collagen type I in the CAM of rats under normal conditions and submitted to malocclusion in two experimental times. Methods: Twenty-four 8-week-old female Wistar rats were divided into control and treated groups. Two experimental times (2 and 4 weeks) were defined. In the treated groups, sagittal malocclusions were orthodontically created, generating mesial movement of the first molars and distalization of the third molars unilaterally and on opposite sides of the arches. For microscopic analysis, sagittal sections of the TMJs were obtained and submitted to the toluidine blue / fast green staining method for proteoglycans evaluation and immunohistochemical technique to evaluate collagen type I. For protein expression analyzes, we obtained MAC images and defined fraction of marked area, then control and treated groups were compared by Student's t-test. Results: Animals that did not underwent occlusal interference maintained microscopic patterns compatible with the normal aspects of MAC. Proteoglycan deposition was observed in areas of the halo-like territorial matrix around the chondrocytes. In animals treated for 2 weeks, the cartilaginous matrix presented reduction or even absence of proteoglycans, especially in the territorial matrix of the posterior third of the MAC. In the group treated for 4 weeks, a new deposit was detected. In relation to type I collagen, in the fibrous layer of the posterior third of the animals treated for 2 weeks the protein deposition was higher than in the animals treated for 4 weeks (p = 0.0351). In addition, animals from the 2week control group also had a smaller fraction of type I collagen area compared to those treated for 2 weeks (p = 0.0020). In the experimental time of 4 weeks no

difference was detected in the expression of type I collagen between control and treated groups. **Conclusion:** Experimental malocclusion seems to have the capacity of inducing alterations in MAC ECM, with initial effects regarding proteoglycan reduction in the territorial matrix and increase of type I collagen fraction, and late of new proteoglycan deposition. These findings demonstrate that the tissues responded to functional changes, probably in order to adapt to occlusal maladjustment, without the establishment of OA. However, it should be emphasized that the time factor is important so the process occurring is no longer physiological and results in the appearance of degenerative lesions.

**Keywords**: Temporomandibular Joint, Mandible Articular Cartilage, Osteoarthritis, Malocclusion, Proteoglycans, Type I Collagen.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação Temporomandibular
CAM	Cartilagem Articular da Mandíbula
DAB	3'3-Diaminobenzidina
DTM	Desordem Temporomandibular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
Μ	Molar
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase da Matriz
OA	Osteoartrite
mRNA	RNA mensageiro
qPRC	PCR quantitativa

# LISTA DE TABELAS

**Artigo 1:** Como é a reposta inicial da matriz extracelular da cartilagem articular da mandíbula diante do desajuste oclusal.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte histológico sagital da ATM de rato18
Figura 2 - Representação esquemática da organização molecular da matriz da cartilagem hialina19
Figura 3 - Esquema do desajuste oclusal44
Figura 4 - Análise do depósito de proteoglicanos em CAM de ratos demonstrou alterações na matriz territorial45
Figura 5 – Análise do terço posterior de CAM de ratos demonstrou alterações no depósito de proteoglicanos na matriz territorial da camada madura após a má oclusão experimental
Figura 6 - Análise da expressão de colágeno tipo I na MEC da CAM de ratos demonstrou variações na presença dessa proteína nos diferentes grupos
Figura 7 – Análise da expressão do colágeno tipo I no terço posterior da CAM

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	RESULTADOS	25
3.1	Artigo: como é a reposta inicial da matriz extracelular da cartilag articular da mandíbula diante do desajuste oclusal	em 25
3.1.1	Introdução	27
3.1.2	Material e métodos	29
3.1.3	Resultados	32
3.1.4	Discussão	34
3.1.5	Conclusão	39
3.1.6	Financiamento	40
3.1.7	Referências	40
3.1.8	Figuras	44
3.1.9	Tabela	49

ANEXO A - CERTIFICADO DE A	APROVAÇÃO N	IA COMISSÃO E	DE ÉTICA NO	USO
DE ANIMAIS				.55
ANEXO B – DATASHEET COL-1.				56
ANEXO C – NORMAS DA AI	RCHIVES OF	ORAL BIOLOG	βΥ	59

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação do tipo sinovial localizada entre a fossa mandibular e o tubérculo articular do osso temporal e a cabeça da mandíbula. Apresenta um disco articular fixado em suas extremidades o que divide a cavidade articular em compartimentos, superior e inferior. Cada um desses compartimentos apresenta uma membrana sinovial responsável pela produção do líquido sinovial (1). Entre suas várias funções, a ATM desempenha papel fundamental no sistema estomatognático, permitindo movimentos articulados simultâneos em diferentes planos. Existem posições específicas das superfícies articulares durante o movimento de oclusão, o que pode levar a uma distribuição de tensão relativamente excêntrica na ATM, sendo possível distinguir três tipos básicos de forças: compressão, tensão e cisalhamento. Além disso, a carga pode ser estática, como no apertamento, trituração e bruxismo, ou dinâmica, característica da mastigação e fala (2,3).

Uma importante estrutura da ATM é a cartilagem articular da mandíbula (CAM). Está presente na superfície da cabeça da mandíbula e possui duas funções principais: crescimento endocondral e função articular. Nesse contexto, as duas CAMs são responsáveis em transmitir e distribuir a tensão juntamente com o disco articular (4). Ela apresenta em sua estrutura uma região de cartilagem fibrosa, para fornecer suporte às demandas funcionais, e uma de cartilagem hialina, que participa ativamente dos processos de ossificação endocondral e crescimento mandibular sendo considerada portanto uma fibrocartilagem (5).

Certas características são consideradas próprias da CAM e as diferenciam das outras cartilagens sinoviais. De maneira oposta ao observado na lâmina epifisial dos ossos longos, a CAM tem sua morfogênese desenvolvida tardiamente no período pré-natal, a partir de células possivelmente originárias do periósteo ou como uma condensação separada do osso em desenvolvimento (6), surgindo adjacente ao osso intramembranoso da mandíbula (7), distinto da cartilagem de Meckel (8). A fibrocartilagem encontrada na CAM é capaz de sofrer crescimento secundário através da zona pré-condroblástica, bem como, cicatrização pós-traumática ao longo da vida. Em contraste, a cartilagem hialina, presente na superfície articular de ossos longos, tem um potencial de cicatrização deficiente, com crescimento intersticial que cessa quando a lâmina epifisial sofre ossificação (1).

Histologicamente, a cartilagem é dividida em camadas ou zonas de acordo com a arquitetura tecidual, morfologia celular e expressão de proteínas específicas pelas diferentes subpopulações celulares. Quando a mandíbula se encontra em fase de crescimento a CAM exibe um padrão de organização em cinco camadas distintas, são elas: (1) a mais superficial formada por tecido conjuntivo fibroso, denominada camada fibrosa. Está voltada para o disco articular e forma a superfície funcional externa; (2) a camada proliferativa que compreende as células indiferenciadas as quais originarão os condroblastos e fibroblastos e está subjacente à camada fibrosa; (3) a de transição com células em formato achatado e citoplasma alongado; (4) a camada madura formada por condrócitos bem diferenciados, de formato ovóide e polaridade celular e; (5) a camada hipertrófica, que está voltada para o tecido ósseo, constituída de condrócitos hipertróficos e gradativa redução da matriz cartilaginosa que se mineraliza (9).

Exceto pelo fato de ser fibrocartilagínea, ao final do processo de crescimento a CAM apresentará disposição organizacional semelhante ao presente na cartilagem dos ossos longos. Estarão presentes três camadas: fibrosa, proliferativa e madura (Figura 1) (10). Vale ressaltar que ao final, o componente celular representará 10% ou menos do volume total da CAM, dessa maneira, as propriedades funcionais dependerão enormemente da matriz extracelular (MEC) (11). A MEC da cartilagem é uma região hidratada formada por glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que em conjunto garantem a capacidade de resistência às forças de compressão. Já sua resistência às forças tênseis ocorre pela presença do colágeno, e na cartilagem são encontrados diversos tipos, como I, II, VI, IX, X, que estão distribuídos de maneira distinta conforme a região da matriz observada (1,12).



**Figura 1 – Corte histológico sagital da ATM de rato**. a – Morfologia da ATM onde visualiza-se o osso da cabeça da mandíbula (C), disco (D), fossa mandibular (MF) e a CAM. b – Imagem ampliada do disco articular e camadas da CAM: fibrosa (f), proliferativa (p), madura (m) e hipertrófica (h). Método de coloração: HE. Fonte: Chu et al., 2017.

As áreas de MEC que circundam os condrócitos, denominadas de matriz territorial, são ricas em microfibrilas de colágeno tipo VI, mas com pouco ou nenhum colágeno fibrilar. Já a matriz da cartilagem interterritorial, presente entre as lacunas de condrócitos, tem como característica estrutural uma rede de colágeno fibrilar que confere resistência à tração. Além disso, as associações entre as fibrilas de

colágeno tipo II com os colágeno tipo XI (dentro da fibrila) e colágeno tipo IX (na superfície da fibrila) permitem interações com outros componentes da matriz e retenção de proteoglicanos (13).

Quando se compara a cartilagem hialina com a fibrocartilagem, a variação do tipo de colágeno é um aspecto diferencial. O tipo II é o principal presente na cartilagem hialina (14), sendo responsável por sua resistência, estabilidade e funções biológicas das células. Ainda, atua em conjunto com outros colágenos e proteoglicanos, como o agrecano (12,15). Já o colágeno tipo I é a principal proteína da fibrocartilagem, sendo encontrado na camada fibrosa e ao redor das células hipertróficas, próximo à zona de ossificação endocondral durante o período de crescimento. Já na fase adulta, o colágeno tipo I está presente nas camadas fibrosa, proliferativa e madura (16). A figura 2 demonstra um esquema da organização molecular encontrado na cartilagem hialina.



Figura 2 - Representação esquemática da organização molecular da matriz da cartilagem hialina. As proteínas de ligação unem por covalência o core proteico dos proteoglicanos às moléculas do ácido hialurônico, e toda essa estrutura está ligada às fibrilas de colágeno tipo II. Fonte: Junqueira & Carneiro, 2004.

Notadamente a CAM difere das cartilagens primárias em suas camadas mais superficiais, nas quais as células que são relativamente indiferenciadas, secretam uma MEC rica em colágeno tipo I, enquanto a matriz de colágeno tipo II é produzida pelos condrócitos. São essas células relativamente indiferenciadas da camada proliferativa, e não os condrócitos em camadas mais profundas, que proliferam e se

diferenciam permitindo o crescimento da cartilagem (10,18). A presença do colágeno tipo I oferece resistência à tensão e às cargas multidirecionais que afetam a cartilagem durante movimentos funcionais ou parafuncionais. Pode-se dizer que a existência de dois tipos de cartilagem na CAM, fibrocartilagem na superfície e cartilagem hialina subjacente, contribuem para uma capacidade adaptativa melhor às forças mecânicas em comparação às demais cartilagens sinoviais (19).

De uma perspectiva biomecânica, uma carga aplicada na superfície da CAM se traduz em cisalhamento compressivo dentro da cartilagem, sendo que a cartilagem hialina é mais resistente à compressão, enquanto a fibrocartilagem é ao cisalhamento (20), (21). Porém, condições anômalas da posição/estrutura do disco ou disfunção da musculatura associada, com demanda funcional que exceda a capacidade adaptativa dos tecidos, podem resultar em distúrbios na ATM, que são considerados uma classe de condições musculoesqueléticas degenerativas associadas a deformidades morfológicas e funcionais, as chamadas desordens temporomandibulares (DTM) (22).

A osteoartrite (OA) é a DTM de origem articular que mais acomete a ATM, caracterizando-se pela alteração de toda a estrutura articular, incluindo degradação progressiva da cartilagem, meniscos e ligamentos, inflamação sinovial e alterações no osso subcondral (23,24). A OA da ATM pode levar a dor, disfunção, má oclusão e redução da qualidade de vida, sendo que a dor e/ou disfunção no sistema mastigatório afetam 5 a 12% da população (25). Os fatores de risco propostos para a OA na ATM estão alinhados com os sugeridos para outras articulações, sendo eles, idade, sexo, genética, infecção/inflamação, anomalias congênitas e de desenvolvimento. A presença de OA de mão é frequentemente considerada um marcador de susceptibilidade generalizada para a doença, levando ao aumento de risco para desenvolvimento da doença na ATM (26). Foi observado que a OA está intimamente relacionada à idade em todos os grupos étnicos (27) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, globalmente, 25% dos adultos com mais de 65 anos sofrem de dor e incapacitação associadas a essa condição (28). Em relação ao gênero, a incidência de OA na ATM é maior em mulheres (29).

Em geral o processo é caracterizado por lenta progressão e de maneira degenerativa, causando inflamação, remodelação da cartilagem e do osso. As

alterações ósseas da OA estão associadas ao aumento da dor, lesões na medula óssea, formação de osteófitos, bem como alterações na morfometria trabecular e densidade óssea (30). Ainda, as transformações estruturais das cartilagens em consequência da OA incluem mudanças no conteúdo da MEC, seja na substância fundamental ou no conteúdo de colágeno. Sob condições patológicas, como a osteoartrite a MEC exibe uma infinidade de alterações em sua função mecânica que estão associadas ao aumento da atividade catabólica e inflamação na articulação. As alterações da MEC na osteoartrite parecem ser motivadas por um desequilíbrio das atividades anabólicas e catabólicas dos condrócitos, a população celular dentro da cartilagem articular (31).

A degeneração da cartilagem pode ser causada pelo número reduzido de condrócitos na cartilagem articular, que falha em regenerar e remodelar a cartilagem adequadamente. No estágio inicial da OA, os condrócitos aumentam e se agrupam. Esse fenômeno é considerado como evidência da atividade metabólica da cartilagem e da capacidade de replicação de condrócitos na OA. Pelo contrário, apesar da proliferação ativa de condrócitos, o conteúdo de glicosaminoglicano na matriz é diminuído em comparação com uma matriz saudável, sugerindo que o nível de compensação é abaixo do ideal. No estágio tardio da OA, a cartilagem exibe uma característica central da morte de condrócitos, incluindo hipocelularidade e esvaziamento lacunar (32).

Estudos experimentais envolvendo modelos animais são uma importante abordagem para investigação da etiologia e patogênese da OA, já que a obtenção de amostras representa um grande desafio clínico. Os exames de imagem, como as radiografias, muitas vezes não são capazes de elucidar o grau de destruição da CAM, permitindo apenas a visualização de aspectos como redução do espaço articular e espessamento do osso subcondral. Para determinação exata do nível de comprometimento dos tecidos, a análise histopatológica torna-se essencial (33). Em estágios mais avançados da doença, a cartilagem começa a mostrar fissuras que se aprofundam, aumento de fibrilações, perda de glicosaminoglicanos e um tecido cicatricial, com células semelhantes a fibroblastos e uma matriz principalmente fibrilar (34).

Trabalhos anteriores testaram como a oclusão anormal, decorrente de alterações na distribuição da força oclusal ou interferência oclusal, seriam biomecanicamente prejudiciais à ATM. Devido à presença de uma cartilagem secundária na cabeça da mandíbula, dispositivos ortopédicos podem modificar não apenas a direção, mas também a quantidade de crescimento mandibular e simular modelos de OA (5). O evento central da patogênese é a relação perturbada entre célula-matriz. Com o avanço da doença, os processos de degeneração progridem, sendo observados: perda progressiva de glicosaminoglicanos devido a uma grande diminuição da quantidade do proteoglicano agrecano; aumento da produção de colágeno tipo I e; presença de fissuras que se estendem até as camadas mais profundas (15). Esta degeneração é combinada com esforços de regeneração, que são observados na ocorrência de aglomerados de condrócitos е na aparência de tecido fibrocartilaginoso, que apresenta-se com mais matriz fibrilar e células semelhantes a fibroblastos alongados (34).

De maneira específica ao conteúdo de colágeno, já foi observado que nessas condições degenerativas o colágeno tipo II está elevado, principalmente nos estágios iniciais, mas com a progressão da OA, sua quantidade na matriz diminui (15,35,36). Ligeiro aumento de colágeno tipo II foi descrito como um esforço de regeneração por parte dos condrócitos (34). O colágeno tipo I também já foi detectado em células degenerativas nas doenças articulares. Sua presença, ou de seu mRNA, foi observado na cartilagem osteoartrítica, e deve ser considerado como um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da OA. Diferentemente do colágeno tipo II, o tipo I geralmente se apresenta em amostras compostas principalmente por tecido fibrocartilaginoso em fase tardia da doença. Miosge et al., 2004 demonstraram que ambos os colágenos estão presentes na matriz da cartilagem alterada. Utilizando a hibridização *in situ*, a expressão dessas proteínas foi detectada *in viv*o em todos os estágios da doença, com uma tendência a uma expressão mais pronunciada de mRNA do colágeno tipo I no tecido fibrocartilaginoso nos estágios tardios (34,35,37,38).

Diante dos dados apresentados, é possível observar que a MEC sofre importantes alterações na sua composição e estrutura quando estabelecida uma alteração degenerativa. Contudo, a CAM apresenta uma organização particular que a diferencia das demais cartilagens sinoviais, o que confere importantes propriedades adaptativas. Sendo assim, o estudo de diferentes componentes da MEC da CAM quando submetida a desafios funcionais torna-se relevante para melhor compreensão dos eventos celulares que ocorrem em resposta às novas demandas. Dessa forma, é possível avaliar os mecanismos envolvidos nos processos de adaptação da CAM, ou até mesmo surgimento da OA quando o limite entre fisiologia e doença é ultrapassado (21).

### 2. OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a deposição de proteoglicanos e colágeno tipo I na MEC da CAM de ratos em idade adulta em condições de normalidade e de má oclusão experimental em dois tempos experimentais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a deposição de proteoglicanos e a expressão de colágeno tipo I na MEC da CAM em condições de normalidade em ratos em idade adulta;
- Analisar a deposição de proteoglicanos e a expressão de colágeno tipo I na CAM em animais em idade adulta submetidos à má oclusão experimental por um período de duas semanas;
- Analisar a deposição de proteoglicanos e a expressão de colágeno tipo I na CAM em animais em idade adulta submetidos a má oclusão experimental por um período de quatro semanas;
- Comparar a deposição de proteoglicanos e expressão de colágeno tipo I entre os animais em idade adulta com e sem alteração na oclusão tratados pelos diferentes tempos experimentais.

### **3 RESULTADOS**

3.1 Artigo: A má oclusão e seus efeitos na deposição de proteoglicanos e colágeno tipo I na cartilagem articular da mandíbula

Ludimilla Rocha Dutra Nardotto<sup>a</sup>, Marcelo dos Santos Bittencourt Filho<sup>b</sup>, Carolina Brioschi Mathias<sup>c</sup>, Willian Grassi Bautz<sup>d</sup>, Leticia Nogueira da Gama de Souza<sup>e</sup>

a Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. E-mail: ludi\_rd@hotmail.com;

b Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. E-mail: marcelo.bittencourt94@gmail.com

c Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. E-mail: carolbrioschi@yahoo.com.br

d Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. E-mail: willian.bautz@ufes.br

e Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. E-mail: leticia.souza@ufes.br

Autor correspondente:

Letícia Nogueira da Gama de Souza

Endereço: Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900.

E-mail: leticia.souza@ufes.br

Telefone: 55 27 988482454

2 Artigo elaborado de acordo com as normas técnicas da Archives of Oral Biology.

#### RESUMO

Objetivos: Avaliar as alterações na deposição de proteoglicanos e a expressão de colágeno tipo I na matriz extracelular (MEC) da cartilagem articular da mandíbula (CAM) de ratos em condições normais e de má oclusão experimental em dois tempos. Métodos: Foram utilizadas 24 fêmeas de ratos Wistar com 8 semanas de vida divididas em grupo controle e tratado, com dois tempos experimentais (2 e 4 semanas). Más oclusões sagitais foram criadas ortodonticamente, causando movimentação mesial dos primeiros molares e distalização dos terceiros unilateralmente e em lados opostos das arcadas. Cortes sagitais das ATMs foram obtidos para processamento histológico. A análise do perfil de proteoglicanos foi realizada por método de coloração com azul de toluidina/fast green. Imunohistoquímica foi realizada para colágeno tipo I. Resultados: A matriz cartilaginosa apresentou redução de proteoglicanos na matriz territorial do terço posterior da CAM de animais tratados por duas semanas, e novo depósito no grupo tratado por guatro semanas. Já a expressão de colágeno tipo I na camada fibrosa do terço posterior dos animais tratados por 2 semanas foi superior em comparação aos animais tratados por 4 semanas (p=0,0351). Ainda, os animais do grupo controle de duas semanas também apresentaram menor fração de área de colágeno tipo I em relação aos tratados por 2 semanas (p=0,0020). Conclusão: O estudo demonstrou que a desordem oclusal promoveu alterações importantes na deposição de proteoglicanos e colágeno tipo I na CAM em momentos iniciais de sobrecarga, o que sugere uma possível tentativa de adaptação dos tecidos frente as novas demandas funcionais.

**Palavras-chave:** Articulação Temporomandibular, Cartilagem Articular, Má Oclusão, Proteoglicanos, Colágeno Tipo I.

#### 3.1.1 Introdução

A articulação temporomandibular (ATM) desempenha papel fundamental no sistema estomatognático, permitindo movimentos articulados simultâneos em diferentes planos (1). As forças mecânicas aplicadas a ATM produzem respostas biológicas que geralmente são observadas como uma adaptação ao ambiente alterado, visto que a ATM mantém a capacidade de remodelação diante de certos estímulos através de um balanço entre anabolismo e catabolismo celular (2).

Uma importante estrutura da ATM é a cartilagem articular da mandíbula (CAM), considerada uma fibrocartilagem (3). A CAM apresenta em sua estrutura uma região de cartilagem fibrosa, para fornecer suporte às demandas funcionais, e uma de cartilagem hialina, que participa ativamente dos processos de ossificação endocondral e crescimento mandibular (3). De uma perspectiva biomecânica, cargas aplicadas na superfície da CAM se traduzem em cisalhamento compressivo dentro da cartilagem. Isso resulta em um padrão complexo de deformação dos tecidos que precisam se ajustar as demandas para manutenção da fisiologia da ATM (4).

Histologicamente, a CAM é dividida em camadas conforme sua arquitetura tecidual, morfologia celular e expressão de proteínas específicas. Ao final do processo de crescimento apresentará disposição organizacional em três camadas: fibrosa, proliferativa e madura (5). Vale ressaltar que, as propriedades funcionais da CAM dependem enormemente da matriz extracelular (MEC), já que a mesma representa o maior volume da cartilagem em comparação ao componente celular (6). A MEC da cartilagem é uma região hidratada formada por glicosaminoglicanos e proteoglicanos que garantem a capacidade de resistência às forças de compressão, já sua resistência às forças tênseis ocorre pela presença do colágeno (7).

As áreas de matriz territorial da CAM apresentam pouco ou nenhum colágeno fibrilar. Já a matriz interterritorial tem como característica uma rede de colágeno fibrilar (8). Ainda, nas camadas mais superficiais estão presentes células relativamente indiferenciadas que secretam uma MEC rica em colágeno tipo I responsável pela resistência à tensão e às cargas multidirecionais que afetam a cartilagem durante movimentos funcionais ou parafuncionais (5,9).

Mudanças na oclusão, sejam elas provenientes de alterações dentárias e/ou esqueléticas, como mordida unilateral, perda de dentes posteriores e desoclusão de incisivos, podem interferir no ambiente biomecânico da ATM, levando à remodelação patológica ou fisiológica da cabeça da mandíbula. Isso irá depender da intensidade e estímulo aplicado (2,10). Ainda, condições da duração do anômalas posição/estrutura do disco ou disfunção da musculatura associada também podem resultar em distúrbios na articulação. Nesses quadros já foi observado aumento da produção de metaloproteinases da matriz (MMPs) e moléculas pró-inflamatórias pelos condrócitos, causando uma destruição aberrante da CAM. Ao conjunto de distúrbios/condições musculoesqueléticas degenerativas associadas a deformidades morfológicas e funcionais, denomina-se disfunções temporomandibulares (DTM) (2,11).

Sabe-se que a osteoartrite (OA) é a DTM de origem articular que mais acomete a ATM, caracterizando-se pela alteração de toda a estrutura articular, incluindo degradação progressiva da cartilagem, meniscos e ligamentos, inflamação sinovial e alterações no osso subcondral (12,13). A OA da ATM pode levar a dor, disfunção, má oclusão e redução da qualidade de vida, sendo que a dor e/ou disfunção no sistema mastigatório afetam 5 a 12% da população (14). A patogênese envolve o desencadeamento de uma série de eventos biológicos que incluem a produção ou liberação de radicais livres, citocinas e enzimas que irão alterar a MEC da CAM. Estudos anteriores demonstraram alterações nas fibras colágenas em estágios tardios da doença. A rede colagênica estava reduzida e desorganizada, além de ocorrer em associação perda de proteoglicanos, redistribuição de glicosaminoglicanos, neovascularização e áreas de calcificação (15,16).

Contudo, deve-se ressaltar que a CAM apresenta características estruturais que são consideradas próprias e a diferencia das demais cartilagens sinoviais. Notadamente suas camadas mais superficiais apresentam células relativamente indiferenciadas e que secretam o colágeno tipo I, enquanto a matriz de colágeno tipo II é produzida pelos condrócitos. Ainda, a combinação dessas proteínas resulta em resistência à tensão e às cargas multidirecionais que afetam a cartilagem durante movimentos funcionais ou parafuncionais, e irão contribuir para uma capacidade adaptativa melhor frente à essas forças mecânicas (5,9).

Diante do exposto, devemos considerar o estudo dos aspectos teciduais e celulares envolvidos na propriedade adaptativa da CAM, a qual é essencial para manutenção da fisiologia do sistema estomatognático, mesmo em condições de sobrecarga funcional. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a deposição de proteoglicanos e de colágeno tipo I na CAM de ratos adultos em condições de normalidade e submetidos a má oclusão em dois tempos experimentais, com o intuito de identificar possíveis mudanças que ocorrem na MEC frente as novas demandas de cargas impostas aos tecidos.

### 3.1.2 Material e métodos

Para a realização do trabalho, foram utilizadas 24 fêmeas de ratos da raça Wistar com 8 semanas de vida. Os animais foram obtidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os procedimentos passaram pela aprovação na Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo 50/2016 e foram realizados de acordo com suas diretrizes. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=6), sendo 2 grupos tratados e 2 grupos controle. Nos grupos tratados, foram criadas más oclusões sagitais como previamente descrito na literatura (17,18). Elásticos ortodônticos (1/8#; Morelli®, Sorocaba-SP) foram inseridos entre o primeiro e segundo molares superiores esquerdos e entre o primeiro e segundo molares inferiores direitos, de modo que a força do elástico movimentasse gradualmente os primeiros molares mesialmente, criando uma separação de aproximadamente 0,8 mm após 7 dias da instalação. Passado esse período, os elásticos foram substituídos por cimento resinoso autoadesivo de polimerização dual (MonoCemTM; Shofu, San Marcos, CA), tomando-se cuidado para que a resina não contatasse os dentes antagonistas, mantendo a separação dentária em posição. O mesmo método foi utilizado para movimentar distalmente os terceiros molares superior esquerdo e inferior direito. Dessa forma, foi criada uma má oclusão na qual os molares foram deslocados de suas posições originais, não havendo intercuspidação e engrenamento oclusal entre as arcadas superior e inferior (Fig 3). Os animais tratados foram divididos em dois subgrupos: T2, animais que permaneceram com a

má oclusão por 2 semanas, sendo eutanasiados com 16 semanas de vida e; T4 animais que permaneceram com a má oclusão por 4 semanas, sendo eutanasiados com 18 semanas de vida. Nos grupos controle, todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos e tempos dos grupos experimentais, exceto no que diz respeito a instalação do sistema de elásticos e resina para causar a desordem oclusal, sendo definidos, portanto, dois subgrupos (C2 e C4). Durante todo o processo, os animais foram mantidos em condições de humidade, dieta e temperatura controladas. O método anestésico empregado foi por administração parenteral de 0,16 ml de Cetamina a 10%, associada ao relaxante muscular Xilasina 1%, na dose de 0,1ml. Para eutanásia, a dose utilizada foi 3 vezes maior que a dose anestésica.

Os blocos de tecido contendo as ATMs direita e esquerda dos animais foram dissecados e fixados em solução de paraformaldeído a 4% com pH 7,4 por 12 horas a 4°C e então descalcificados com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% com tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 por 6 semanas. Após a descalcificação, os tecidos ao redor das ATMs foram removidos, e o ramo da mandíbula foi exposto. As ATMs foram então desidratadas em uma sequência de etanol e embebidas em parafina. Secções seriadas de 5 µm foram obtidas no plano sagital das ATMs com auxílio de micrótomo (RM2135; Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). As etapas de inclusão dos espécimes cirúrgicos em parafina e obtenção dos cortes foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Histotécnicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os cortes histológicos foram condicionados em lâminas silanizadas Starfrost® (Knittel; Brownschweig, Alemanha). O estudo da MEC da CAM incluiu a análise da deposição de proteoglicanos e expressão de colágeno tipo I. Para os primeiros, foi utilizado o método com azul de toluida/fast green. Após desparafinização e hidratação dos cortes; foi realizada coloração com azul de Toluidina 0,04% em tampão acetato (pH 4,0) por 10 min; seguida de lavagem com água destilada e contra-coloração com Fast Greeen 0,02% (FCF) por 3 minutos; na sequência foi realizada a lavagem com água destilada e banho com álcool isopropílico. A montagem das lâminas foi feita com DPX (Sigma-Aldrich®; Saint Louis, MI).

Já a técnica de imuno-histoquímica foi a da imunoperoxidase. O anticorpo utilizado foi o anti-COL1 gerado em coelhos com diluição de 1:100 (Anti-Collagen I antibody ab34710, ABCAM®). A imunodetecção foi realizada com o Sistema Reveal (Spring/Biogen SPB-999) utilizando 3,3'-diaminobenzidina como o cromógeno. As secções foram contrastadas com Hematoxilina de Mayer. Tampão citrato de pH 6,0 foi usado durante 15 minutos à 93°C para a recuperação antigênica. Foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com o bloqueador de proteína (DPB 125). Os cortes foram incubados com o anticorpo primário durante a noite emcâmara úmida mantida a 4°C. A seguir, a peroxidase endógena foi consumida por incubação durante 10 minutos com 3% de peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente. Subsequentemente, as amostras foram incubadas com sistema secundário de detecção de anticorpo de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram lavados cuidadosamente com solução salina tamponada com fosfato durante todo o processo. As lâminas foram montadas com DPX (Sigma-Aldrich®; Saint Louis, MI) e examinadas ao microscópio de luz. O controle negativo (omissão do anticorpo primário) foi incluído.

Para a leitura dos cortes e aquisição de imagens, foram utilizados microscópio PrimoStar Zeiss com uma câmera digital acoplada Zeiss AxioCam ERC5s (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e programa de imagens Axio Vision 4.8 Release 4.8.2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha). A CAM foi dividida em terços anterior, médio e posterior. Para a avaliação dos proteoglicanos, foi observado o padrão de coloração que difere a matriz territorial da interterritorial na região da camada madura nos três terços. Já para a análise da expressão do colágeno tipo I, foram observadas todas as camadas da CAM em toda sua extensão. A determinação quantitativa da proteína foi realizada a partir de imagens de áreas da CAM obtidas com auxílio da objetiva de 100X. Essas imagens foram importadas para o programa Image J (domínio público, disponível em: https://imagej.nih.gov/ij/download.html) e aplicado o plugin "Segmentation: Color Deconvolution" com o vetor HDAB para a separação da coloração de fundo, hematoxilina e marcação para o DAB. As configurações do DAB foram realizadas para marcação positiva com a ferramenta "Adjust: Threshold" e as análises foram concluídas com a ferramenta "Measure". Para cada seção, uma medida da área avaliada foi definida. Por fim, os dados foram armazenados no programa Microsoft Excel 2016. Vale ressaltar que todas as

análises foram realizadas por 2 examinadores previamente calibrados e de maneira cega. Todas essas técnicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Desenvolvimento e Tumorigênese, do Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Na análise estatística da marcação do colágeno tipo I, foi utilizado o software GraphPad (California, EUA), aplicando-se o teste *t de Student* não-paramétrico de Mann-Whitney na comparação entre os grupos nos diferentes tempos experimentais. Valores de P foram considerados significantes quando menores que 0.05.

#### 3.1.3 Resultados

Em todos os grupos controle e tratado foi possível observar que a CAM apresentava em sua estrutura as camadas fibrosa, proliferativa e madura. Nos animais controles, as camadas apresentavam-se distintas e com morfologia de normalidade. A camada fibrosa estava composta por fibroblastos alongados em meio a MEC de tecido conjuntivo denso, a camada proliferativa caracterizada por muitas células com formato poligonal e, a camada madura com condrócitos em suas lacunas. Ainda, os terços anterior, médio e posterior mantiveram suas relações preservadas com as estruturas circunjacentes. Já na CAM dos animais tratados, apesar de ainda observarmos a presença das três camadas, alterações na organização tecidual e de componentes da MEC foram encontradas, o que sugere uma resposta da articulação frente aos novos desafios impostos pela má oclusão experimental.

Em relação aos aspectos moleculares da MEC, observamos que a deposição dos proteoglicanos nos animais C2 estava presente ao longo de toda extensão da CAM, sendo mais evidente nos terços médio e posterior (Fig. 4, A-B). Nos animais tratados por 2 semanas (T2), o padrão de coloração foi mais discreto nos terços médio e posterior da cartilagem, e ausente no terço posterior (Fig. 4, C-D). Já no grupo controle de 4 semanas (C4), observamos leve coloração no terço posterior (Fig. 4 E-F). Por fim, nos animais tratados por 4 semanas (T4) a coloração para os proteoglicanos estava ausente no terço anterior, porém bastante evidente no terço posterior (Fig. 4, G-H).

Em particular, os achados microscópicos relacionados à camada madura do terço posterior da CAM demonstram que houve alterações no depósito de proteoglicanos na matriz territorial após a instalação da má oclusão experimental. Nos animais C2 foram detectadas regiões em que os condrócitos estavam delimitados por uma matriz territorial bem corada e com halos definidos circundando as lacunas dos condrócitos, já a matriz interterritorial apresentava-se de maneira discreta (Fig. 5 A). O grupo dos animais T2 apresentou ausência de halos corados e aparentes na camada madura, o que sugere mudanças no perfil molecular da matriz territorial. A matriz interterritorial também não apresentou coloração (Fig. 5 B). Nos animais pertencentes ao grupo C4, foi possível observar que os halos ao redor dos condrócitos apresentavam uma coloração discreta e envolvendo poucas células, enquanto a matriz interterritorial continuava sem coloração (Fig. 5 C). Por fim, os animais tratados por 4 semanas, apresentaram halos corados e bem definidos, demarcando a matriz territorial dos condrócitos na camada madura, já a matriz interterritorial não estava aparente (Fig. 5 D).

Na análise das cartilagens processadas para colágeno tipo I, todos os grupos apresentaram algum tipo de expressão da proteína na MEC. Nos animais controle de 2 semanas a expressão de colágeno tipo I foi evidente na camada fibrosa, tornando-se sutil na proliferativa (Fig. 6, A-B). Já no grupo tratado por 2 semanas, a imunomarcação foi detectada em todas as camadas da CAM (Fig. 6, C-D). No controle de 4 semanas, a expressão de colágeno tipo I também foi observada nas camadas da cartilagem (Fig. 6 E-F). Por fim, animais tratados por 4 semanas apresentaram a marcação mais evidente na camada fibrosa da CAM (Fig. 6, G-H).

Ainda, pode-se dizer que no terço posterior da CAM o colágeno tipo I apresentou variações importantes na organização de suas fibras. Nos animais do grupo C2, observamos a presença da proteína de maneira evidente na camada fibrosa, onde a disposição das fibras mostrava-se no sentido longitudinal, paralelas à face articular e, no sentido transversal. Já as demais camadas, proliferativa e madura, apresentaram expressão discreta (Fig. 7, A). Nos animais tratados por duas semanas (T2) a disposição das fibras de colágeno estava mais densa na camada fibrosa, com um padrão de organização principalmente no sentido transversal, embora algumas fibras também estivessem dispostas longitudinalmente. Outro

aspecto notado foi o avanço do colágeno nas camadas proliferativa e madura, sendo nessa última de maneira difusa (Fig. 7, B). Em relação ao grupo C4, as fibras de colágeno presentes na camada fibrosa estavam dispostas no sentido longitudinal, concentradas limítrofe à camada proliferativa, já as fibras transversais estavam localizadas mais superficialmente na CAM (Fig. 7, C). Nos animais tratados por quatro semanas, a expressão de colágeno foi notada principalmente na camada fibrosa e de maneira desorganizada, mas ainda foi possível observar fibras dispostas nos sentidos longitudinal e transversal. Quando observada a região de transição entre as camadas proliferativa e madura, havia presença do colágeno de forma difusa (Fig. 7, D).

A análise quantitativa do colágeno tipo I demonstrou que no terço posterior da CAM a camada fibrosa teve a sua densidade alterada. Houve aumento da fração de área marcada na MEC nos animais do grupo T2 em comparação a C2 (p=0,002) e, em comparação a T4 (p=0,0351). As análises comparativas entre os grupos controles e tratado de 4 semanas, assim como entre os grupos controles de 2 e 4 semanas, não resultaram em diferença no depósito de colágeno na matriz (p>0,05). A tabela 1 resume os achados da fração de área marcada para o colágeno tipo I na camada fibrosa do terço posterior de todos os grupos.

#### 3.1.4 Discussão

A má oclusão pode promover alterações na função mastigatória, resultando em estímulos não fisiológicos e de sobrecarga na ATM. É de fundamental importância compreender a extensão do potencial adaptativo da CAM frente a novos desafios funcionais, assim como elucidar as alterações teciduais e celulares que participam da fisiopatologia das DTMs. No presente estudo foram avaliados importantes componentes da MEC da CAM de ratos em condições de normalidade e de má oclusão em dois tempos experimentais. Os achados mostraram que houve mudanças no padrão de organização da matriz considerando a deposição de proteoglicanos e de colágeno tipo I, o que confirma que a cartilagem reagiu diante do desajuste oclusal. É reconhecido que a CAM apresenta certa capacidade de remodelação, permitindo adaptações em resposta à sobrecarga mecânica frente às demandas funcionais (1,19). Assim, mudanças na oclusão, como mordida unilateral, perda de dentes posteriores, desoclusão de incisivos e movimento anterior contínuo da mandíbula, que resultam em mudanças no ambiente biomecânico da ATM, podem gerar uma remodelação fisiológica ou patológica da cabeça da mandíbula (20–22). Em condições de normalidade, os condrócitos mantêm um equilíbrio entre as atividades anabólicas e catabólicas, o que é importante para preservação da integridade estrutural e funcional da cartilagem. Ainda, essas células expressam várias citocinas e quimiocinas que estão envolvidas na remodelação tecidual em resposta às demandas funcionais (22). Contudo, quando essas demandas excedem a capacidade adaptativa da ATM, a produção das metaloproteinases da matriz (MMP) e fatores degenerativos aumenta consideravelmente, o que pode resultar em destruição da cartilagem (5,6,23).

Em geral, a oclusão em máxima intercuspidação suporta as forças mastigatórias porque permite que elas se distribuam pelas áreas de contato dos dentes (24). Em nossos grupos experimentais, não era possível observar a relação cúspide/fossa ou a estabilidade de oclusão habitual, o que gerou uma sobrecarga nas ATMs. Acreditamos que esse desajuste oclusal foi capaz de agir como fator desencadeador das alterações descritas no estudo. Em relação aos proteoglicanos, nossos achados demonstraram que os animais que não foram submetidos as alterações oclusais também apresentaram variações em seu conteúdo, sendo que nos mais jovens toda a extensão da CAM teve algum padrão de coloração, enguanto que no grupo C4 isso foi mais evidente no terço posterior. Em particular, os achados microscópicos relacionados à camada madura do terço posterior de C2 mostraram regiões em que os condrócitos estavam delimitados por uma matriz territorial bem corada e definida, enquanto nos animais C4, os halos ao redor dos condrócitos apresentavam uma coloração discreta e envolvendo poucas células. Essas diferenças provavelmente têm relação com o processo de desenvolvimento e amadurecimento da CAM, que pode decorrer da própria senescência, como resultado de um evento fisiológico após um certo número de replicações que é específico a cada tipo celular. Ademais, como descrito por Rahmati et al., 2017, o tamanho de agregados de proteoglicanos, por exemplo, diminui com a idade, como

resultado de vários processos, como o alongamento e encurtamento das cadeias de sulfato de queratano e de sulfato de condroitina, com consequente redução do peso molecular do proteoglicano. A atividade proteolítica das agrecanases também aumenta, liberando fragmentos de agrecano no líquido sinovial e deixando pontos livres de ligação ao ácido hialurônico que podem ser ocupado por outras moléculas limitando a formação de agregados totalmente funcionais (25). Desta maneira, os achados observados nos animais controles C2 e C4 podem se justificar pelo exposto acima.

Já nos animais induzidos à instabilidade oclusal, as alterações foram bem destacadas no terço posterior da cartilagem. Isso pode ser explicado pelo fato da má oclusão provocar o deslocamento da cabeça da mandíbula para posterior, resultando em sobrecarga funcional na região durante o movimento de fechamento mandibular (15). Dentre os principais constituintes da MEC, os proteoglicanos do tipo agrecano formam uma trama resistente com as fibras colágenas e tem papel fundamental, fornecendo a resistência osmótica necessária para que a cartilagem resista às cargas compressivas (26). Diante de qualquer remodelação e renovação, os componentes da cartilagem devem ser cuidadosamente regulados para manter as propriedades biomecânicas do tecido. A maioria das amostras de OA contém proteoglicanos característicos de uma cartilagem articular normal, mas a capacidade de formação de agregados é consideravelmente menor, e evidências de degradação foram observadas. Estes resultados sugerem uma tentativa de reparação da matriz, por síntese de proteoglicanos dentro do tecido alterado ou até mesmo considerado doente (26,27). Ainda, modelos in vivo nos quais foi provocada mordedura unilateral, resultaram em aumento da expressão de proteoglicanos na ATM de ratos (20).

Esses achados são similares aos observados no nosso estudo, no sentido que as respostas iniciais da CAM à má oclusão foram marcadas pela redução ou até mesmo ausência de componentes de proteoglicanos na matriz territorial, particularmente no terço posterior o qual passou a receber sobrecarga funcional. Em estágios posteriores do processo, o conteúdo de proteoglicanos retornou e, inclusive aumentou como observado nos animais submetidos a quatro semanas de tratamento. Assim, pode-se sugerir que as mudanças no padrão dos proteoglicanos
seria um esforço da CAM em se adaptar às novas demandas diante da desordem oclusal estabelecida.

Em relação ao colágeno tipo I, também foram detectadas variações na sua expressão entre os diferentes grupos. Sabe-se que essa proteína oferece grande resistência à tensão e cisalhamento, sendo na verdade, o principal componente da MEC da cartilagem responsável pela propriedade de resistência a tração (26,27). A fibrocartilagem possui capacidade de suportar as forças biodinâmicas quando a cartilagem circundante sofre sobrecargas funcionais. Contudo, quando se considera a longo prazo deve-se ressaltar que a perda contínua de função pode culminar em OA (24,25). Vale lembrar que, os condrócitos são células pós-mitóticas e apresentam baixo potencial de regeneração frente a danos e a reparação tecidual é equivalente a fibrocartilagem, consistindo de uma alta quantidade de colágeno tipo I (8).

Quando analisados os grupos controle C2 e C4, a expressão de colágeno tipo I foi evidente na camada fibrosa, algo já esperado por se tratar da região que contém a organização de fibrocartilagem. Ainda, entre esses animais não houve diferença na fração de área marcada para a proteína. Já nos animais tratados T2 e T4, embora o colágeno também estivesse evidente nessa camada, foram observadas mudanças no seu padrão de deposição, além de sua presença em outras regiões da CAM, possivelmente em resposta à má oclusão.

Diferentes orientações das fibras colágenas são aspectos estruturais da CAM. Na camada mais superficial, as fibras são dispostas paralelamente à superfície, enquanto na região central a orientação é menos organizada. Já nas profundas, se apresentam perpendiculares à superfície da articulação (26). Quanto a esse aspecto, observamos que os grupos tratados também sofreram variações majoritariamente no terço posterior da CAM. No grupo T2, as fibras estavam mais densas e com padrão de organização principalmente no sentido transversal no limite da camada fibrosa, enquanto em T4, as fibras difusas foram observadas na parte mais profunda da camada fibrosa, limítrofe com a proliferativa e arranjos variados foram encontrados na porção mais superficial. Isso ocorre provavelmente à medida que as fibras de colágeno se tornam mais espessas, tensas e assumem uma

estrutura uniforme, tornam-se capazes de absorver a carga de tração que incide no tecido (26).

A análise quantitativa confirmou que no terço posterior, a camada fibrosa teve a sua densidade alterada, estando aumentada no grupo T2 em comparação a C2 e T4. Diversas investigações em CAM da mandíbula sob muitas condições experimentais já foram relatadas na literatura. Estudo em que foi realizada a extração de molares demonstrou aumento da imunorreatividade para os colágenos do tipo I, II e X, como também de 4-sulfato de condroitina na CAM de ratos (9). Martin et al., 2001 realizaram trabalho com humanos em condições de doença avançada, no qual o dano sobrepujou o esforço adaptativo da CAM, e observaram que pacientes com escores mais elevados de OA exibiram níveis mais elevados de mRNA do colágeno tipo I quando comparados aos indivíduos sem doença. As investigações ainda demonstraram que as camadas mais profundas da CAM, quando estabelecida a OA (estágio IV), exibiam maior expressão do colágeno tipo I (30). De maneira semelhante, Miosge et al., 2004 demonstraram aumento de 100 vezes na quantidade de mRNA de colágeno tipo I na doença em estágio III, com a ajuda de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (31).

Assim, é possível indicar a existência de um efeito biomecânico anormal criado pela instalação da desordem oclusal na CAM. Apesar do desequilíbrio de posição instalado, a CAM teve como provável resposta biológica inicial o desenvolvimento de um processo de adaptação à nova condição fisiológica. Conforme observado no trabalho, essas mudanças envolveram o desaparecimento da matriz territorial e o aumento na expressão de colágeno tipo I. Quando componentes viscoelásticos, como as cartilagens, sofrem deformação constante, eles tipicamente respondem com elevado estresse inicial, que progressivamente diminui com o passar do tempo, até atingir o equilíbrio (26).

Porém, não se pode excluir a possibilidade desse processo adaptativo evoluir para OA, caso os estímulos aplicados tenham muita intensidade ou longa duração. A mudança de posição da cabeça da mandíbula pode explicar uma aparente redução do espaço infra-discal e adesão do disco à camada fibrosa da CAM (32). Essas alterações observadas em tempos iniciais, mediante reposicionamento mandibular, não necessariamente indicam degeneração da CAM em estágios precoces, mas na verdade, sugerem um esforço regenerativo tecidual, no qual a proliferação celular na camada proliferativa apontaria um possível aumento no número de condrócitos, os quais seriam responsáveis pela produção de proteoglicanos e inibidores de angiogênese em momento posterior, visando justamente impedir a invasão vascular na MEC e uma possível ossificação da região (33).

Assim, pode-se dizer que as alterações encontradas quanto ao conteúdo de diferentes componentes da MEC nos grupos tratados indicariam uma presumível tentativa de adaptação da CAM, o que reforça o quanto essa articulação é distinta das demais. Nesse contexto, a cartilagem parece apresentar mecanismos de ajuste às novas posições, funções ou condições e, que até certo ponto, seriam capazes de contornar as variações de carga sem grande comprometimento funcional.

### 3.1.5 Conclusão

As alterações encontradas na MEC da CAM, subsequentes a instalação da má oclusão, demonstraram uma redução inicial de proteoglicanos na matriz territorial associada ao aumento da fração de colágeno tipo I e novo depósito de proteoglicanos em momento posterior. Em conjunto, pode-se sugerir que os tecidos da articulação responderam às mudanças funcionais impostas pelo desajuste oclusal, possivelmente na tentativa de se adaptar à sobrecarga oclusal. Por fim, não se pode desconsiderar que o tempo é fator importante para que o processo deixe de ser fisiológico e passe a haver comprometimento real dos tecidos, com consequente estabelecimento de lesões degenerativas.

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espirito Santo (FAPES Universal 06/2014 Processo número 67659870).

# 3.1.7 Referências

- Vlajkovic S, Antic V, Jevremovic D, Radenkovic G. Morphological and biomechanical features of the temporomandibular joint disc: An overview of recent findings . Arch Oral Biol. 2013;8:1–8.
- Kuang B, Dai J, Wang Q, Song R, Jiao K, Zhang J, et al. Combined degenerative and regenerative remodeling responses of the mandibular condyle to experimentally induced disordered occlusion. Am J Orthod Dentofac Orthop. 2012;143(1):69–76.
- 3. Ramirez-Yanez. The Mandibular Condylar Cartilage: a Review. Int J Jaw Funct Orthop. 2004;1(1):85–94.
- Utreja A, Dyment NA, Yadav S, Villa MM, Li Y, Jiang X. Cell and matrix response of temporomandibular cartilage to mechanical loading. Osteoarthr Cartil. 2017;24(2):335–44.
- 5. Hinton RJ. Genes that Regulate Morphogenesis and Growth of the Temporomandibular Joint : A Review. Dev Dyn. 2014;24:864–74.
- Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vècsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. J bone Jt Surg. 2003;86(2).
- Toriya N, Takuma ÆT, Arakawa ÆT. Expression and localization of versican during postnatal development of rat temporomandibular joint disc. Histochem Cell Biol. 2006;205–14.

- 8. Goldring MB, Marcu KB. Review Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. 2009;16.
- Lydiatt DD. The Effects of Immobilization on the Rabbit Temporomandibular Joint. J Oral Maxillofac Surg. 1985;43:188–93.
- 10. Sinisalu V, Akermann S. Temporomandibular disorders. Eesti Arst. 2016;95(7):455–9.
- Management C, Strategies TE. Temporomandibular Joint Disorders: A Review of Etiology, Clinical Management, and Tissue Engineering Strategies. Int J Oral Maxillofac Implant. 2015;28(6).
- Kalladka M, Quek S, Heir G. Temporomandibular Joint Osteoarthritis: Diagnosis and Long-Term Conservative Management: A Topic Review. 2014;14(1):6–15.
- Bierma-zeinstra SM. Biomarkers for osteoarthritis: Can they be used for risk assessment? A systematic review. Maturitas [Internet]. 2015; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.04.004
- Schiffman E, Ohrbach R, Truelove E, Look J, Anderson G, Goulet J-P, et al. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: Recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network\* and Orofacial Pain Special Interest Group. J Oral Facial Pain Headache. 2015;28(1):6–27.
- Natiella JR, Burch L, Fries KM, Upton LG, Edsberg LE. Analysis of the Collagen I and Fibronectin of Temporomandibular Joint Synovial Fluid and Discs. YJOMS. 2009;67(1):105–13.
- 16. Birkenfeld F, Michaelis M, Lucius R. Determination of VEGF, collagen type 1 and versican in the discus articularis of the temporomandibular joint in relation to dental status. 2017;1–8.
- 17. Rabie A, Hagg U. Factors regulating mandibular condylar growth. Am J ofOrthodontics Dentofac Orthop. 2002;401–9.
- 18. Wang G, Wang M, Wang X, Yu S, Liu X, Jiao K. Changes in the expression of

MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. Arch Oral Biol. 2010;55(11):887–95.

- 19. Tanaka E, Eijden T Van, Biology CD. Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(2):138–50.
- 20. Durkin F. Secondary cartilage : A misnomer ? Am J Orthod. 1972;62:15–41.
- Shibata S, Fukada K, Suzuki S, Ogawa T, Yamashita Y. In situ hybridization and immunohistochemistry of bone sialoprotein and secreted phosphoprotein 1 ( osteopontin ) in the developing mouse mandibular condylar cartilage compared with limb bud cartilage. J Anat. 2002;1:309–20.
- Anthwal N, Chai Y, Tucker AS. The Role of Transforming Growth Factor-B Signalling in the Patterning of the Proximal Processes of the Murine Dentary. Dev Dyn. 2008;237:1604–13.
- 23. Radlanski RJ, Renz H, Klarkowski MC. Prenatal development of the human mandible. Anat Embryol. 2003;207:221–32.
- 24. Shibata S, Suda N, Suzuki S, Fukuoka H, Yamashita Y. An in situ hybridization study of Runx2, Osterix, and Sox9 at the onset of condylar cartilage formation in fetal mouse mandible. J Anat. 2006;169–77.
- Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. Ageing Res Rev [Internet]. 2017;40:20– 30. Available from: https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.07.004
- Nathaniel P, Mow VC, Foster RJ. Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure, Function, and Maintaining healthy State. J Orthop Sport Phys Ther. 1998;28(4):203–15.
- 27. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. CELL Dev Biol. 2001;12:69–78.
- Schneevoigt J, Fabian C, Leovsky C, Seeger J, Bahramsoltani M. In Vitro Expression of the Extracellular Matrix Components Aggrecan, Collagen Types I and II by Articular Cartilage- Derived Chondrocytes. 2016;43–50.

- 29. Lotz M, Loeser R. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. Bone. 2013;51(2):241–8.
- 30. Martin I, Jakob M, Scha D, Dick W, Spagnoli G, Heberer M. Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. 2001;112–8.
- 31. Miosge N, Hartmann M. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. 2004;229–36.
- 32. Cholasueksa P, Warita H, Soma K. Alterations of the Rat Temporomandibular Joint in Functional Posterior Displacement of the Mandible. 2004;74(5).
- Pesesse L, Sanchez C, Henrotin Y. Osteochondral plate angiogenesis : A new treatment target in osteoarthritis. Jt Bone Spine. 2011;78(2):144–9.



**Figura 3 - Esquema do desajuste oclusal**: esquema oclusal dos ratos controle (acima) e tratados (abaixo). Nos grupos tratados, 2 primeiros e 2 terceiros molares foram movidos de suas posições originais e perderam a intercuspidação com seus antagonistas, resultando em uma má oclusão experimental induzida ortodonticamente. *R*, direito; *L*, esquerdo; *M1*, primeiro molar; *M2*, segundo molar; *M3*, terceiro molar. (Imagem retirada da dissertação de CAROLINA BRIOSCHI MATHIAS, "ANÁLISE DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DA EXPRESSÃO DE TIMP-1 NA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL" PPGCO/UFES, 2018).



**Figura 4-** Análise do depósito de proteoglicanos em CAM de ratos demonstrou alterações na matriz territorial. A-B Animais controle de 2 semanas (C2), coloração presente em toda extensão da CAM na região da camada madura, sendo mais evidente nos terços médio e posterior. C-D Animais tratados por 2 semanas (T2), padrão de coloração mais discreto nos terços médio e posterior da cartilagem, e ausente no terço posterior. E-F Animais controle de 4 semanas (C4) observa-se leve coloração no terço posterior. G-H Animais tratados por 4 semanas (T4), a coloração está ausente no terço anterior e, torna-se bastante evidente no terço posterior. C2-controle de duas semanas; T2-tratado de duas semanas; C4-controle de quatro semanas; T4-tratado de quatro semanas e Di-disco. Técnica de coloração: azul de toluidina e fast green. Barra de escala: 50μm.



Figura 5 – Análise do terço posterior de CAM de ratos demonstrou alterações no depósito de proteoglicanos na matriz territorial da camada madura após a má oclusão experimental. A-Controle de 2 semanas, pode-se notar condrócitos da camada madura com matriz territorial bem corada e com matriz interterritoral discreta. Estão presentes halos (cabeça de setas) que circundam as lacunas onde estão os condrócitos. B- Tratado de 2 semanas, observa-se ausência de halos (setas) corados e aparentes na camada madura ao redor dos condrócitos, matriz territorial não está bem evidenciada. A matriz interterritorial também não se apresenta nessa coloração. Condrócito com halo ligeiramente corado (cabeça de seta). C- Controle de 4 semanas, é possível observar que os halos (cabeca de setas) que envolvem a lacuna em que estão os condrócitos apresentam uma coloração bastante discreta e envolvendo poucas células e a matriz interterritorial continua sem coloração. D- Tratado de 4 semanas, presença de halos corados (cabeça de setas) e bem definidos, demarcando a matriz territorial dos condrócitos na camada madura, já a matriz interterritorial não está aparente. (\*) Espaço infra-discal; Fi-fibrosa; Pr-proliferativa e Ma-madura; C2-controle de duas semanas; T2-tratado de duas semanas; C4-controle de 4 semanas e T4-tratado de 4 semanas. Fifibrosa; Pr-proliferativa e Ma-madura. Técnica de coloração: azul de toluidina e fast green. Barra de escala=50µm.



Figura 6 - Análise da expressão de colágeno tipo I na MEC da CAM de ratos demonstrou variações na presença dessa proteína nos diferentes grupos. A face articular da CAM foi dividida em terços anterior, médio e posterior, e todos os grupos apresentaram algum tipo de expressão da proteína. A-B Animais controle de 2 semanas apresentaram a expressão de colágeno tipo I de maneira evidente na camada fibrosa, tornando-se sutil na proliferativa. C-D Grupo tratado por 2 semanas, a imunomarcação foi detectada em todas as camadas da CAM. E-F Controle de 4 semanas, a expressão de colágeno tipo I foi observada nas camadas da cartilagem. G-H Animais tratados por 4 semanas, observa-se a marcação mais evidente na camada fibrosa da CAM. C2-controle de duas semanas; T2-tratado de duas semanas; C4-controle de quatro semanas; T4-tratado de quatro semanas e Di-disco. Técnica Imuno-histoquímica. Barra de escala: 50µm



Figura 7 - Imunoexpressão do colágeno tipo I no terço posterior da CAM revelou variações na deposição das fibras, bem como na organização da MEC. A- Animal controle de duas semanas no qual é possível observar presença das três camadas no terço posterior. Nessa região a presença do colágeno tipo I caracteriza a camada fibrosa (Fi) onde a disposição das fibras se faz no sentido longitudinal, paralelas à face articular (setas) e, no sentido transversal (cabecas de setas). As demais camadas (Pr e Ma) têm expressão discreta da proteína. B- Disposição das fibras colágenas nos animais tratados de duas semanas são mais densas na camada fibrosa (Fi), com padrão de organização principalmente no sentido transversal (cabeças de setas), mas também estão presentes fibras no sentido longitudinal (setas). Ainda, a expressão avança sobre a camada proliferativa (Pr) e de maneira difusa na camada madura (Ma). C- Animal controle de quatro semanas apresenta fibras de colágeno na camada fibrosa (Fi) dispostas no sentido longitudinal (setas) principalmente limítrofe à camada proliferativa (Pr) e, fibras transversais (cabeças de setas) mais superficiais. D- Animal tratado de quatro semanas apresenta expressão de colágeno principalmente na camada fibrosa (Fi), de maneira mais desorganizada, mas ainda é possível observar fibras no sentido longitudinal (setas) e transversais (cabeças de setas). Na região de transição entre as camadas proliferativa (Pr) e madura (Ma) há presença difusa da proteína.C2-controle de duas semanas; T2-tratado de duas semanas; C4controle de quatro semanas; T4-tratado de quatro semanas; Fi-fibrosa; Pr-proliferativa; Ma-madura; Di-disco; \*-espaço infra-discal. Técnica Imuno-histoquímica. Barra de escala: 50µm.

**Tabela 1.** Fração de área marcada para o colágeno tipo I na camada fibrosa do terço posterior dos animais controle e tratados de 2 e 4 semanas.

Grupos	C2	T2	T2	Τ4	C4	Τ4	C2	C4
	N=17	N=23	N=23	N=13	N=09	N=13	N=17	N=09
Mínimo	26,03	35,79	35,79	28,20	40,37	28,20	26,03	40,37
Máximo	56,95	69,18	69,18	55,18	57,20	55,18	56,95	57,20
Média	40,37	52,28	52,28	44,16	47,45	44,16	40,37	47,45
Desvio	9,804	9,961	9,961	8,854	6,224	8,854	9,804	6,224
Padrão								
Р	0.0000		0,0351*		0,5478		0,0846	
	0,0020 *							

N = número de cortes avaliados; \* P <0,05.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma desordem oclusal acarreta alterações estruturais e moleculares que, dependendo do tempo, pode evoluir para um quadro de OA. Após a instalação da má oclusão experimental, foram visualizadas alterações importantes na MEC da CAM com uma redução, em um primeiro momento, de proteoglicanos na matriz territorial e aumento da fração de área marcada para o colágeno tipo I, bem como a inversão dessas alterações nos animais tratados por mais tempo, onde a má oclusão permaneceu por 4 semanas. É de grande importância notar que essas alterações podem representar uma adaptação diante da nova condição e posição mandibular imposta e por isso a necessidade de futuros estudos em um tempo maior de tratamento, para ratificar que a CAM se adapta em um primeiro momento e se a sobrecarga for mantida, poderá evoluir para um quadro degenerativo e de necrose dos tecidos da articulação.

# **REFERÊNCIAS GERAIS**

- 1. Stocum DL, Roberts WE. Part I: Development and Physiology of the Temporomandibular Joint. Curr Osteoporos Rep. 2018;16:360–8.
- Vlajkovic S, Antic V, Jevremovic D, Radenkovic G. Morphological and biomechanical features of the temporomandibular joint disc: An overview of recent findings <sup>\*</sup>. Arch Oral Biol. 2013;8:1–8.
- Tanaka E, Eijden T Van, Biology CD. BIOMECHANICAL BEHAVIOR OF THE TEMPOROMANDIBULAR JOINT DISC. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(2):138–50.
- 4. Singh M, Detamore MS. Biomechanical properties of the mandibular condylar cartilage and their relevance to the TMJ disc. J Biomech. 2009;42(4):405–17.
- 5. Ramirez-Yanez. The Mandibular Condylar Cartilage: a Review. Int J Jaw Funct Orthop. 2004;1(1):85–94.
- Shibata S, Fukada K, Suzuki S, Ogawa T, Yamashita Y. In situ hybridization and immunohistochemistry of bone sialoprotein and secreted phosphoprotein 1 ( osteopontin ) in the developing mouse mandibular condylar cartilage compared with limb bud cartilage. J Anat. 2002;1:309–20.
- Anthwal N, Chai Y, Tucker AS. The Role of Transforming Growth Factor-B Signalling in the Patterning of the Proximal Processes of the Murine Dentary. Dev Dyn. 2008;237:1604–13.
- Radlanski RJ, Renz H, Klarkowski MC. Prenatal development of the human mandible. Anat Embryol. 2003;207:221–32.
- Chu WC, Zhang S, Sng TJ, Ong YJ, Tan W, Ang VY, et al. Distribution of pericellular matrix molecules in the temporomandibular joint and their chondroprotective effects against inflammation. 2017;9(1):43–52. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2016.57

- 10. Hinton RJ. Genes that Regulate Morphogenesis and Growth of the Temporomandibular Joint : A Review. Dev Dyn. 2014;24:864–74.
- 11. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vècsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. J bone Jt Surg. 2003;86(2).
- 12. Mayne R. CARTILAGE COLLAGENS. Arthritis Rheum. 1989; (Figure 1).
- 13. Goldring MB, Marcu KB. Review Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. 2009;16.
- Natiella JR, Burch L, Fries KM, Upton LG, Edsberg LE. Analysis of the Collagen I and Fibronectin of Temporomandibular Joint Synovial Fluid and Discs. YJOMS. 2009;67(1):105–13.
- Poole AR. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis A. Robin Poole. Front Biosci. 1999;4(6):662–70.
- Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, et al. Immunochemical and Mechanical Characterization of Cartilage Subtypes in Rabbit. 2002;50(8):1049–58.
- Junqueira I c, Carneiro J. Histologia Básica. 10th ed. Guanabara Koogan;
  2004. 495 p.
- Lydiatt DD. The Effects of Immobilization on the Rabbit Temporomandibular Joint. J Oral Maxillofac Surg. 1985;43:188–93.
- Mizoguchi I, Nakamura M, Takahashi I, Kagayama M, Mitani H. Histochemistry An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. 1990;593–9.
- Milam SB. Pathogenesis of degenerative temporomandibular joint arthritides.
  2005;7–8.
- Utreja A, Dyment NA, Yadav S, Villa MM, Li Y, Jiang X. Cell and matrix response of temporomandibular cartilage to mechanical loading. Osteoarthr Cartil. 2017;24(2):335–44.

- Management C, Strategies TE. Temporomandibular Joint Disorders: A Review of Etiology, Clinical Management, and Tissue Engineering Strategies. Int J Oral Maxillofac Implant. 2015;28(6).
- Kalladka M, Quek S, Heir G. Temporomandibular Joint Osteoarthritis: Diagnosis and Long-Term Conservative Management: A Topic Review. 2014;14(1):6–15.
- Bierma-zeinstra SM. Biomarkers for osteoarthritis: Can they be used for risk assessment? A systematic review. Maturitas [Internet]. 2015; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.04.004
- 25. Schiffman E, Ohrbach R, Truelove E, Look J, Anderson G, Goulet J-P, et al. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: Recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network\* and Orofacial Pain Special Interest Group. J Oral Facial Pain Headache. 2015;28(1):6–27.
- Hirsch R, Lethbridge-cejku M, Jr WWS, Reichle R, Plato CC, Tobin J, et al. Association of hand and knee osteoarthritis: evidence for a polyarticular disease subset. 1996;25–9.
- Alkhubaizi Q, Sorkin J, Hochberg M, Gordon S. Risk Factors for Facial Pain: Data from the Osteoarthritis Initiative Study. J Dent Oral Biol. 2018;2(3).
- Breedveld FC. Osteoarthritis the impact of a serious disease.
  2004;43(November 2003):4–8.
- Plesh O, Adams S, Gansky S. Temporomandibular Joint and Muscle Disorder (TMJMD) - type pain and Co-morbid Pains in a National US Sample. J Orofac Pain. 2013;25(3):190–8.
- Campbell TM, Reilly K, Laneuville O, Uhthoff H, Trudel G. Bone replaces articular cartilage in the rat knee joint after prolonged immobilization. Bone. 2017.
- Guilak F, Nims R, Dicks A, Wu C-L, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. Physiol Behav. 2017;176(3):139–48.

- Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. Int J Mol Sci. 2015;16(11):26035–54.
- Mcelligott TF. SULPHATE (35SO4) UPTAKE BY CHONDROCYTES IN RELATION TO HISTOLOGICAL CHANGES IN OSTEO- ARTHRITIC HUMAN ARTICULAR CARTILAGE. 1960;
- 34. Miosge N, Hartmann M. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. 2004;229–36.
- Nerlich AG, Wiest I, Mark K Von Der. Immunohistochemical analysis of interstitial collagens in cartilage of different stages of osteoarthrosis. 1993;249– 55.
- Arch V, I TA, Stiifl H, Weseloh G, Zeiler G, Mark K Von Der. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage \*. 1992;337–45.
- Aldahmash AM, Fouhil AF EI, Mohamed RA, Ahmed AM, Atteya M. Collagen types I and II distribution: a relevant indicator for the functional properties of articular cartilage in immobilised and remobilised rabbit knee joints. 2015;74(2):169–75.
- Buma P, Pieper JS, Tienen T Van, Susante JLC Van, Kraan PM Van Der, Veerkamp JH, et al. Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects — A study in rabbits. Biomaterials. 2003;24:3255–63.

# ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



# CERTIFICADO

ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 04-11-2016. outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA),e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de má oclusão experimental"Protocolo nº.50/2016, sob a responsabilidade de Letícia Nogueira da Gama de Souza pertencentes animais para fins de pesquisa científica(ou ensino)encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de Certificamos que o Projeto intitulado" Análise de aspectos morfológicos e moleculares da articulação temporomandibular em

Vigência do Projeto	Início:Novembro/2016 Término:Janeiro/2020
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	Experimento Piloto:2 Protocolo Experimental:24 Total:26
Peso/Idade	Peso: 200g Idade:8 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Mamíferos
A REAL PROPERTY AND A REAL	

Cel 14

Vitoria (ES), 04 de novembro de 2016.

# ANEXO B – DATASHEET COLÁGENO TIPO I

# abcam

# **Product datasheet**

# Anti-Collagen I antibody ab34710

\*\*\*\*\* 61 Abreviews 492 References 14 Images

Overview		
Product name	Anti-Collagen I antibody	
Description	Rabbit polyclonal to Collagen I	
Host species	Rabbit	
Tested applications	Suitable for: IHC-Fr, Indirect ELISA, WB, IHC-P, ELISA, ICC/IF, IP	
Species reactivity	Reacts with: Mouse, Rat, Sheep, Goat, Horse, Cow, Human, Pig, Common marmoset	
Immunogen	Full length native protein (purified) corresponding to Human Collagen I aa 1-1464. Collagen Type I from human and bovine placenta. Database link: P02452	
Positive control	IHC-P: Mouse kidney tissue. Sheep duodenum tissue. Pig lung tissue. Marmoset kidney tissue. Human colon and placenta tissue. Cow small intestine tissue. IHC-Fr: Mouse kidney tissue. Cow tendon tissue. ICC/IF: Horse bronchial fibroblast cells.; Human keloid and normal fibroblasts. WB: Human Collagen Type 1. Wistar rat hepatic stellate cells in GFP-transduced cell lysate.	
General notes	ab34710 is stable at 4° C as an undiluted liquid. Dilute only prior to immediate use. For extended storage, mix with an equal volume of glycerol, aliquot contents and freeze at -20° C or below.	
	For more protocol tips, please see: https://www.abcam.com/protocols/collagen	
	It is often extremely difficult to generate antibodies with specificities to collagens due to the uninterrupted "Glycine-X-Y" triplet repeat that is a necessary part of the triple helical structure. The development of type specific antibodies is dependent on NON-DENATURED three-dimensional epitopes - this may result in diminished reactivity of some antibodies with denatured collagen or formalin-fixed, paraffin embedded tissues.	
	Anti-Collagen antibodies have been used for indirect trapping ELISA for quantitation of antigen in serum using a standard curve, for immunoprecipitation and for native (non-denaturing, non-dissociating) PAGE and western blotting for highly sensitive qualitative analysis.	
	Abcam recommended secondaries - Goat Anti-Rabbit HRP (ab205718) and Goat Anti-Rabbit Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (ab150077).	
	See other anti-rabbit secondary antibodies that can be used with this antibody.	

Properties

Form

Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C long term. Avoid freeze / thaw cycle. Please see notes section.
Storage buffer	pH: 7.2 Preservative: 0.01% Sodium azide Constituents: 0.8766% Sodium chloride, 0.164% Sodium phosphate
Purity	Immunogen affinity purified
Purification notes	This antibody has been prepared by immunoaffinity chromatography using immobilized antigens followed by extensive cross-adsorption against other collagens, human serum proteins and non-collagen extracellular matrix proteins to remove any unwanted specificities. Sterile filtered.
Clonality	Polyclonal
Isotype	lgG

#### Applications

Our Abpromise guarantee covers the use of ab34710 in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
IHC-Fr	****	1/50 - 1/200.
Indirect ELISA		1/5000 - 1/50000.
WB	****	1/1000 - 1/10000. This product is not recommended for use under denaturing conditions in WB, IP, and ELISA. We would suggest testing it under native conditions. Denaturing and reducing conditions will greatly diminish reactivity and selectivity of this antibody. Abcam does not test ab34710 with endogenous samples in WB. We do recommend to look at the guidelines for blotting large proteins here. Customers have been successful using ab34710 in this application, please see references below (Tillgren V et al. J Biol Chem <b>290</b> :918-25; 2015).
IHC-P	****	Use a concentration of 5 - 10 $\mu$ g/ml. Perform heat mediated antigen retrieval with citrate buffer pH 6 before commencing with IHC staining protocol.
ELISA	****	1/5000 - 1/50000.
ICC/IF	****	1/500.
IP		1/100.

#### Target

Function	Type I collagen is a member of group I collagen (fibrillar forming collagen).		
Tissue specificity	Forms the fibrils of tendon, ligaments and bones. In bones the fibrils are mineralized with calcium hydroxyapatite.		
Involvement in disease	Defects in COL1A1 are the cause of Caffey disease (CAFFD) [MIM:114000]; also known as infantile cortical hyperostosis. Caffey disease is characterized by an infantile episode of massive		

	known as osteogenesis imperfecta with normal sclerae. A connective tissue disorder characterized by moderately short stature, mild to moderate scoliosis, grayish or white sclera and dentinogenesis imperfecta. Genetic variations in COL1A1 are a cause of susceptibility to osteoporosis (OSTEOP) [MIM:166710]; also known as involutional or senile osteoporosis or postmenopausal osteoporosis. Osteoporosis is characterized by reduced bone mass, disruption of bone microarchitecture without alteration in the composition of bone. Osteoporotic bones are more at risk of fracture. Note=A chromosomal aberration involving COL1A1 is found in dermatofibrosarcoma protuberans. Translocation t(17:22)(q22:q13) with PDGF.
Sequence similarities	Belongs to the fibrillar collagen family. Contains 1 fibrillar collagen NC1 domain. Contains 1 VWFC domain.
Post-translational modifications	Proline residues at the third position of the tripeptide repeating unit (G-X-Y) are hydroxylated in some or all of the chains. Proline residues at the second position of the tripeptide repeating unit (G-X-Y) are hydroxylated in some of the chains. O-linked glycan consists of a Glc-Gal disaccharide bound to the oxygen atom of a post-translationally added hydroxyl group.
Cellular localization	Secreted > extracellular space > extracellular matrix.

## ANEXO C – NORMAS DA ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY



ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.3
•	Guide for Authors	p.4



#### DESCRIPTION

Archives of Oral Biology operates a web-based submission and review system. Please register at http://ees.elsevier.com/aob to submit a paper.

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the **oral** and **craniofacial** sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of **craniofacial development** and **disease**, including: **Cell** and **molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Cellular microbiology Embryology Syndromology Forensic dentistry** The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

#### AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

#### IMPACT FACTOR

2017: 2.050 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

#### ABSTRACTING AND INDEXING

BIOBASE Nutrition Research Newsletter Nutrition Abstracts and Reviews Series PharmacoEconomics and Outcomes News Pig News and Information Reactions Weekly Review of Medical and Veterinary Entomology Science Citation Index SIIC Data Bases Soils and Fertilizers Sugar Industry Abstracts Tropical Diseases Bulletin Veterinary Bulletin Vitis Viticulture and Enology Abstracts **Biological Abstracts** Animal Breeding Abstracts BIOSIS Previews Current Awareness in Biological Sciences Abstracts in Anthropology Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases Dairy Science Abstracts GeoRef Index Veterinarius Inpharma Weekly Medical and Surgical Dermatology Abstracts of Mycology AgBiotech News and Information Maize Abstracts Online Review of Agricultural Entomology Small Animals Soybean Abstracts (Online Edition) Speleological Abstracts Agris Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts Arts and Humanities Citation Index CABI Information Cancerlit Gale Database of Publications & Broadcast Media Global Health Inside Conferences ISI Science Citation Index Pascal RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances) SciSearch SPORTDiscus TOXFILE UnCover Zoological Record BIOSIS Toxicology CSA Life Sciences Abstracts Research Alert BIOSIS Elsevier BIOBASE Chemical Abstracts Current Contents/Life Sciences Current Contents/BIOMED Database Current Contents/Science Citation Index Current Contents/SciSearch Database MEDI INE®

#### EDITORIAL BOARD

#### Editors-in-Chief:

G.B. Proctor, Salivary Research Unit, Dental Institute, King's College London, Floor 17 Guy's Tower, London, SE1 9RT, UK S.W. Cadden, University of Dundee, Dundee, UK

#### Associate Editors:

F. Lundy, Queen's University, Belfast

**D. Grenier**, Laval University, Quebec City, Canada

- G. N. Belibasakis, Karolinska Institute, Sweden T. Wright, University of North Carolina, Chapel Hill, USA

#### Editorial Board:

V. Arana-Chavez, São Paulo, Brazil Z. Bian, Hubei, China M.R. Byers, Seattle, USA G.H. Carpenter, London, UK P.M. Castelo, São Paulo, Brazil J-h Chen, Xi'an, China K. Cogo-Müller, São Paulo, Brazil C. Dawes, Manitoba, Canada X. Duan, Xi'an, Shaanxi M.B.D. Gaviao, São Paulo, Brazil S. Herring, Seattle, USA Y. Jin, Xi'an, China C.P. McArthur, Kansas City, USA L. Mei, Hong Kong, China G. Murray, University of Sydney, Sydney, Australia J.Y. Ro, Maryland, USA C. Robinson, Leeds, UK L.P. Samaranayake, Queensland, Australia **B.J. Sessle**, Toronto, Canada **P.T. Sharpe**, London, UK **A.J. Smith**, Birmingham, UK P. Stashenko, Boston, USA D. Steinberg, Jerusalem, Israel H. Suda, Tokyo, Japan K. Tanne, Hiroshima, Japan H.W. van der Glas, Utrecht, The Netherlands L.J. Walsh, Brisbane, Australia M. Wang, Xi'an, China T. Zelles, Budapest, Hungary

#### **GUIDE FOR AUTHORS**

Editors-in-Chief:

#### Professor G B Proctor, London, UK Professor S W Cadden, Dundee, Scotland

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

#### Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

#### Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

#### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded: Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- · Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts (where applicable)
- Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Deference List are sited in the text, and vice versa

• Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

- Relevant declarations of interest have been made
- · Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center

#### **BEFORE YOU BEGIN**

#### Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

#### Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

*σ*ε πιδικατεία, απ**ι**ζ where αρβιορήατε, της πημασικές (οι association) οι sex on the results of the study.

#### Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

#### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

#### Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

#### Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

#### Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

#### 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.

#### Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

#### Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

#### Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

#### Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

#### Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### Subscription

• Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.

No open access publication fee payable by authors.

• The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. **Gold open access** 

• Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

• A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: https://www.elsevier.com/openaccesspricing.

#### Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

#### Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

#### Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

#### PREPARATION

#### Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

#### Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

#### Article structure

#### Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

#### Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

#### Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

#### Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

#### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

#### Essential title page information

• *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.** 

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

#### Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

#### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

#### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### **Abbreviations**

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

#### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

#### Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. 'S. aureus' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g.'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus Staphylococcus'. For genus in plural, use lower case Roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g.'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

#### Artwork

#### Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

#### Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

• Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- · Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- A detailed guide on electronic artwork is available.

#### You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### Please do not:

• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

Supply files that are too low in resolution;

• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### 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.

#### Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

#### Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. Journal of Scientific Communications, 163, 51–59. https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372. Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205. Reference to a book:

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). The elements of style. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). http://www.cancerresearchuk.org/ aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/ Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

#### Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

#### Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

#### Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

#### Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

#### AFTER ACCEPTANCE

#### Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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. It is important to ensure that all 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.

#### Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. 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 gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

#### Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

· Use of parametric tests when non-parametric tests are required

• Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.

• Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.

• Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.

• Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")

• n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply n=50 when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).

- Stating that P=0.000 (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is P<0.0005.

#### AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | https://www.elsevier.com