



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

JONAS NOGUEIRA FERREIRA MACIEL GUSMÃO

**EFEITO DA ELETROACUPUNTURA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
RATOS COM ARTRITE REUMATOIDE**

FORTALEZA

2019

JONAS NOGUEIRA FERREIRA MACIEL GUSMÃO

**EFEITO DA ELETROACUPUNTURA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
RATOS COM ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia, da Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Delane Viana Gondim

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G99e Gusmão, Jonas Nogueira Ferreira Maciel.
EFEITO DA ELETROACUPUNTURA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS COM
ARTRITE REUMATOIDE / Jonas Nogueira Ferreira Maciel Gusmão. – 2019.
75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Delane Viana Gondim.

1. Artrite Reumatoide. 2. Periodontite. 3. Eletroacupuntura. 4. Reabsorção Óssea Alveolar. 5. Citocinas
Inflamatórias. I. Título.

CDD 611

JONAS NOGUEIRA FERREIRA MACIEL GUSMÃO

**EFEITO DA ELETROACUPUNTURA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
RATOS COM ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Defesa em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Delane Viana Gondim (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Mário Roberto Pontes Lisboa
Centro Universitário Christus - Unichristus

Aos meus pais, esposa e filhos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, princípio, meio e fim de tudo.

Aos meus pais **Onildo e Francy**, pelo zelo em minha educação, amor, sobretudo pelos princípios éticos.

A minha amada esposa **Camilla** pela paciência, carinho e amor durante esse período e que viveu e lutou para realização desse sonho e me presenteou com os nossos os nossos filhos **Clara e Lucas**.

À Prof. Dra. **Delane Viana Gondim**, agradeço por ter aceitado minha orientação e ter aberto a portas desse universo da pós-graduação, por todo empenho, sabedoria, compreensão, que muitas vezes acreditou mais em mim do que eu mesmo e ter me ajudado a não desistir desse desafio. Deus lhe abençoe sempre. Muito obrigado!

À Profa. Dra. **Karuza Maria Alves Pereira**, por aceitar participar da banca de qualificação desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

À Prof. Dra. **Mariana Lima Vale**, por aceitar participar da banca de defesa desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

Ao Prof. Dr. **Mário Roberto Pontes Lisboa**, por aceitar participar da banca de defesa desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

À Profa. Dra. **Paula Goes Pinheiro Dutra**, por aceitar participar da banca de qualificação desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

Ao amigo **Howard Lopes Ribeiro Júnior**, meus sinceros agradecimentos por sua amizade, pela cooperação e por seus inestimáveis ensinamentos estatísticos e metodológicos nesse trabalho. Desejo sempre seu sucesso. Muito obrigado meu amigo!

À **Khetyma Moreira Fonseca**, pela amizade e apoio a todos os experimentos deste estudo. Desejo sempre seu sucesso Muito obrigado minha amiga!

Ao **Bruno Sousa Pinto Ferreira**, pela amizade e apoio a todos os experimentos deste estudo. Desejo sempre seu sucesso. Muito obrigado meu amigo!

Ao **Bruno Wesley de Freitas**, pela amizade e apoio a todos os experimentos deste estudo. Desejo sempre seu sucesso. Muito obrigado meu amigo!

Aos amigos **Helson Freitas da Silveira, Carlos Roberto de Oliveira Leite e Alceu Machado de Sousa** pela amizade, apoio, compreensão. Meus sinceros agradecimentos!

Ao irmão do coração **João Anderson de Brito Mascarenhas** (in memoriam), amigo desde a faculdade, que não teve oportunidade de realizar esse sonho de fazer mestrado, mas sempre torceu por mim.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial a **Luane Macêdo, Gisele Barreto e Lorena Vieira e Josy** por todo o apoio nos experimentos realizados e conselhos intelectuais. **Ealber Luna, Sthefane Feitosa, Khalil Viana, Diego Thiers e Ana Carolina** pela amizade, e pelos momentos de descontração.

A todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais**, por apoiar continuamente a evolução da qualidade formativa deste programa. Meus sinceros agradecimentos.

Destaco meus sinceros agradecimentos a cada um que compõe o **Laboratório Farmacologia e Inflamação do Câncer (LAFICA), Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) e Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimentos de Medicamentos (NPDM)**.

Ao **CNPq** e a **CAPES**, pelo auxílio financeiro as pesquisas.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Artrite reumatoide (AR) e periodontite são doenças inflamatórias crônicas e progressivas. Estudos demonstram a associação entre essas duas condições por vias ambientais, genéticas e imunológicas. A eletroacupuntura (EA) tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios no tratamento da periodontite experimental (PE) e da AR. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da EA no desenvolvimento e progressão da PE em ratos com AR. Ratos Wistar foram divididos em sete grupos experimentais (n = 6): (1) Grupo C (controle); (2) Grupo AR (animais com AR); (3) Grupo AR / EA (animais com AR e tratados com EA); (4) grupo PE (PE); (5) Grupo PE / EA (animais com PE e tratados com EA); (6) Grupo PE / AR (animais artríticos com PE); e (7) Grupo AR / PE / EA (animais artríticos com PE e tratados com EA). No dia 0. Os animais do grupo AR receberam injeção subcutânea de colágeno bovino tipo II (CII) emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (IFA) na base da cauda. No dia 07, foi administrada uma dose de reforço de CII com IFA. No dia 28, nos grupos PE, a periodontite foi induzida por uma ligadura ao redor do segundo molar superior esquerdo, que permaneceu em posição por 11 dias. A EA foi iniciada com CII + IFA um dia antes da injeção de reforço e a cada três dias até o final do protocolo experimental (dia 36). Todos os animais foram eutanasiados 39 dias após o início da AR experimental. Os maxilares foram removidos e vários parâmetros foram avaliados: (1) análise macroscópica da perda óssea alveolar; (2) análise histomorfométrica para quantificação da perda óssea na área de furca; e (3) imunistoquímica para interleucinas (IL) -6 e -17 e fator nuclear (NF) - κ B no ligamento periodontal. O tecido gengival ao redor do segundo molar superior foi coletado para quantificação da IL-1 β . O edema da pata e o limiar nociceptivo foram mensurados através de plestimometria e uso de analgésímetro digital, respectivamente. As análises histomorfométricas e macroscópicas mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos Controle e PE/ EA. O tratamento com EA não reduziu a perda óssea no grupo AR / PE. Os grupos tratados com EA apresentaram menor imunexpressão de IL-6 e IL-17, enquanto que a imunomarcagem de NF- κ B foi significativamente menor apenas nos animais do grupo AR / PE. O tratamento com EA reduziu significativamente os níveis de IL-1 β nos tecidos gengivais apenas na presença de PE. Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que a EA reduz parâmetros inflamatórios, mas não a perda óssea alveolar, na PE em ratos artríticos.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide; Periodontite; Eletroacupuntura; Reabsorção Óssea Alveolar e Citocinas Inflamatórias.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) and periodontitis are chronic and progressive inflammatory diseases. Studies show the association between these two conditions by environmental, genetic and immunological way. Electroacupuncture (EA) has shown anti-inflammatory effects on experimental periodontitis (EP) and RA. The purpose of this study was to evaluate the effects of EA on the development and progression of experimental periodontitis (EP) in rats with RA. Wistar rats were divided into seven experimental groups (n = 6): (1) Group C (control); (2) Group RA (animals with RA); (3) Group RA/EA (animals with RA and treated with EA); (4) Group EP (EP); (5) EP/EA Group (EP and EA-treated); (6) EP/RA Group (arthritic animals with EP); and (7) RA/EP/EA Group (EP and EA-treated arthritic animals). On day 0 in the RA groups, RA induced subcutaneous injection of bovine collagen type II (CII) emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA) into the base of the tail. On day 07, a booster dose of CII with IFA was administered. On day 28, in the EP groups, periodontitis was induced by a ligature around the left upper second molar, which remained in position for 11 days. EA was started one day before the booster injection with CII + IFA and every three days until the end of the experimental protocol (36th day). All animals were euthanized 39 days after the onset of experimental RA. The maxillae were removed, and several parameters were evaluated: (1) macroscopic analysis of alveolar bone loss; (2) histomorphometric analysis for quantification of furcation bone loss; and (3) immunohistochemistry for interleukins (IL)-6 and -17 and nuclear factor (NF)- κ B in periodontal tissues. Gingival tissue around the second upper molar was collected for the quantification of IL-1 β . Paw edema and nociceptive threshold were measured by plestimometer and digital analgesimeter, respectively. Histomorphometric and macroscopic analyses showed that there were no significant differences between the Control and EP/EA groups. Treatment with EA did not reduce alveolar bone loss in the RA/EP group. The groups treated with EA showed reduced IL-6 and -17 immunolabeling, while NF- κ B was observed only in the animals of the RA/EP group. EA treatment caused a significant reduction in IL-1 β levels in gingival tissue only in the presence of EP. Within the limits of the present study, it can be concluded that EA reduces the inflammatory parameters, but not alveolar bone loss, in EP in arthritic rats.

Keywords: Rheumatoid Arthritis; Periodontitis; Electroacupuncture; Alveolar Bone Resorption and Inflammatory Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| ACPA | anticorpos anti-proteína citrulinada |
| AINEs | Anti-inflamatórios não esteroidais |
| AR | Artrite Reumatoide |
| CIA | artrite induzida por colágeno |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animal |
| ATM | articulação temporomandibular |
| DMARDs | Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença |
| DP | Doença periodontal |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | Imunoensaio enzimático |
| IFA | Adjuvante incompleto de Freund |
| IL | Interleucina |
| MMP | Metaloproteinases da matriz |
| OPG | Osteoprotegerina |
| PBS | Solução salina tamponada fosfatada |
| PE | Periodontite |
| RANK-L | Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-beta |
| RAR | Raspagem e alisamento radicular |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral-alfa |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1- INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1- Periodontite: um modelo de resposta imunoinflamatória | 12 |
| 1.2- Artrite reumatoide: um segundo modelo de resposta inflamatória | 13 |
| 1.3- Associação da AR com Periodontite | 15 |
| 1.4- Utilização da eletroacupuntura na periodontite | 16 |
| 1.5- Utilização da EA no tratamento da AR | 17 |
| 1.6- Utilização da EA experimental no tratamento de animais com periodontite e AR | 18 |
| 2- OBJETIVOS | 20 |
| 2.1- Objetivo Geral | 20 |
| 2.2- Objetivos Específicos | 20 |
| 3- DESENVOLVIMENTO | 21 |
| ARTIGO | 22 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 48 |
| REFERÊNCIAS | 49 |
| ANEXO A | 60 |
| ANEXO B | 61 |

1 INTRODUÇÃO

1.1. Periodontite: um modelo de resposta imunoinflamatória

A periodontite é caracterizada por um processo inflamatório que leva a destruição dos tecidos moles e duros que suportam as unidades dentárias. Estima-se que a sua forma mais comum, a periodontite crônica, acomete de 35% a 60% da população adulta (OLIVER; BROWN; LÖE, 1998) e a sua forma mais severa de 5% a 10% da população mundial (DYE, 2012).

Ela apresenta etiologia multifatorial, sendo que resposta do hospedeiro frente à infecção bacteriana é um importante fator no processo de destruição dos tecidos periodontais (BISSETT; PUMERANTZ; PRESHAW, 2015). Os pré-requisitos para um tratamento periodontal convencional bem-sucedido são a cooperação do paciente, uma adequada higiene oral (CHAN et al., 2016) e o debridamento mecânico de todas as superfícies dentárias (Raspagem e Alisamento Radicular- RAR) (LINDHE; NYMAN, 1985; CHAN et al., 2016).

Em resposta ao agente bacteriano, ocorre, inicialmente, uma reação inflamatória local que ativa o sistema imune inato, que é caracterizada pela ativação de células residentes e pela migração de Leucócitos.

A amplificação desta resposta inicial resulta na liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios, levando à propagação da inflamação através dos tecidos gengivais, bem como, ativando a resposta humoral e a mediada por células (GARLET et al., 2006; GRAVES; LI; COCHRAN, 2011), levando ao influxo de células T e B para o local da inflamação (SILVA et al., 2015). A falha em conter e destruir efetivamente o agente infeccioso dentro do tecido gengival resulta na expansão da resposta em direção ao osso alveolar (GARLET et al., 2006; GRAVES; LI; COCHRAN, 2011)

Recentemente, Koshy e colaboradores (2019), descreveram que as redes de citocinas regulam as respostas imunes inatas e adaptativas, que por sua vez são reconhecidas como direcionadoras da progressão ou quiescência da periodontite. Nesta visão, os autores compararam o perfil de sete citocinas: interleucina (IL)-6, interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-2, IL-17 A, IL10 e fator de necrose tumoral (TNF)- α envolvidas na regulação das células T em amostras de fluido gengival crevicular de pacientes com diferentes classificações de *status* periodontal. Dentre os quatro grupos avaliados (pacientes com periodontite crônica, periodontite agressiva, gengivite e sem inflamação), foram identificados que as concentrações médias de todas as citocinas analisadas foram mais altas para as amostras de gengivite e menores para as amostras de periodontite agressiva. Os pacientes com gengivite

demonstraram uma concentração média de IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α muito superior do que os pacientes com periodontite agressiva. Os autores identificaram que as citocinas pró-inflamatórias geralmente estiveram associadas à destruição do tecido periodontal, incluindo osso, sugerindo que essas citocinas podem adicionalmente fornecer papéis protetores na prevenção da progressão para formas avançadas de periodontite (KOSHY et al., 2019).

A nova classificação da Academia Americana de Periodontia e da Federação Europeia de Periodontia (2018) incorpora a periodontite associada a doenças e desordens sistêmicas. Entre essas condições, estão incluídas a diabetes mellitus, obesidade, osteoporose, estresse emocional e as artrites (artrite reumatoide e osteoartrite) (STEFFENS; MARCANTONIO, 2018)

Curiosamente, na última década, houve maior interesse da comunidade científica nas investigações epidemiológicas e patológicas relacionadas à artrite reumatoide (AR) e a periodontite. Estudos demonstram que há uma forte relação entre essas duas doenças (LUNDBERG et al., 2010; SAKKAS et al., 2014; RAHAJOE et al., 2019). Lundberg e colaboradores (2010) sugerem que a periodontite poderia ser um importante fator para o início e manutenção das respostas inflamatórias autoimunes que ocorrem na AR, e que esta pode funcionar como um modulador para a resposta imune no periodonto do hospedeiro, aumentando a suscetibilidade à periodontite em adultos (LUNDBERG et al., 2010). Alguns estudos demonstram piores condições periodontais, em adultos e jovens, além de maior frequência de perda dentária em pacientes com AR (ARKEMA; KARLSON; COSTENBADER, 2010). Pacientes com artrite idiopática juvenil possuem maior suscetibilidade a periodontite quando comparados a indivíduos saudáveis da mesma faixa etária (HAVEMOSE-POULSEN et al., 2007; FABRI et al., 2014).

1.2. Artrite Reumatoide: um segundo modelo de resposta inflamatória

A AR é uma desordem inflamatória autoimune, crônica e progressiva, caracterizada por sinovite e destruição articular grave. É considerada uma poliartrite inflamatória crônica, apresentando o comprometimento de 5 ou mais articulações (MYASOEDOVA et al., 2010; SACKS; LUO; HELMICK, 2010).

A patogênese da AR envolve a proliferação das células sinoviais e a presença de fibrose, além de erosão da cartilagem e de ossos. Este processo é mediado por uma rede interdependente de citocinas, prostanoídes e enzimas proteolíticas. Citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α , são mediadores centrais na AR. A hiperplasia, o aumento da vascularização e a infiltração de células inflamatórias na área de articulação são

consequência da liberação de mediadores inflamatórios a partir de macrófagos, células T *helper* (Th) 1 e Th17, células sinoviais e fibroblastos (QUINTEIRO et al., 2012; AMDEKAR et al., 2014).

Estudos em humanos demonstram que a periodontite e a AR apresentam mecanismos de patogênese similares (ARUNACHALAM, 2014; GONZALEZ et al., 2014). Embora nenhuma relação causal possa ser estabelecida, pacientes com AR apresentam pior condição periodontal em comparação com pacientes sem AR (DE SMIT et al., 2015). Além disso, estudos em animais sugerem uma inter-relação entre bactérias periodontais, inflamação, destruição óssea alveolar e doença articular mediada, em parte, por TNF- α (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2012; CORRÊA et al., 2016).

Clinicamente, uma das condições evidentes na AR é a ocorrência de sinovite, que é caracterizada pela presença de infiltração leucocitária, proliferação da camada de sinoviócitos, ativação de osteoclastos, presença de mastócitos, células B e células Th17 (VANDOOREN et al., 2008; WANG et al., 2011). No fluido sinovial há várias citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-15 e IL-17 (ASTRY; HARBERTS; MOUDGIL, 2011), bem como o ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-B (RANK-L) (ROMAS; GILLESPIE; MARTIN, 2002).

A função das células Th17 e de sua citocina IL-17 tem sido descrita em modelos de inflamação e de doenças autoimunes, como a doença de Crohn e a AR (TESMER et al., 2008). Estudos tem demonstrado que a célula Th17 apresenta importante papel na patogênese do dano tecidual causado pelas respostas imunes mediadas por células contra a infecção bacteriana (ABUSLEME; MOUTSOPOULOS, 2017).

Nas articulações inflamadas, as células Th17 produzem citocinas inflamatórias que ativam osteoclastos e macrófagos, bem como provocam recrutamento de leucócitos. O infiltrado leucocitário produz citocinas, quimiocinas e enzimas que levam a erosão óssea, danos à cartilagem e inflamação crônica (SANDAL et al., 2016; SOMMER et al., 2019). De Aquino et al. (2017) demonstraram que as células Th17 e a expressão de suas citocinas podem estar relacionadas com a progressão da periodontite. A atividade de tais células está relacionada com a perda de inserção e aumento da profundidade à sondagem, indicando que pode haver um potencial mecanismo para as células Th17 na periodontite (DE AQUINO et al., 2017).

1.3 Associação da AR com Periodontite

Kim et al. (2018) sugerem que a periodontite e a artrite reumatoide (AR) compartilham uma patogênese inflamatória similar. Eles realizaram um estudo para avaliar as relações entre as duas doenças e identificar suas implicações clínicas, com foco nos patógenos periodontais em adultos coreanos. Foi realizado um estudo prospectivo transversal onde incluíram 260 pacientes com AR e 86 controles pareados por idade e sexo sem artrite, comparando os índices periodontais, a prevalência e quantidade de periodontopatógenos. O resultado desse estudo mostrou que o grupo AR apresentou valores significativamente maiores que o grupo controle para todos os índices periodontais investigados, exceto o número de dentes, concluindo que valores crescentes de índices periodontais poderiam ser usados como um indicador de risco para o desenvolvimento da doença em pacientes com AR (KIM et al., 2018).

Uma das teorias que tenta explicar como a periodontite seria uma condição de risco à AR baseia-se no fato de que a exposição crônica aos lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias periodontopatogênicas presentes na periodontite atua como uma fonte de superantígenos ao hospedeiro, podendo iniciar a cascata imunológica observada na AR (MERCADO et al., 2000).

As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel fundamental na patogênese da periodontite e da AR. Diferentes linhas de evidências tem sugerido um papel relevante do eixo inflamatório denominado IL-23/IL-17 na patogênese da AR através da cooperação e/ou sinergismo com outras citocinas, como IL-1 β e TNF- α , com subsequente amplificação da inflamação ou alterações no eixo RANK-RANKL/Osteoprotegerina (OPG), o qual está envolvido no processo de osteoclastogênese. Estas evidências confirmam, então, a participação de IL-23 e de IL-17 no processo de reabsorção óssea (DE AQUINO et al., 2014). Neste contexto, as destruições periodontais e articular na AR têm em comum uma resposta do hospedeiro direcionada aos tecidos duros decorrentes de uma inflamação crônica nos tecidos adjacentes. Tal fato leva a uma degradação excessiva dos tecidos ricos em colágeno: gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar na periodontite, e cartilagem, tecido periarticular e erosão óssea na AR (DE AQUINO et al., 2014).

Ensaios clínicos tem demonstrado que o tratamento periodontal não cirúrgico pode reduzir a inflamação presente na AR, o que foi observado por meio do índice *Disease Activity Score* 28 (DAS28) (ERCIYAS et al., 2013; OKADA et al., 2013). O estudo realizado por Biyikoğlu et al. (2013) demonstrou que houve redução no índice DAS28 em pacientes apresentando AR e periodontite crônica tratados com RAR. Payne et al (2015) sugerem RAR

e administração de doses subantimicrobianas de doxiciclina (20mg/kg), associadas ou não a Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) no tratamento da periodontite em pacientes com AR, e enfatizam a necessidade de estudos longitudinais sobre a inter-relação periodontite e AR (BIYIKOĞLU et al., 2013; PAYNE et al., 2015).

Estudos em animais, em diferentes modelos experimentais, demonstraram que a *Porphyromonas gingivalis* influenciou o início e a gravidade da AR, em níveis macroscópico e/ou histológico, sendo também um fator importante para a manutenção das respostas inflamatórias autoimunes que ocorrem na AR (BARTOLD et al., 2010; LINDBERG et al., 2010; MARCHESAN et al., 2013).

Gamel e colaboradores (2017) realizaram um estudo que avaliou a relação do nível de TNF- α em amostras salivares entre pacientes com AR e periodontite crônica, bem como indivíduos saudáveis. Cento e setenta e um pacientes foram incluídos neste estudo, divididos em pacientes diagnosticados com AR, periodontite crônica e indivíduos saudáveis. Os resultados revelaram uma diferença significativa em todos os parâmetros periodontais entre os três grupos. Os autores concluem que pacientes com periodontite crônica apresentam os maiores índices periodontais, e que esse resultado não depende dos níveis de TNF- α salivar. (GAMEL et al., 2017).

1.4 Utilização da eletroacupuntura na periodontite

A RAR é a terapia padrão ouro para o tratamento da periodontite, entretanto este tratamento isoladamente pode não produzir os resultados clínicos desejados em casos severos de periodontite, levando a recolonização por patógenos e a recorrência da doença (BEREZOW; DARVEAU, 2011). Desse modo, o desenvolvimento de novas e efetivas estratégias terapêuticas como adjuvantes ao tratamento clínico periodontal se faz necessário.

A EA é uma modalidade da acupuntura que consiste na utilização de estímulo elétrico que passa através das agulhas ou diretamente através da pele, emitido por meio de um aparelho de eletroestimulação. É usada no tratamento de doenças crônicas e degenerativas, no entanto, pouco se sabe sobre os pontos de acupuntura específicos que inibem a dor inflamatória ou os mecanismos que estão por trás desses efeitos.

Estudos demonstram que acupuntura pode reduzir a expressão gênica e os níveis proteicos de várias citocinas pró-inflamatórias (GONDIM et al., 2012a, 2012b; J. et al., 2015; CHEN et al., 2017). Tem sido usado como tratamento em diferentes doenças, como artrite, asma, dores neuropáticas e distensão colorretal (YIM et al., 2007; CARNEIRO et al., 2010; ESHKEVARI et al., 2015; DONG et al., 2016). Também foi demonstrado experimentalmente

que o tratamento por EA é capaz de alterar o metabolismo ósseo, aumentando a proliferação celular e a densidade mineral óssea (ZHOU et al., 2012; INOUE et al., 2013).

Lisboa et al (2015) investigaram a ação da EA na periodontite experimental em ratos, demonstrando que o tratamento com EA nesse modelo experimental foi capaz de reduzir a perda óssea no grupo de animais com periodontite, diminuiu a expressão gênica de IL-1 β e de metaloproteinase (MMP) -8 e reduziu a imunexpressão de RANKL.

Em outro estudo realizado pelo nosso grupo, a participação dos receptores CB1 e CB2 no efeito antirreabsortivo da EA foi avaliada no mesmo modelo de periodontite experimental (PE) em ratos. Os autores observaram um aumento da perda óssea na região de furca nos grupos de animais com PE, quando comparados com os grupos controle e tratados com EA. Foi observado nos tecidos periodontais aumento significativo de CB2 no grupo tratado com EA. Em relação ao CB1, este apresentou aumentada imunexpressão nos tecidos neurais (gânglio e trato espinhal do trigêmeo) no grupo tratado com EA. Os autores concluíram que o tratamento com EA na presença de doença óssea inflamatória reduziu perda óssea alveolar e aumentou a imunexpressão de CB1 nos tecidos neurais e de CB2 nos tecidos periodontais (ALVES et al., 2019).

1.4.2 Utilização da EA no tratamento da AR

O objetivo primário do tratamento de pacientes portadores de AR consiste no controle da dor inflamatória no intuito de melhorar a qualidade de vida. A terapêutica medicamentosa adotada requer o uso de AINES ou de corticoides, estes com atividade anti-inflamatória e imunorregulatória (FABRI et al., 2014). Nos últimos anos, novos medicamentos surgiram, como as drogas antirreumáticas modificadores da doença (DMARDs), entretanto os efeitos colaterais são relevantes (FABRI et al., 2014; LOPEZ-OLIVO et al., 2014; RUTHERFORD; NIKIPHOROU; GALLOWAY, 2017).

As DMARDs interferem no alívio dos sintomas e alteram a progressão da AR (OKADA et al., 2013). O metotrexato atua sobre a produção de TNF- α e na inibição de uma enzima envolvida no metabolismo do ácido fólico, apresentando como efeitos adversos, problemas estomacais, náuseas, dor abdominal e alterações hepáticas (LOPEZ-OLIVO et al., 2014). Drogas antimaláricas, como a hidroxicloroquina, tem sido utilizadas no tratamento da AR, atuando sobre a resposta imune, entretanto pode causar importantes danos à retina (YUSUF et al., 2017).

Os efeitos anti-inflamatórios, antiartríticos e imunoreguladores da EA com o acuponto ST36 na artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongos, constatou uma redução

significativamente os níveis de IL-6, TNF- α , INF- γ e preveniu a destruição da articulação do joelho. A eficácia é mais relevante quando a EA é iniciada nos primeiros estágios de desenvolvimento da AR (YIM et al., 2007).

O efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da EA na artrite experimental da articulação temporomandibular (ATM) de ratos foi avaliado e mostrou que a EA é capaz de reduzir migração neutrofílica, permeabilidade vascular e imun expressão de citocinas inflamatórias (GONDIM et al., 2012a). Em outro trabalho, o mesmo grupo constatou que EA ativa o sistema endocanabinóide na artrite experimental induzida pelo zymosan na ATM de ratos, e que essa ativação parece mediar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da EA nesse modelo experimental (GONDIM et al., 2012b).

1.4.3 Utilização da EA experimental no tratamento de animais com periodontite e AR

Até o presente momento verifica-se que não há estudos sobre os efeitos da EA na associação periodontite-AR. É importante ser enfatizado que o tratamento inicial clássico para pacientes com AR inclui a utilização de AINEs (CHI et al., 2014; NANAU; NEUMAN, 2014). Já o tratamento padrão para a periodontite consiste no controle do biofilme dental e RAR (BEREZOW; DARVEAU, 2011). Quando a periodontite não responde de maneira favorável à terapia convencional, terapias adjuvantes, como a antibioticoterapia, são indicadas (FUNOSAS et al., 2012; BLAIR; CHAPPLE, 2014; GILLAM; TURNER, 2014; PRAKASAM; SRINIVASAN, 2014). Devido ao aumento da incidência de resistência a antibióticos e aos efeitos colaterais das drogas sintéticas utilizadas para tratamento da AR, a adoção de terapias conservadoras, reversíveis e capazes de modular a resposta inflamatória do hospedeiro, torna a acupuntura ou eletroacupuntura (EA) como um promissor recurso terapêutico no tratamento da periodontite e da AR (GONDIM et al., 2012a; SEO; PARK; BAEK, 2013; LISBOA et al., 2015; ZHU et al., 2015).

Com foco na periodontite, tem sido estudada uma nova abordagem para o tratamento desta condição, envolvendo, principalmente, o controle das respostas do hospedeiro à agressão bacteriana (MARTINS et al., 2016; ALEXANDRE et al., 2018). Com base na premissa de que a resposta imunoinflamatória é um fator primordial na determinação da severidade da doença periodontal, alguns autores propuseram o conceito de “modulação da resposta do hospedeiro”, com intervenções que visam modular essa resposta (SUOKAS et al., 2015; RAHAJOE et al., 2019; VIEIRA et al., 2019). Nesse intuito a acupuntura vem sendo utilizada para o tratamento de diversas doenças e nosso grupo demonstrou previamente que o tratamento por EA apresentou efeito anti-inflamatório no modelo de periodontite

experimental (LISBOA et al., 2015; ALVES et al., 2019). Haruta (2012) demonstrou que a EA, através do receptor vaniloide 1 (TRPV-1), estimula a produção de IL-11, uma citocina anti-inflamatória, em células do ligamento periodontal de humanos (HARUTA, 2012).

Considerando que a AR pode agravar a periodontite, sendo também biologicamente plausível o agravamento da AR por esta doença, e que o tratamento atualmente utilizado para AR apresenta sérios efeitos colaterais, novas condutas terapêuticas com o objetivo de modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro devem ser investigadas para a associação dessas duas doenças (PAYNE et al., 2015). Nesse contexto, foi utilizado um modelo experimental de AR sistêmica, a partir da administração de colágeno bovino tipo II em murinos, atrelada a indução de PE, a fim de investigar como se comporta o desenvolvimento da periodontite em ratos artríticos, em especial quando os animais são submetidos a tratamento com EA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da EA no desenvolvimento e progressão da periodontite em ratos portadores de AR experimental.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desenvolvimento da AR através da análise de edema de pata e limiar nociceptivo em animais artríticos;
- Avaliar a perda óssea alveolar macroscópica nos animais artríticos e/ou com periodontite e tratados com eletroacupuntura;
- Avaliar a perda de osso inter-radicular nos animais artríticos e/ou com periodontite e tratados com eletroacupuntura;
- Avaliar parâmetros inflamatórios através da imunoexpressão de IL-6, IL-17 e NF- κ B no ligamento periodontal nos animais artríticos e/ou com periodontite e tratados com eletroacupuntura;
- Avaliar os níveis de IL-1 β no tecido gengival nos animais artríticos e/ou com periodontite e tratados com eletroacupuntura.

3 DESENVOLVIMENTO

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o projeto de pesquisa referente a esta dissertação foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob número de protocolo 48/2017 (Anexo A).

Esta dissertação de Mestrado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Este capítulo consta de uma cópia do artigo científico de autoria do candidato, redigido de acordo com as normas da revista científica escolhida para publicação (“Journal of Periodontal Research”) Impact Factor (2017-2018 = 2.878) (Anexo B).