



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

LUANE MACÊDO DE SOUSA

**PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT/ β -CATENINA NA INFLAMAÇÃO E NA
NOCICEPÇÃO DA ARTRITE CRÔNICA EXPERIMENTAL DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR**

Fortaleza

2021

LUANE MACÊDO DE SOUSA

**PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT/ β -CATENINA NA INFLAMAÇÃO E NA
NOCICEPÇÃO DA ARTRITE CRÔNICA EXPERIMENTAL DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção parcial do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais

Área de Concentração: Morfofisiologia Óssea e articular

Orientadora: Profa. Dra. Delane Viana Gondim

Fortaleza

2021

LUANE MACÊDO DE SOUSA

PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT/ β -CATENINA NA INFLAMAÇÃO E NA
NOCICEPÇÃO DA ARTRITE CRÔNICA EXPERIMENTAL DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfologia Óssea e Articular

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. George de Azevedo Lemos
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

A Deus.

A todos que não desistiram de fazer pesquisa científica nesses tempos tão difíceis.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser a minha fortaleza, meu refúgio e por sempre guiar os meus caminhos. À Nossa Senhora de Fátima, intercessora, mãe admirável, obrigada por cuidar e zelar pela minha saúde e dos meus nesta pandemia.

Ao meu marido, **Hudson**, meu grande amor e companheiro, que acompanhou e torceu de perto cada trajetória pessoal e profissional da minha vida, nesses últimos quinze anos. E ao meu filho-pet, **Sheik**, meu melhor amigo, que em todos os momentos esteve ao meu lado, fazendo companhia, e cuidando da minha mente nesses tempos de pandemia.

Aos meus pais, **Arthur e Elane**, meu porto seguro, que sempre renunciaram tanto pela educação dos seus filhos, e hoje comemoram a alegria em ter a primeira filha doutora. E aos meus irmãos, **Arlane, Darlano e Dayanne**, meus exemplos e torcedores fieis de cada conquista da minha vida.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Delane Viana Gondim**, agradeço por compartilhar seus conhecimentos comigo desde a graduação. Uma mulher e pesquisadora incrível, inteligente, humana e ética, que despertou em mim não só o amor pela Anatomia, mas pelo ensino e pela pesquisa científica. Obrigada por me ensinar muito sobre a vida, sobre superar os obstáculos e persistir mesmo quando o caminho segue tortuoso. Agradeço pelos seus conselhos e especialmente, por ter acreditado no meu potencial, quando nem eu mesma acreditava. Sou muito grata em tê-la como meu exemplo profissional e pessoal. Obrigada por tudo! Foi uma honra ser sua primeira mestra e doutora, querida mãe-científica!

Aos meus amigos e companheiros de pesquisa, o Delane's Team, pois nenhuma vitória é alcançada sozinha. Sem vocês, esse título não seria possível. Muito obrigada **Lorena Vieira, Joana Alves e Everton Cavalcante**.

À minha parceira, **Ana Carolina de Figueiredo Costa**, meu braço direito, minha gratidão por ter me ajudado tanto nesses anos de doutorado, por ter compartilhado as angústias de uma pesquisa, e ter torcido por cada resultado positivo.

Esse trabalho também é mérito seu!

Ao Laboratório de Farmacologia, da Inflamação e do Câncer (LAFICA), em especial a **Profa. Dra. Mariana Lima Vale**, por todo apoio nesta trajetória do doutorado, pelo acompanhamento das análises no Confocal, e pelos seus ensinamentos sobre neurofisiologia da dor.

À **Dra. Anamaria Falcão**, por toda sua ajuda nas imunofluorescências, e por ter compartilhado seus conhecimentos.

Ao Núcleo de Estudo em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI), em especial a **Josy**, pela sua disponibilidade e ajuda nas análises histopatológicas e imunohistoquímicas. À **Flávia**, pelo suporte durante as técnicas de coloração e de processamento das peças histológicas.

Ao laboratório de Patologia Oral, em especial ao técnico e amigo **Alceu Machado**, por ter se disponibilizado a ajudar no processamento das peças histológicas durante todo esse período de pandemia. Ao **Osias** e a **Farah**, pela ajuda nas análises de colágeno.

Ao Biotério Setorial do Porangabussu, por toda ajuda e ensinamento no manuseio animais. Obrigada **Wesley e Augusto**.

À **banca examinadora** da defesa da tese, pela contribuição para o engrandecimento deste trabalho.

Ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, minha segunda casa durante esses sete anos de pós-graduação, em especial aos técnicos e amigos, **Helson, Howard e Roberto**, e a todos os colegas e funcionários que fizeram parte do meu convívio diário. Meu muito obrigada!

Ao corpo docente e técnico-administrativo da **Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais**, Programa o qual tenho muito orgulho em fazer parte. Obrigada pelos ensinamentos e oportunidades.

À **Universidade Federal do Ceará**, obrigada por possibilitar a obtenção de mais um título acadêmico.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, progressiva e sistêmica, e estudos mostram que a articulação temporomandibular (ATM) está comumente envolvida. A via de sinalização canônica Wnt participa em muitas condições inflamatórias. Por outro lado, essa via também desempenha um papel essencial no desenvolvimento neuronal, estabelecimento e fortalecimento sináptico e na neuroplasticidade. O propósito desse estudo foi avaliar a participação da via de sinalização Wnt/ β -catenina na ATM e ao longo da via trigeminal em ratos artríticos. Para isso, ratos Wistar foram divididos em 2 grupos (n=6): Grupo AR e Salina. A indução da artrite foi realizada através de 3 injeções intra-articulares (i.a.; 10 μ l/art) semanais de albumina de soro bovino metilada (mBSA) na ATM esquerda. O grupo Salina recebeu solução salina na ATM esquerda (i.a.; 10 μ l/art). Foram avaliados: limiar nociceptivo, infiltrado inflamatório, birrefringência do colágeno tipo I e III, imunistoquímica para IL-1 β , TNF- α , IL-6, RANKL, NF κ B, Wnt-10b, β -catenina, DKK1, c-Myc e ciclina D1 da cartilagem articular e membrana sinovial, análise por imunofluorescência para c-Fos, Wnt-10b e β -catenina no gânglio trigeminal e no trato espinhal do trigêmeo. O grupo AR apresentou intenso infiltrado inflamatório e hiperplasia da membrana sinovial, destruição articular, proliferação de fibras colágenas tipo III, aumento da imunoexpressão das citocinas pró-inflamatórias e de Wnt-10b, β -catenina, RANKL, NF κ B e ciclina D1 na cartilagem articular e de c-Myc na membrana sinovial (p < 0,05). Foram observadas redução do limiar nociceptivo e aumento significativo da expressão de Wnt-10b e de β -catenina somente em gânglio trigeminal e de c-Fos periférica e centralmente em ratos artríticos (p<0,05). Concluímos que a via Wnt/ β -catenina participa dos danos estruturais na ATM e está envolvida na sensibilização dolorosa periférica em ratos artríticos.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide; Articulação Temporomandibular; Via de Sinalização Wnt; Inflamação; Dor; Marcadores do Trato Nervoso.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, progressive and a systemic inflammatory disease, and studies show that the temporomandibular joint (TMJ) is usually involved. The Wnt canonical signaling pathway participates in many inflammatory conditions. However, this pathway also plays an essential role in neuronal development, synaptic establishment and strengthening, and neuroplasticity. The purpose of this study was to evaluate the participation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the TMJ and along the trigeminal pathway in arthritic rats. For this, Wistar rats were divided into 2 groups (n=6): RA and Saline Groups. Arthritis induction was performed through 3 weekly intra-articular injections (i.a.; 10 μ l/joint) of methylated bovine serum albumin (mBSA) in the left TMJ. The Saline group received saline solution in the left TMJ (i.a.; 10 μ l/joint). It were evaluated: nociceptive threshold, inflammatory infiltrate, birefringence of collagen fibers, immunohistochemistry for IL-1 β , TNF- α , IL-6, RANKL, NF κ B, Wnt-10b, β -catenin, DKK1, c-Myc and cyclin D1 from articular cartilage and synovial membrane, immunofluorescence analysis for c-Fos, Wnt-10b and β -catenin in the trigeminal ganglion and trigeminal spinal tract. The RA group showed intense inflammatory infiltrate and synovial membrane hyperplasia, joint destruction, proliferation of type III collagen fibers, increased immunoexpression of pro-inflammatory cytokines and Wnt-10b, β -catenin, RANKL, NF κ B and cyclin D1 in articular cartilage and c-Myc in the synovial membrane ($p < 0.05$). It was observed a decrease in the nociceptive threshold and a high expression of Wnt-10b and β -catenin only in the trigeminal ganglion, and c-Fos expression were observed peripheral and central tissues in arthritic rats ($p < 0.05$). These results suggest that the Wnt/ β -catenin pathway participates in TMJ structural damage and is involved in peripheral painful sensitization in arthritic rats.

Keywords: Rheumatoid Arthritis; Temporomandibular Joint; Wnt Signaling Pathway; Inflammation; Pain; Neuronal Tract-Tracers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1	Anatomia e fisiopatologia da Articulação Temporomandibular (ATM).....	10
1.2	Artrite Reumatoide na ATM.....	11
1.3	Modelos experimentais de Artrite Reumatoide na ATM.....	11
1.4	Dor na Artrite Reumatoide.....	13
1.5	Via de sinalização Wnt/ β -catenina.....	14
1.6	Via canônica Wnt no Sistema Nervoso.....	15
1.7	Via Canônica Wnt na dor Neuropática.....	16
2	PROPOSIÇÃO	17
2.1	Objetivos.....	17
3	DESENVOLVIMENTO	19
3.1	Capítulo.....	19
4	ARTIGO	20
5	CONCLUSÃO	45
6	REFERÊNCIAS	46
7	ANEXO 1	50
8	ANEXO 2	51

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Anatomia e fisiopatologia da Articulação Temporomandibular (ATM)

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial biaxial, bicondilar e complexa, que desempenha papel crucial na realização dos movimentos mandibulares (DE MORAES et al., 2015). Essa articulação é única quando comparada com outras articulações sinoviais, apresentando diferenças na sua composição e no seu desenvolvimento (WADHWA; KAPILA, 2008).

Histologicamente, a ATM apresenta uma cartilagem articular composta por 4 camadas ou zonas distintas de fibrocartilagem, responsáveis pela dissipação das cargas mastigatórias, proliferação de condrócitos, expressão de colágeno tipo I e II, e proteoglicanos (WADHWA; KAPILA, 2008). Além disso, sua membrana sinovial, composta por duas camadas, uma íntima, denominada de camada de sinoviócitos, que é responsável pela produção, secreção e reabsorção de fluidos sinoviais, sendo importante para a manutenção da fisiologia articular, e outra denominada de subíntima, composta por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, adipócitos e algumas fibras elásticas (DIJKGRAAF et al., 1996; NOZAWA-INOQUE et al., 2003; DE MORAES et al., 2015).

Doenças degenerativas nas articulações sinoviais podem ocorrer quando há a perda de equilíbrio entre processos catabólicos e anabólicos envolvendo diferenciação, proliferação, síntese e degradação dos condrócitos (GE et al., 2017). Esse processo é caracterizado pelo aumento da decomposição dos componentes da matriz extracelular e é geralmente acompanhado por níveis aumentados de mediadores inflamatórios, como a interleucina (IL) -1, 6 e o fator de necrose tumoral (TNF) $-\alpha$ (LEMOS et al., 2016). A membrana sinovial é responsável por mediar fisiologicamente esse processo, estimulando uma proliferação celular, e gerando um tecido sinovial hipertrófico, denominado *pannus* (OKAMOTO et al., 2021). Com a progressão dessa inflamação sinovial, pode ocorrer degeneração do tecido conjuntivo e cartilaginoso, fibrose e perfuração do disco articular (OKAMOTO et al., 2021).

1.2. Artrite Reumatoide na ATM

A artrite reumatoide (AR) é um exemplo de doença inflamatória crônica, progressiva e sistêmica caracterizada por inflamação sinovial, produção de autoanticorpos e destruição da cartilagem e do tecido ósseo (CUNHA et al., 2012; SODHI et al., 2017). Estima-se que 19% a 85,7% dos pacientes com AR apresentem alterações na ATM, e 75% deles relatam envolvimento bilateral dessa articulação (RUPARELIA et al., 2014; AHMED et al., 2015; KROESE et al., 2020).

Em estágios iniciais da AR na ATM, pacientes apresentam dor à palpação, porém, as manifestações clínicas podem ter episódios de exacerbações e remissões que levam à perda de função (CAMPOS et al., 2021). Em estágios avançados, os sintomas podem incluir edema, movimentos mandibulares limitados, devido à restrição da translação condilar, dor de cabeça, trismo, estalos e espasmos musculares (KROESE et al., 2020; RUPARELIA et al., 2014).

Dependendo do grau de progressão da AR na ATM, o desgaste ósseo poderá causar alterações na dimensão vertical da mandíbula, resultando em mordida aberta anterior, deficiência da capacidade mastigatória e, nos casos mais graves, anquilose temporomandibular (CAMPOS et al., 2021).

Patologicamente, a progressão da AR causa inflamação nas estruturas sinoviais da ATM e é caracterizada pela hiperplasia sinovial (*pannus*), com presença de células inflamatórias que invadem e degradam a matriz cartilaginosa e óssea (SHIM et al., 2020). Anticorpos anti-CCP (ACPAs) e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, causam a destruição óssea local (LEMOS et al., 2016; DE SOUSA et al., 2019). Entretanto, a patogênese da progressão da AR na ATM ainda não é claramente compreendida.

1.3. Modelos experimentais de Artrite Reumatoide na ATM

A patogênese da AR tem sido amplamente investigada em modelos experimentais. Apesar das limitações inerentes de todos modelos de animais na AR, modelos em murinos progrediram significativamente para a compreensão de mecanismos fundamentais na patogênese da AR e contribuíram para avanços importantes no tratamento dessa doença autoimune (ASQUITH et al., 2009).

Estudos como mecanismos de dor e de inflamação, associado ao comprometimento das estruturas intra-articulares, são encontrados em modelos de artrite induzida por colágeno, artrite induzida por colágeno-anticorpo, artrite induzida por antígeno (adjuvante de soro bovino metilado - mBSA) e os modelos de artrite geneticamente manipulada (ASQUITH et al., 2009; WALSH; MCWILLIAMS, 2014; KUCHLER-BOPP et al., 2020).

Modelos de AR com injeções articulares de substâncias que estimulam inflamação, como Adjuvante Completo de Freund (CFA) e Carragenina, geram inflamação e hiperplasia nos tecidos articulares. Porém, degeneração da cartilagem e erosão óssea, características comuns da AR, não são relatados com frequência nesses modelos (BAS et al., 2016).

Na AR da ATM, o modelo de adjuvante de soro bovino metilado (mBSA) gera o desenvolvimento de uma artrite inflamatória quando a articulação é estimulada, primeiramente, por um antígeno (mBSA em Adjuvante Completo de Freund – CFA), e subsequentemente, desafiada por injeções intra-articulares do mesmo antígeno. Essa indução cria uma monoartrite que pode durar de semanas a meses, dependendo da retenção do antígeno na articulação (QUINTEIRO et al., 2014; DE SOUSA et al., 2019; COSTA et al., 2021).

Desse modo, o modelo por mBSA não estimula uma artrite sistêmica, pois não reproduz a violação da tolerância endógena, que é típica da patogênese da AR. Entretanto, é usado para a compreensão da inflamação mediada por imunocomplexos seguida por respostas mediadas por células T e dor na AR. (ASQUITH et al., 2009; QUINTEIRO et al., 2014; BAS et al., 2016; DE SOUSA et al., 2019).

Apesar de efetivas pesquisas para a compreensão dos mecanismos biológicos da patogênese da AR da ATM, há escassos trabalhos que mostram o papel dessa articulação nos campos da dor na Reumatologia em modelos de animais. Estudos sobre quais mecanismos subjacentes para o entendimento da dor na AR, assim como vias de sinalização responsáveis pela inflamação, degeneração tecidual e manutenção da dor, nessa condição patológica, se fazem necessários (BAS et al., 2016).

1.4. Dor na Artrite Reumatoide

A dor é definida pela International Association of Study in Pain (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial ao tecido”. Pacientes com AR tem como a dor o principal sintoma, sendo esta descrita como “aguda”, “latejante” e “dolorida” durante a fase inflamatória da doença. O prognóstico da dor na AR costuma ser ruim, mesmo a doença sendo controlada de maneira ideal (ZHANG; LEE., 2018; RAJA et al., 2020).

Pacientes com AR apresentam características de dor semelhantes a dor neuropática, relatando “queimação”, dor sob pressão, e ataques repentinos de dor comparados a choques elétricos. Esses sintomas semelhantes aos neuropáticos podem indicar mecanismos de dor comuns à AR e a dor neuropática, associados ao processamento anormal da dor central, que é evidenciado por redução dos limiares de dor em resposta à pressão e pelo aumento da atividade cerebral aos estímulos dolorosos. (WALSH; MCWILLIAMS, 2014).

Vários fatores que podem sensibilizar nociceptores periféricos foram identificados nos tecidos sinoviais de pacientes com AR, como citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF), fatores de crescimento (Fator de crescimento endotelial e do β), a quimiocina CCL2, modificando a função dos canais iônicos (TPV1) por meio de receptores específicos da superfície celular. As células microgliais recrutam outras células da microglia para propagar a neuroinflamação, que em última estância, ativa os astrócitos adjacentes, ampliando o limiar inflamatório e resultando em dor inflamatória crônica. (WALSH; MCWILLIAMS, 2014; HU et al., 2020).

O processamento da dor ocorre nos níveis espinhais e supraespinhais na AR, ativando regiões do tálamo, córtex sensorial e também áreas do sistema límbico (córtex cingulado e insular). Além dessas mudanças funcionais, pacientes com AR apresentaram aumento da substância cinzenta dos gânglios da base. No entanto, contribuições relativas de nocicepção, sensibilização periférica e central em pacientes artríticos, permanece incerta. (WALSH; MCWILLIAMS, 2014; ZHANG; LEE., 2018).

1.5. Via de sinalização Wnt/ β -catenina

A via de sinalização Wnt participa de muitas condições patológicas (IMAI et al., 2006; GATICA-ANDRADES et al., 2017; HUMPHRIES; MLODZIK, 2018), incluindo a AR (SEN, 2005; MIAO et al., 2013; SINGH et al., 2015). Essa via tem sido descrita na literatura por estar associada com mecanismos de proliferação, sobrevivência, migração e adesão celular, sendo essencial na homeostase tecidual (SEN, 2005; CORR, 2008). A via Wnt pode ser subdividida em vias dependentes de β -catenina (canônica) e independente de β -catenina (não canônica) (LIU et al., 2017).

A via canônica é a mais estudada e melhor compreendida até o momento. A ligação de Wnt aos seus receptores (Frizzled e LRP5/6) inibe a glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), libertando a β -catenina do complexo de degradação citoplasmática para β -catenina livre. O excesso de β -catenina é translocado para o núcleo e transcreve genes-alvo, como ciclina D1, c-Myc, metaloproteinase de matriz (MMP) -3 e CD44 (CORR, 2008; BARON; KNEISSEL, 2013).

Vários estudos associam uma sinalização aberrante de Wnt no desenvolvimento de doenças reumáticas (CORR, 2008; BARON; KNEISSEL, 2013; VAN DER BOSCH et al., 2017). A via canônica Wnt pode promover hiperplasia sinovial e inflamação, formação de *pannus* durante a progressão da doença (SEN, 2005; DE SOUSA et al., 2019). E esse processo destrutivo está relacionado à presença de autoanticorpos, polimorfismo genético, envolvendo proteínas na via Wnt/ β -catenina e marcadores de inflamação, de cartilagem e de metabolismo ósseo (VAN DER BOSCH et al., 2017). Uma sinalização excessiva da Wnt contribui para a degradação da cartilagem, e níveis aumentados de β -catenina foram encontrados em condrócitos articulares. Essa ativação da β -catenina em células cartilagosas maduras estimula a hipertrofia, a mineralização da matriz e a expressão da MMP-13 e do fator de crescimento endotelial vascular (CORR et al., 2008).

A sinalização de proteínas Wnt pode regular a resposta inflamatória periférica em distúrbios crônicos, incluindo a AR (SHI et al., 2012). Entretanto, além de efeitos inflamatórios locais, a Wnt desempenha um papel essencial no desenvolvimento neuronal, através de mecanismos que envolvem processos como neurogênese,

ramificação axonal e dendrítica, formação de sinapses e plasticidade (SHI et al., 2012).

1.6. Via Canônica Wnt no Sistema Nervoso

Componentes da via Wnt foram descritos nas principais subdivisões do córtex cerebral, bulbo olfatório, hipocampo, cerebelo e tálamo. A proteína β -catenina é responsável por controlar a expressão de proteínas estruturais sinápticas, sugerindo que a sinalização canônica Wnt pode regular a excitabilidade neuronal no tálamo (OLIVA et al., 2018; ZHAO; YANG, 2018).

A síntese e secreção das proteínas Wnt neuronais são controladas pela atividade sináptica. Nos neurônios do hipocampo, a ativação de N-metil D-Aspartato (NMDA) que é um aminoácido excitatório agonista do glutamato, causam translocação nuclear da β -catenina de regiões pós-sinápticas e ativação de genes de expressão. Nas sinapses, a β -catenina interage com a caderina para regular a montagem sináptica, remodelação e plasticidade. (ZHAO; YANG, 2018)

A expressão de ligantes e de receptores Wnt são encontrados na sinaptogênese e no desenvolvimento de dendritos no hipocampo. Na região do bulbo olfatório e do cerebelo, a presença dessas proteínas são detectadas nas células pós-sinápticas e em outras células-alvos, enquanto que os receptores Frizzled e inibidores endógenos foram encontrados em células pré-sinápticas (SHI et al., 2012; OLIVA et al., 2018).

Durante o desenvolvimento da dor crônica, neurônios espinhais no corno dorsal da medula espinhal tornam-se sensibilizados e hiperativos (sensibilização central). Essa neuroinflamação está presente em modelos animais de dor crônica, estando associados com aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL- 1β e TNF- α (SHI et al., 2012).

1.7. Via Canônica Wnt na dor Neuropática

A via Wnt/ β -catenina tem sido descrita por estar relacionada com patogênese de vários tipos de dor, como a dor induzida por lesão de nervo periférico, dor crônica associada a esclerose múltipla, dor crônica associada ao HIV, dor de câncer ósseo e neuropatia periférica diabética (HU et al., 2020).

A ativação da via de sinalização Wnt pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , exacerbando a dor neuropática. Além disso, uma proteína-alvo da via canônica Wnt, a ciclooxigenase-2 (COX-2), pode alterar função celular regulando a expressão de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). (WANG et al., 2020)

A proteína Wnt3a foi encontrada expressa na via nociceptiva neural em modelos de dor de câncer ósseo e de ligadura do nervo ciático (ZHANG et al., 2013). Já a Wnt5a e a β -catenina (proteína-chave da via de sinalização canônica), foram expressos positivamente na região de corno dorsal da medula espinhal em modelo de ligadura de nervo espinhal (SHI et al., 2012; HUANG et al., 2020). A Foxy5, um ativador de Wnt5a, Foxy5, estimulou o aumento da hiperalgesia mecânica em modelo de injúria de constrição crônica. Já o seu inibidor, Box5, foi responsável por atenuar a hiperalgesia (YUAN et al., 2012; WANG et al., 2015).

Um trabalho de WANG et al (2020) mostrou que a crocina, um flavonoide tradicional da medicina chinesa, foi capaz de aliviar a dor neuropática em ratos com artrite induzida por antígeno pela inibição da expressão de moléculas relacionadas à dor através da via Wnt5a/ β -catenina.

A dor e inflamação na AR da ATM ativam a via trigeminal (BONFANTE et al., 2018), e a via de sinalização Wnt/ β -catenina pode estar expressa nos tecidos periféricos e centrais. Sabemos que a dor neuropática e a dor na AR possuem mecanismos semelhantes, e até onde é de nosso conhecimento, não há estudos que mostrem a associação da nocicepção periférica e central trigeminal com a via de sinalização Wnt/ β -catenina. O entendimento dessa relação é importante para adoção de novas terapêuticas no tratamento da dor e inflamação na AR.

2. PROPOSIÇÃO

2.1. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram separados de acordo com as proposições de cada artigo.

ARTIGO 1

Objetivo Geral:

- Investigar a participação das vias de sinalização Wnt/ β -catenina e NF- κ B em um modelo experimental de artrite crônica induzida por albumina sérica bovina metilada (mBSA) na articulação temporomandibular (ATM) de rato.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a hipernocicepção através do método de Von frey eletrônico na ATM dos animais com AR crônica;
- Verificar as alterações histopatológicas na membrana sinovial da ATM de ratos no modelo de AR crônica experimental através da coloração em hematoxilina e eosina (HE);
- Avaliar qualitativamente as alterações inflamatórias da ATM na membrana sinovial;
- Avaliar imunexpressão de TNF- α e IL-1 β na membrana sinovial da ATM de ratos com AR experimental;
- Realizar análise imunoistoquímica para Wnt-10b, β -catenina, DKK-1, NF- κ B e RANK-L na membrana sinovial.

ARTIGO 2

Objetivo Geral:

- Investigar a participação da via Wnt/ β -catenina na inflamação e na nocicepção da artrite crônica experimental da articulação temporomandibular.

Objetivos específicos:

- Avaliar a hipernocicepção através do método de Von frey eletrônico na ATM dos animais com AR crônica;
- Verificar as alterações histopatológicas da ATM de ratos no modelo de AR crônica experimental através da coloração em hematoxilina e eosina (HE) e azul de toluidina;
- Avaliar qualitativamente as alterações inflamatórias da ATM na cartilagem articular;
- Realizar a quantificação da disposição de fibras colágenas através da coloração de picrossirius red;
- Avaliar a migração de células na cavidade articular através da contagem total de leucócitos;
- Avaliar imunexpressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 Wnt-10b, β -catenina, Ciclina-D1 na cartilagem articular da ATM de ratos artríticos;
- Realizar análise imunistoquímica para C-myc na membrana sinovial da ATM;
- Realizar imunofluorescência para c-Fos, Wnt-10b e β -catenina no gânglio trigeminal e subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Capítulo

Essa tese possui aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo de aprovação número 4747280219 (ANEXO 1).

O modelo dessa tese foi baseado no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, onde regulamenta o formato de modelo em artigo científico na língua portuguesa para apresentação. Os resultados dessa pesquisa foram apresentados em forma de dois artigos científicos, em que o primeiro já foi publicado em revista indexada (ANEXO 2). O segundo artigo está redigido de acordo com as normas da revista escolhida para publicação.

ARTIGO 1: Immunoexpression of canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats

PERIÓDICO: Inflammation Research

FATOR DE IMPACTO: 4.575 (2020)

ARTIGO 2: Participação Da Via Wnt/ β -Catenina na inflamação e na nocicepção da artrite crônica experimental da articulação temporomandibular

PERIÓDICO: Journal of Dental Research

FATOR DE IMPACTO: 6.116 (2020)

4. ARTIGO

FOLHA DE ROSTO

Participação da Via Wnt/ β -Catenina na inflamação e nocicepção da artrite crônica experimental da articulação temporomandibular

Luane Macêdo de Sousa¹; Ana Carolina de Figueiredo Costa²; Anamaria Falcão Pereira³; Conceição da Silva Martins¹; Osias Vieira de Oliveira Filho²; Ana Paula Negreiros Nunes Alves²; Mariana Lima Vale^{1,3}; Delane Viana Gondim^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 60430-170, Fortaleza, CE, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, 60430-160, Fortaleza, CE, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 60430-275, Fortaleza, CE, Brasil.

*Autor correspondente:

Delane Viana Gondim. Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – Rua Delmiro de Farias, s/n, Rodolfo Teófilo, CEP: 60430-170, Fortaleza, CE, Brasil. Telefone: +55 85 33668471. E-mail: delanegondim@yahoo.com.br

Declaração de conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, progressiva e sistêmica, e estudos mostram que a articulação temporomandibular (ATM) está comumente envolvida. A via de sinalização canônica Wnt participa em muitas condições inflamatórias, e também desempenha um papel essencial no desenvolvimento neuronal, estabelecimento e fortalecimento sináptico e na neuroplasticidade. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a participação da via de sinalização Wnt/ β -catenina na articulação temporomandibular (ATM) e ao longo da via trigeminal em ratos artríticos. Ratos Wistar foram divididos em 2 grupos (n=6): Grupo AR e Salina. A indução da artrite foi realizada através de 3 injeções intra-articulares (i.a.; 10 μ l/art) semanais de albumina de soro bovino metilada (mBSA) na ATM esquerda. O grupo Salina recebeu solução salina na ATM esquerda (i.a.; 10 μ l/art). Foram avaliados: limiar nociceptivo, infiltrado inflamatório, birrefringência do colágeno tipo I e III, imunistoquímica para IL-1 β , TNF- α , IL-6, Wnt-10b, β -catenina, e ciclina-D1 na cartilagem articular e c-Myc na membrana sinovial e análise por imunofluorescência para c-Fos, Wnt-10b e β -catenina no gânglio trigeminal e no trato espinhal do trigêmeo. O grupo AR apresentou intensa destruição articular, com proliferação de fibras colágenas tipo III, aumento da imunexpressão das citocinas pró-inflamatórias e de Wnt-10b, β -catenina e ciclina-D1 na cartilagem articular e de c-Myc na membrana sinovial. Foram observadas redução do limiar nociceptivo e aumento significativo da expressão de Wnt-10b e de β -catenina somente em gânglio trigeminal e de c-Fos periférica e centralmente em ratos artríticos. Concluímos que a via Wnt/ β -catenina participa dos danos estruturais na cartilagem articular da ATM e está envolvida na sensibilização dolorosa periférica em ratos artríticos.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide; Articulação Temporomandibular; Via de Sinalização Wnt; Inflamação; Dor; Marcadores do Trato Nervoso.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, progressiva e sistêmica caracterizada por inflamação sinovial, produção de autoanticorpos e destruição da cartilagem e do tecido ósseo (Cunha et al. 2012; Sodhi et al. 2015). Estima-se que de 19% a 85,7% dos pacientes com AR apresentem alterações na ATM, e os sintomas podem incluir dores articulares, edema, movimentos mandibulares limitados e, até mesmo, anquilose (Ruparelia et al. 2014; Ahmed et al. 2015; Kroese et al. 2020).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina participa de muitas condições patológicas, incluindo a AR (Miao et al. 2013; Singh et al. 2015; Gatica-Andrades et al. 2017; Humphries and Mlodzik, 2018). Vários estudos associam uma sinalização aberrante de Wnt no desenvolvimento de doenças reumáticas (Corr, 2008; Baron and Kneissel, 2013; Van der Bosch et al. 2017). A via canônica é a mais estudada e melhor compreendida até o momento. A ligação de Wnt aos seus receptores (Frizzled e LRP5/6) inibe a glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), libertando a β -catenina do complexo de degradação do citoplasmático para β -catenina livre. O excesso de β -catenina transloca-se para o núcleo e transcreve genes-alvo, como ciclina D1, c-MYC, metaloproteinase de matriz (MMP) -3 e CD44 (Corr, 2008; Baron and Kneissel, 2013).

A via canônica Wnt pode promover hiperplasia sinovial e inflamação, formação de *pannus* durante a progressão da doença (Sen, 2005). Uma sinalização excessiva da Wnt contribui para a degradação da cartilagem, e níveis aumentados de β -catenina foram encontrados em condrócitos articulares, causando a hipertrofia, a mineralização da matriz e a expressão da MMP-13 e do fator de crescimento endotelial vascular (Corr et al. 2008).

Além de efeitos inflamatórios locais, a Wnt desempenha um papel essencial no desenvolvimento neuronal, através de mecanismos que envolvem processos como neurogênese, ramificação axonal e dendrítica, formação de sinapses e plasticidade (Shi et al. 2012).

Componentes da via Wnt foram descritos nas principais subdivisões do córtex cerebral, bulbo olfatório, hipocampo, cerebelo e tálamo (Oliva et al. 2018; Zhao and

Yang, 2018). Durante o desenvolvimento da dor crônica, neurônios espinhais no corno dorsal da medula espinhal tornam-se sensibilizados e hiperativos (sensibilização central). Essa neuroinflamação está presente em modelos animais de dor crônica, estando associados com citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α (Shi et al. 2012). (Wang et al. 2020).

O trabalho de Wang et al. (2020) mostrou que a crocina, um flavonoide tradicional da medicina chinesa, foi capaz de aliviar a dor neuropática em ratos com artrite induzida por antígeno pela inibição da expressão de moléculas relacionadas à dor através da via Wnt5a/b-catenina.

A dor neuropática e a dor na AR possuem mecanismos semelhantes (Bas et al. 2016; Walsh and McWilliams, 2014). Pacientes com AR relatam “queimação”, dor sob pressão, e ataques repentinos de dor comparados a choques elétricos. Esses sintomas, associados ao processamento anormal da dor central, que é evidenciado por redução dos limiares de dor em resposta à pressão e pelo aumento da atividade cerebral aos estímulos dolorosos, reforçam que a dor na AR está relacionada a condição neuropática. (Walsh and McWilliams, 2014).

A dor e inflamação na AR da ATM é conduzida através da via trigeminal, e um estudo prévio de nosso grupo mostrou que a via de sinalização Wnt/ β -catenina está aumentada na ATM de animais artríticos (De Sousa et al. 2019), entretanto não há trabalhos que mostrem a associação da nocicepção periférica e central da via trigeminal com a via de sinalização Wnt/ β -catenina. O entendimento dessa relação é essencial para a compreensão fisiopatológica da AR, bem como, para fomentar adoção de novas terapêuticas para a dor. Dessa forma, esse artigo investigou o envolvimento da via de sinalização Wnt/ β -Catenina na destruição articular e na nocicepção da artrite crônica experimental da ATM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os experimentos foram realizados em doze ratos Wistar machos, com peso oscilando entre 180 - 220g, provenientes do Biotério Setorial do Campus Porangabussu - Prof. Eduardo Torres, da Faculdade de Medicina da Universidade

Federal do Ceará – UFC, e foram mantidos em gaiolas de polipropileno, recebendo água e comida *ad libitum*, em sala climatizada, com exaustão de gases e redução de ruídos. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) sob protocolo de número 4747280219, e seguiram as diretrizes do ARRIVE Guidelines UK.

Indução da artrite experimental e grupos experimentais

Os animais foram sensibilizados com 500 µg de mBSA em 200 µL de uma emulsão contendo 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 100 µL de CFA foi administrado por injeção subcutânea no dorso. As injeções de reforço de mBSA dissolvido em IFA foram administradas 7 e 14 dias após a primeira imunização, em diferentes locais no dorso do animal. Vinte e um dias após a injeção inicial, os animais foram anestesiados com quetamina 2% (100 mg/Kg) e xilazina 10% (10 mg/Kg), por via intraperitoneal, e a artrite na ATM esquerda foi induzida nos animais imunizados por injeção intra-articular de mBSA (10 µg/articulação) dissolvido em 10 µl de PBS. Injeções de reforço na ATM foram dadas nos dias 28 e 35. Os animais foram eutanasiados 24 horas após a terceira indução. (De Sousa et al. 2019). Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Salina - constituído por seis animais que recebeu solução salina 0,9% na ATM esquerda (10 µl/articulação), nos dias 21, 28 e 35 (após a primeira sensibilização subcutânea com CFA), e eutanasiado 24 horas após a terceira injeção de mBSA na ATM; Grupo AR - constituído por seis animais submetidos à indução da AR por mBSA na ATM esquerda (10 µg/articulação), nos dias 21, 28 e 35 (após a primeira sensibilização subcutânea com CFA), e eutanasiado 24 horas após a terceira injeção de mBSA na ATM.

Avaliação da hipernocicepção

O limiar de nocicepção do animal foi obtido através do registro da intensidade de força aplicada na região da ATM, necessário para obtenção de uma resposta reflexa (movimento de retirada da cabeça). Para isso, o aparelho Von Frey eletrônico (Analgesímetro Digital, Insight, São Paulo, Brasil), que é um transdutor de força que mede o limiar de nocicepção em gramas (g), foi aplicado perpendicularmente na região avaliada. Os animais foram submetidos a sessões de condicionamento ao teste de hipernocicepção mecânica durante os 5 dias que antecederam a realização do

experimento. Os animais foram mantidos durante 20 minutos em caixas plásticas e submetidos a aplicação do aparelho Von Frey na região da ATM esquerda. Um observador foi treinado para a aplicação gradual de pressão na região da ATM do animal, e o aparelho foi automaticamente removido e o registro da pressão em gramas obtido assim que o animal realizou o movimento de retirada da cabeça. É importante ressaltar que o observador não teve conhecimento do tipo de tratamento que os animais receberam. No sexto dia, antes da avaliação da hipernocicepção, os animais foram tricotomizados na região ao redor da ATM esquerda e mantidos em repouso durante 20 minutos em caixas plásticas (De Sousa et al. 2019). Os testes foram realizados nos dias 0, 1, 7 e 14 após a indução subcutânea de mBSA e Adjuvante de Freund, e nos dias 20, 21, 28 e 35 após cada injeção intra-articular de mBSA ou Salina.

Análise Histopatológica

Os ratos foram eutanasiados, e ATM e tecidos periarticulares foram fixados em solução de formol tamponado a 10% durante 24h e desmineralizados em solução de EDTA a 10%. Secções de 4 µm, que incluíam o cõndilo, cartilagem articular, disco articular, membrana sinovial e tecido periarticular foram examinados através da microscopia de luz (microscópio Leica). Os espécimes foram corados por hematoxilina-eosina (HE) ou azul de toluidina. Foi feita uma descrição qualitativa da cartilagem articular e avaliada a intensidade de metacromasia por um patologista experiente. As áreas da cartilagem articular com maior intensidade de coloração violeta indicam uma maior concentração de proteoglicanos (Costa et al. 2021; Lemos et al. 2016).

Análise da birrefringência de colágeno

As ATMs foram incubadas em picrosirius red (ScyTek[®]) por 30 minutos, e lavadas em banhos de ácido clorídrico a 5%, contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas com Enhtellan[®]. A análise das lâminas foi através de um microscópio de luz polarizada (Leica - DM 2000), onde o colágeno tipo I (maduro) apresenta coloração vermelho-alaranjada, e o colágeno tipo III (imaturo), coloração branco-esverdeada. Para quantificação do colágeno tipo I e III, cinco campos em um aumento de 400x foram fotografados através de uma câmera acoplada ao Microscópio Leica DM 2000.

As fotomicrografias foram avaliadas pelo *software* de análise de imagem Image J (RSB). (Ferreira et al. 2020)

Imunoistoquímica para TNF- α , IL-1 β , IL-6, Wnt-10b, β -catenina, c-Myc e Ciclina D1

Imunoistoquímica para TNF- α , IL-1 β , IL-6, Wnt-10b, β -catenina, c-Myc e Ciclina D1 foi realizada pelo método de streptavidina-biotina-peroxidase em cortes de parafina. O tecido extraído e parafinado foi cortado em secções de 4 μ m de espessura e montados em lâminas para microscopia revestidas em poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinizados, e após recuperação antigênica, com tampão de citrato a 95° C, a peroxidase endógena foi bloqueada com 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio por trinta minutos.

As secções foram incubadas com TNF- α (diluição 1:100 Abcam; Cambridge, Reino Unido), IL-1 β (diluição 1:100 Abcam; Cambridge, Reino Unido), IL-6 (1:100 Santacruz Biotechnology; Califórnia, Estados Unidos), Wnt-10b (diluição 1: 400; Abcam; Cambridge, Reino Unido), β -Catenina (diluição 1:200; DAKO; Califórnia, EUA), c-Myc (diluição 1: 200; Abcam; Cambridge, Reino Unido); Ciclina D1 (diluição 1: 200; Abcam; Cambridge, Reino Unido); diluídos em anticorpo DAKO diluente overnight. As secções foram então incubadas por 30 min com polímero (Invision Flex HRP, DAKO). Em relação a IL-6, a mesma foi incubada com complexo ABC (30 minutos), um conjugado de avidina-peroxidase (Strep ABC complex, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os locais de ligação dos anticorpos foram visualizados pela incubação com solução de diaminobenzidina-H₂O₂ (DAB, DAKO; Califórnia, EUA). Seções incubadas com anticorpo diluente, sem o anticorpo primário incluído, foram consideradas controles negativos. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina, desidratadas em séries graduadas de álcoois, clareadas em xileno e cobertas com lamínulas. A marcação positiva para estes anticorpos foi determinada por coloração marrom no nível do citoplasma na membrana sinovial. As células imunocoradas foram contadas em cinco campos selecionados aleatoriamente (400X) sob um microscópio (Leica DM 2000, Wetzlar, Alemanha). (De Sousa et al. 2019; Costa et al. 2021)

Análise por imunofluorescência para c-Fos, Wnt-10b e β -Catenina

O gânglio trigeminal e o subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo foram removidos, colocados em PFA 4% por 2 horas e crioprotetidos em solução de sacarose 30% durante 48h. Após esse período, os tecidos foram embebidos em Tissue-tek e armazenados a -80°C . Secções seriadas (10 μm) dos tecidos nervosos foram obtidas através do criostato. Para os ensaios de imunofluorescência, as secções foram fixadas em metanol e recuperação antigênica realizada em 0.1 M (pH 6.0) de tampão citrato. Em seguida, permeabilização da membrana nuclear foi realizada, somente nas reações para marcação nuclear, com 0.1% triton X-100. Sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% albumina de soro bovina e glicina 0.3 M em todas as lâminas. As amostras foram incubadas “*overnight*” com anticorpo primário de anti- cFos (1:200, Cell Signaling Technology, Denvers, MA, EUA) anti-Wnt-10b (1:300; Abcam; Cambridge, Reino Unido) e anti- β -Catenina (1:300; Abcam; Cambridge, Reino Unido). Logo após, foi realizada incubação com anticorpo de coelho anti-IgG associado ao Alexa fluor 568. Para marcação dos corpos celulares neuronais, as amostras foram incubadas com anticorpo para NeuN conjugado com Alexa fluor 488. O DAPI será acrescentado ao final para evidenciar os núcleos celulares. Para análises com a β -catenina, as amostras foram incubadas também com a glutamina sintetase, para evidenciar as células satélites. Os controles negativos de imunomarcação foram realizados através da omissão dos anticorpos primários. Por último, os slides foram montados e fotografados através de microscopia confocal. A quantificação da área fluorescente nas fotomicrografias foi realizada pela diferenciação dos pixels fluorescentes pela saturação de cor mais alta associada à fluorescência (vermelha ou verde) com o software de análise de imagem. Os limites superiores e inferiores requeridos para definição de pixels selecionados e não-selecionados foram previamente definidos pelo limite de cor. Os resultados de quantificação foram apresentados em porcentagem, calculada pela fluorescência positiva em relação à fluorescência de NeuN, e para a β -catenina em relação à fluorescência de Glutamina Sintetase (Pontes et al. 2019).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos pela média \pm EPM das medidas registradas a partir de 6 animais por grupo. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados

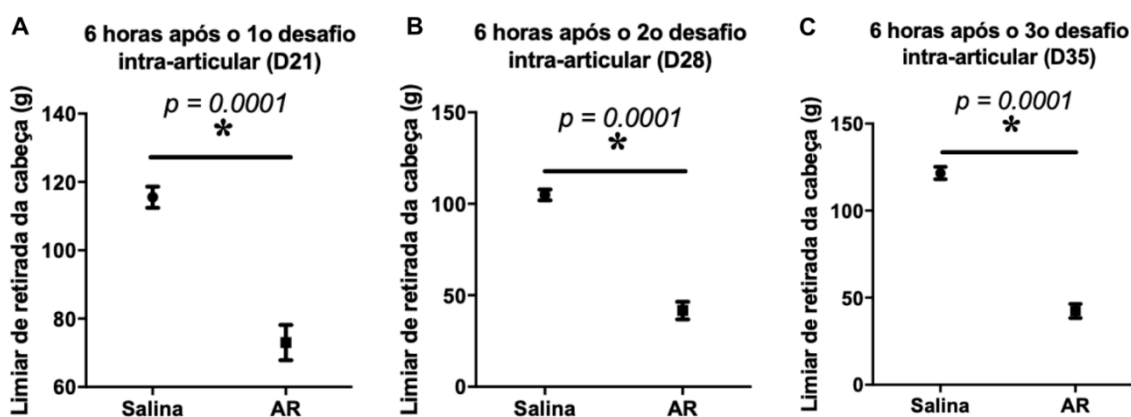
de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal. Os dados foram analisados através do teste de T de Student, para comparação entre dois grupos: AR e Salina. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism software, La Jolla, CA, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Análise da hiperalgesia mecânica da artrite induzida por mBSA

A avaliação da hiperalgesia mecânica na ATM esquerda foi realizada no dia 0 (imediatamente antes da injeção subcutânea de mBSA e CFA) e nos dias 1, 7 e 14, seis horas após as induções subcutâneas. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$), sugerindo que a administração subcutânea de mBSA não induz alteração no limiar nociceptivo na ATM.

Seis horas após a primeira injeção intra-articular (21º dia), um novo registro foi realizado, e observamos redução significativa da hiperalgesia mecânica ($p = 0,0001$). Nos dias 28 e 35, 6 horas após a segunda e a terceira injeção intra-articular de mBSA na ATM, respectivamente, o limiar nociceptivo permaneceu baixo, sendo



estatisticamente significativo em relação ao grupo Salina ($p = 0,0001$) (figura 1).

Figura 1: Avaliação do limiar nociceptivo da AR induzida por mBSA na ATM de ratos após as injeções intra-articulares A) Avaliação da hiperalgesia mecânica na ATM esquerda através do limiar de retirada da cabeça seis horas após o 1º desafio intra-articular nos grupos Salina e AR. B) Avaliação da hiperalgesia mecânica na ATM esquerda através do limiar de retirada da cabeça seis horas após o 2º desafio intra-articular nos grupos Salina e AR. C) Avaliação da hiperalgesia mecânica na ATM esquerda

através do limiar de retirada da cabeça seis horas após o 3º desafio intra-articular nos grupos Salina e AR ($p=0,0001$; Teste T de Student).

Análise histopatológica da ATM

Na análise histopatológica da ATM, não foi observado alterações na cartilagem articular dos animais do grupo Salina (Figura 2A). No grupo AR, entretanto, foi visualizado extensa destruição das camadas da cartilagem articular, presença de infiltrado inflamatório predominante mononuclear, com invasão do *pannus* no espaço infradiscal (Figura 2B). Já na camada de recobrimento ósseo, a do grupo Salina manteve-se íntegra (Figura 2C), enquanto que a do grupo AR, apresentou-se com áreas de destruição, contendo locais de contato de osteoclastos com a matriz óssea, formando depressões chamadas de lacunas de Howship (Figura 2D).

Através da coloração da ATM por azul de toluidina, observamos que o grupo Salina apresentou uma maior metacromasia na cartilagem articular, sugerindo alta concentração de proteoglicanos em sua matriz extracelular (Figura 2E). Já o grupo AR, exibiu uma intensa redução da metacromasia, assim como uma desorganização das camadas da cartilagem articular, sugerindo destruição articular e, conseqüentemente, menor concentração de proteoglicanos (Figura 2F).

Análise de birrefringência de colágeno na ATM

Qualitativamente, foi observado que o grupo Salina exibiu intenso brilho vermelho-alaranjado, indicando um maior grau de compactação e organização de fibras colágenas tipo I, em relação ao grupo AR (Figura 2G, 2I). Nos animais artríticos, podemos observar uma redução significativa das fibras vermelhas-alaranjadas (colágeno tipo I), além de uma maior desorganização da rede de fibras colágenas. Além disso, observamos uma maior intensidade da coloração branco-esverdeada (colágeno tipo III), sugerindo presença de colágeno imaturo (Figura 2H, 2J)..

Na análise quantitativa do colágeno na ATM, os fragmentos teciduais revelaram uma região preenchida por colágeno nos grupos AR e Salina, representando $77,00\pm 3,530\%$ (média \pm EPM) e $69,86\pm 5,130\%$ (média \pm EPM), respectivamente ($p=0,2849$) (Figura 2K).

Houve uma maior porcentagem de área preenchida por colágeno tipo I (maduro) (área vermelha-alaranjada) [40,06±2,405% (média±EPM)] nos animais Salina, em comparação ao grupo AR [13,24±2,905% (média±EPM)], sendo estatisticamente significativo ($p=0,0001$) (Figura 2L).

Entretanto, o percentual de colágeno tipo III (imaturo) (área marcada em branco-esverdeada) mostrou-se significativamente superior no grupo AR [47,32,±3,858% (média±EPM)] em relação ao grupo Salina [22,88±2,982% (média±EPM)] ($p=0,0010$) (Figuras 2M). Esses resultados quantitativos corroboram com os achados qualitativos.

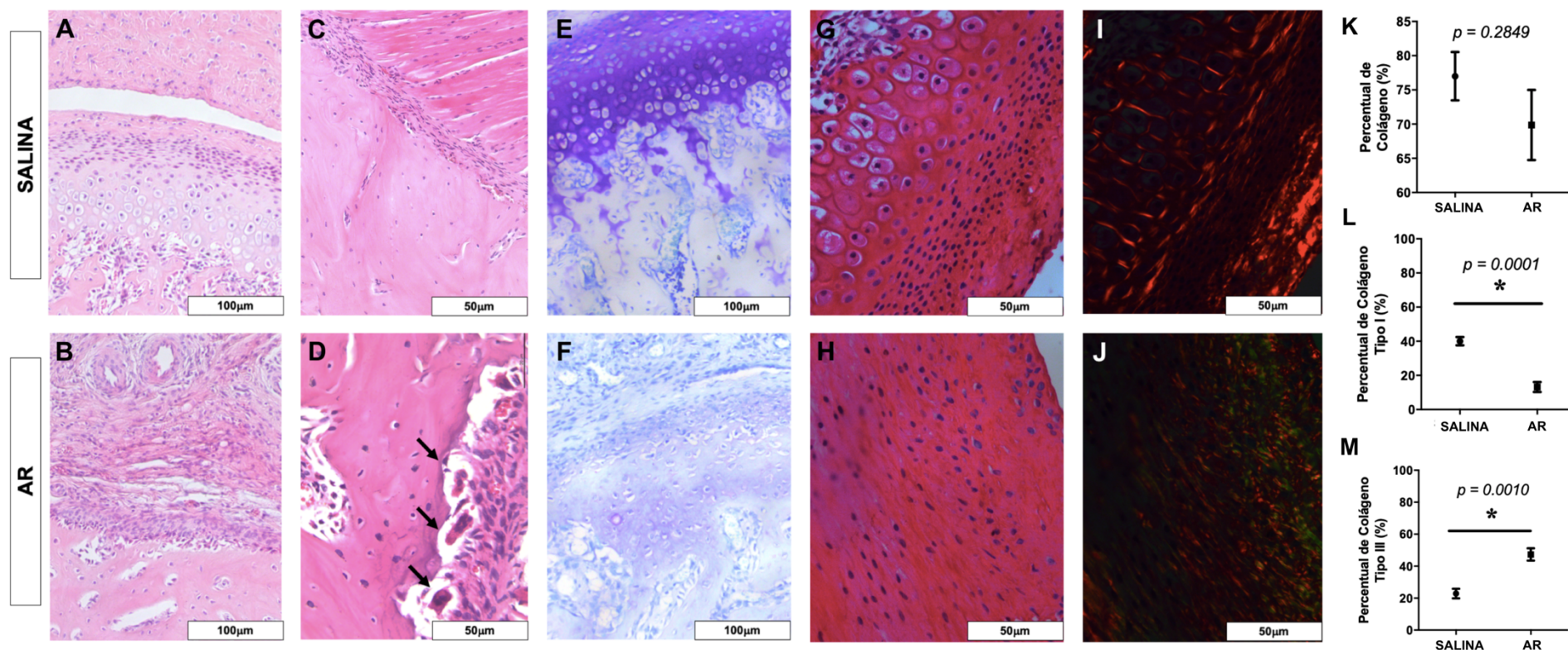


Figura 2: Fotomicrografias da ATM dos grupos Salina e AR e gráficos de percentual de colágeno. A) ATM do grupo Salina sem alterações. B) ATM grupo AR, mostrando destruição das camadas da cartilagem articular. C) Camada de recobrimento ósseo íntegra do grupo Salina. D) Camada de recobrimento ósseo com reabsorção e presença de osteoclastos do grupo AR. E) Cartilagem articular do grupo Salina coradas com Azul de Toluidina, apresentando intensa metacromasia. F) Cartilagem articular do grupo AR, apresentando destruição e menor metacromasia. G) Imagem da ATM do grupo Salina corada com Picrosirius Red. H) Imagem da ATM do grupo AR corada com Picrosirius Red. I) Imagem da ATM do grupo Salina corada por Picrosirius na Luz Polarizada, apresentando intensa coloração vermelha-alaranjada. J) Imagem da ATM do grupo AR corada por Picrosirius na Luz Polarizada, apresentando menor intensidade da coloração vermelha-alaranjada e presença de maior quantidade das fibras brancas-esverdeadas. K) Gráfico do percentual total de colágeno dos grupos Salina e AR. L) Gráfico do percentual de colágeno tipo I dos grupos Salina e AR. M) Gráfico do percentual de colágeno tipo III dos grupos Salina e AR. Aumentos de 200x e 400x. → indica presença de osteoclastos ativados na reabsorção da camada de recobrimento ósseo.

Avaliação da Imunoistoquímica para IL-1 β , TNF- α , IL-6, Wnt-10b, β -Catenina, Ciclina D1 na cartilagem articular e c-Myc na membrana sinovial

A análise imunoistoquímica para TNF- α , IL-1 β e IL-6, Wnt-10b, β -Catenina e Ciclina D1 mostrou um aumento da imunoexpressão dessas citocinas, que foi caracterizado pela marcação de células com coloração acastanhada no citoplasma das células da cartilagem articular de ratos submetidos à AR por mBSA, comparado com o grupo Salina. Já para c-Myc, a mesma marcação de células foi utilizada para quantificar células da membrana sinovial da ATM. Não foi evidenciado imunomarcação para nenhum dos anticorpos testados nas lâminas utilizadas como controle negativo, onde o anticorpo primário foi substituído por anticorpo diluente (Dako).

A imunomarcação para IL-1 β , TNF- α e IL-6 na cartilagem articular foi observado um aumento significativo da imunoexpressão dessas citocinas no grupo AR, quando comparado ao grupo Salina ($p=0.001$) (Figura 3).

Em relação a imunomarcação das proteínas associadas a via canônica Wnt, foi observado aumento significativo de Wnt-10b ($p=0.0002$), de β -Catenina ($p=0.0001$) e de Ciclina D1 ($p=0.0004$) na cartilagem articular dos animais com AR crônica na ATM, sendo estatisticamente significativo quando comparado ao grupo Salina (Figura 3).

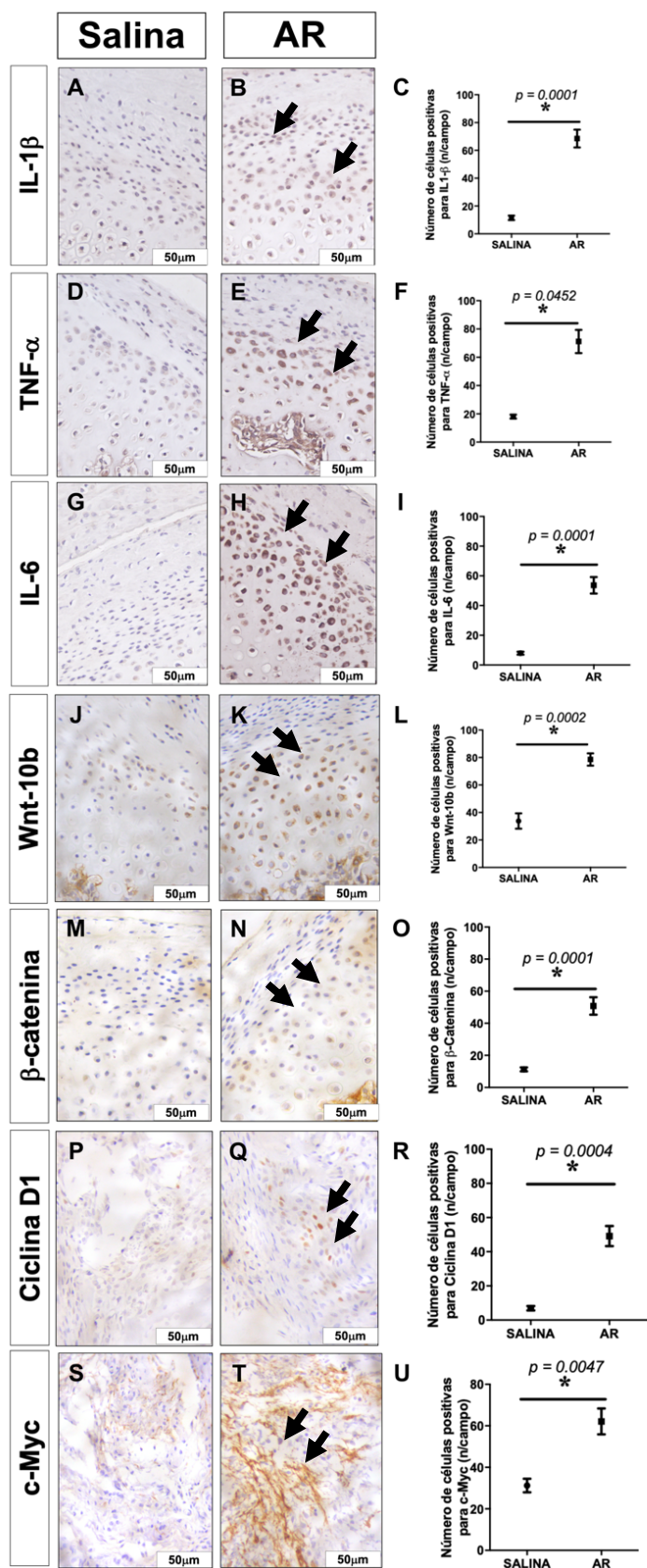


Figura 3: Fotomicrografias da imunoistoquímica para IL-1 β , TNF- α , IL-6, Wnt-10b, β -Catenina, Ciclina D1 na cartilagem articular e c-Myc na membrana sinovial. Imunoexpressão de IL-1 β nos grupos Salina e AR (A, B, C). Imunoexpressão de TNF- α nos grupos Salina e AR (D, E, F). Imunoexpressão de IL-6 nos grupos Salina e AR (G, H, I). Imunoexpressão de Wnt-10b nos grupos Salina e AR (J, K, L). Imunoexpressão de β -Catenina nos grupos Salina e AR (M, N, O). Imunoexpressão de Ciclina D1 nos grupos Salina e AR (P, Q, R). Imunoexpressão de c-Myc nos grupos Salina e AR na membrana sinovial

(S, T, U). Aumento de 400x. Os valores são apresentados como média. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem da área imunomarcada positivamente da expressão de IL-1 β , TNF- α , IL-6, Wnt-10b, β -Catenina, Ciclina D1 na cartilagem articular e c-Myc na membrana sinovial no grupo AR versus o grupo Salina ($p < 0.05$) (Teste T de Student). \rightarrow Indica área de células imunomarcadas.

Foi observado, também, um aumento da imunomarcagem de c-Myc na membrana sinovial do grupo AR, sendo estatisticamente significativo ($p = 0.0047$) (Figura 3). Não foi observada marcação dessa proteína na cartilagem articular da ATM.

Imunofluorescência para c-FOS, Wnt-10b e β -Catenina no gânglio trigeminal e trato espinhal do trigêmeo

Na imunofluorescência para o marcador de ativação neuronal c-FOS, foi observado que o grupo AR teve maior expressão tanto no gânglio trigeminal ($p = 0.0001$), como no trato espinhal do trigêmeo ($p = 0.0005$), sendo estatisticamente significativo comparado ao grupo Salina. (Figura 4)

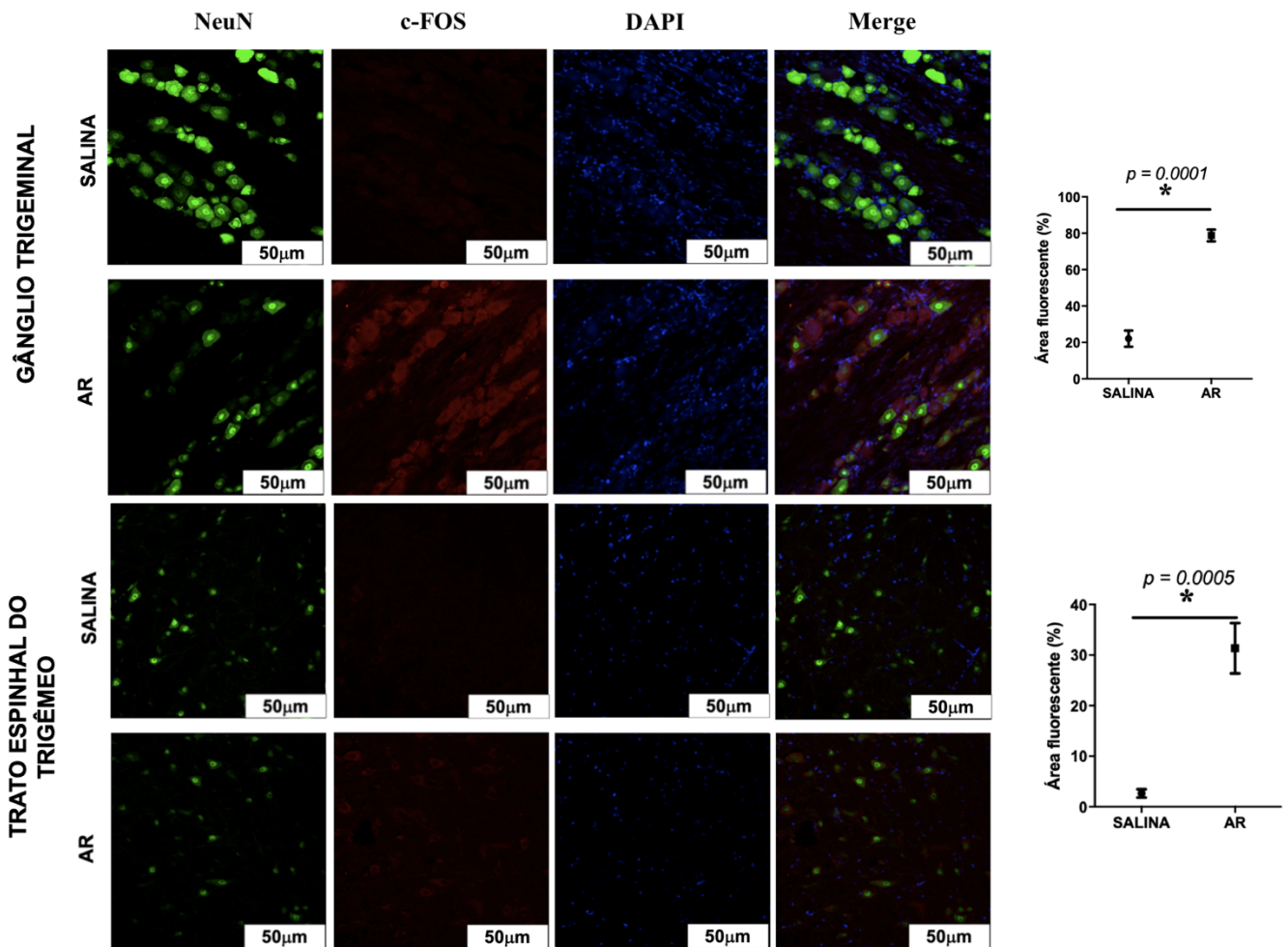


Figura 4: Expressão de c-FOS em gânglio trigeminal e trato espinhal do trigêmeo nos grupos Salina e AR. Verde: NeuN (marcador neuronal); vermelho: c-FOS; azul: DAPI (marcador nuclear) Aumento: 200x. Escala: 50 µm. Os valores são apresentados como média. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) da porcentagem da área fluorescente positiva da expressão de c-FOS em comparação com a expressão de NeuN no grupo AR versus o grupo Salina no gânglio trigeminal ($p=0.0001$) e no trato espinhal do trigêmeo ($p=0.0005$) (Teste T de Student).

O grupo AR teve aumento significativo da expressão da proteína Wnt-10b nas células do gânglio trigeminal ($p=0.0001$) em relação ao grupo Salina. Não foi observada marcação dessa proteína na região de trato espinal do trigêmeo. (figura 5)

Na imunofluorescência para β -catenina, marcador principal da via canônica Wnt, foi observado aumento significativo na região de gânglio trigeminal dos ratos artríticos, quando comparado ao grupo Salina ($p=0.0002$), estando expresso em região de células satélites. Não foi observada marcação de β -catenina no trato espinal do trigêmeo (Figura 5).

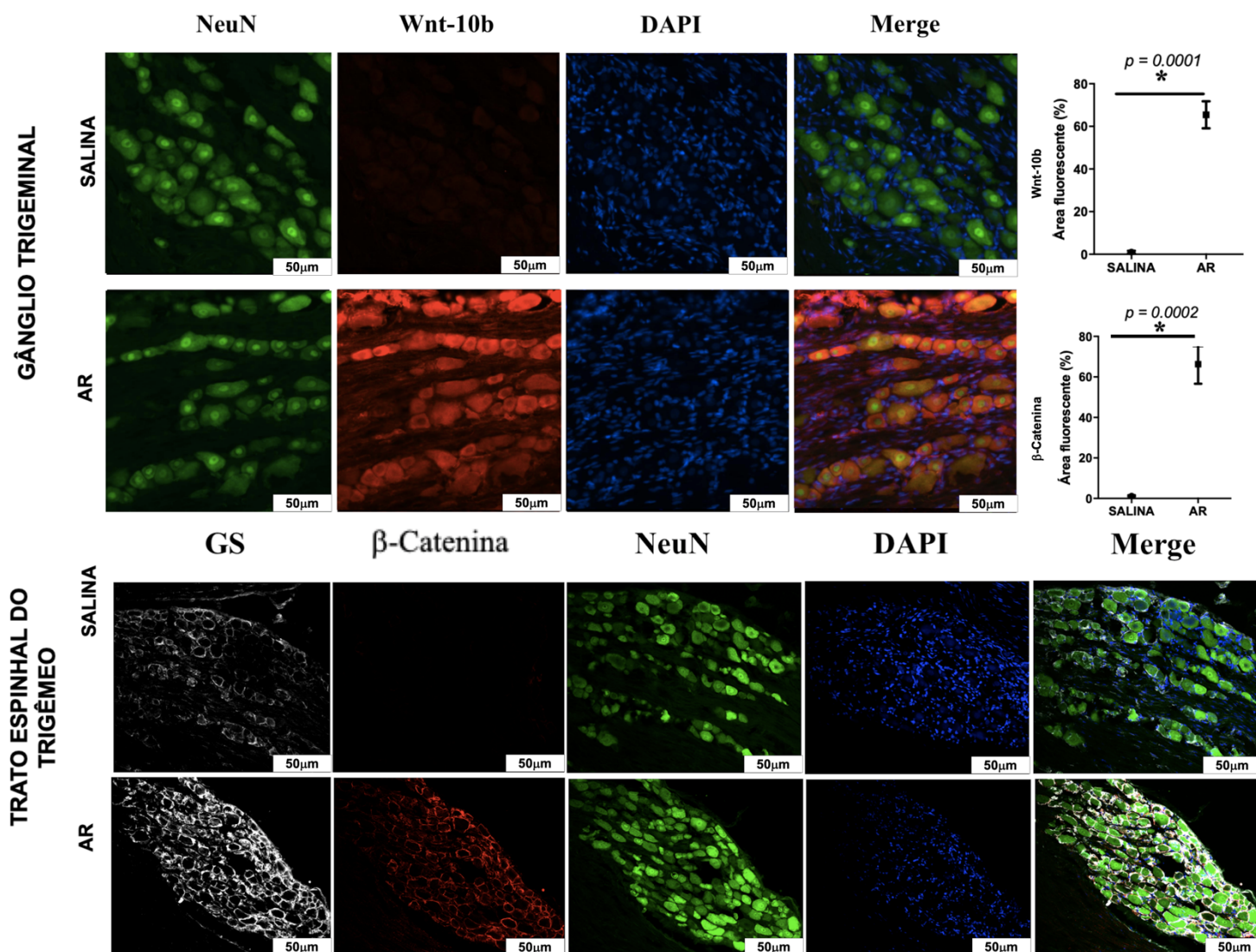


Figura 5: Expressão de Wnt-10b e β -Catenina em gânglio trigeminal nos grupos Salina e AR. Branco: GS (marcador de células satélites); Verde: NeuN (marcador neuronal); vermelho: c-FOS; azul:

DAPI (marcador nuclear) Aumento: 200x. Escala: 50 μ m. Os valores são apresentados como média. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem da área fluorescente positiva da expressão de Wnt-10b em comparação com a expressão de NeuN no grupo AR versus o grupo Salina no gânglio trigeminal ($p=0.0001$) e de b-Catenina em comparação com a expressão de Glutamina Sintetase no grupo AR versus o grupo Salina no gânglio trigeminal ($p=0.0002$) (Teste T de Student). GS: Glutamina Sintetase.

DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou a participação da via canônica Wnt na destruição articular, no comportamento nociceptivo e na sensibilização periférica na ATM de ratos artríticos. A AR na ATM ativa a via de sinalização Wnt/ β -catenina, que por sua vez pode contribuir para a resposta dolorosa do animal por meio do aumento de citocinas pró-inflamatórias (De Sousa et al. 2019). Até onde é de nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que investiga participação da via de sinalização Wnt/ β -catenina na dor da via trigeminal.

A degradação da cartilagem articular é caracterizada, inicialmente, pela perda de proteoglicanos para o fluido sinovial, acúmulo de água no tecido e fragilização da rede de colágeno. Como consequência, a cartilagem não consegue suportar a tensão necessária para conter a pressão osmótica ocasionada pelos proteoglicanos remanescentes. (Velosa et al. 2003). Com a progressão da doença, são observadas a perda da cartilagem articular e a erosão do osso subcondral (Lin et al. 2020). Essa erosão é iniciada na região lateral da interface cartilagem-osso. (Velosa et al. 2003).

Nas análises histológicas da ATM, observamos uma redução significativa da metacromasia na cartilagem articular no grupo AR, sugerindo a perda de proteoglicanos. Além disso, foi constatado presença de destruição das camadas da cartilagem articular da ATM e reabsorção óssea na camada de recobrimento ósseo, localizada lateralmente a cartilagem articular. Esses achados histopatológicos reforçam a confiabilidade do modelo experimental em mimetizar as alterações articulares, sendo também importante para a compreensão da progressão da AR na ATM.

Na AR, a depleção de proteoglicanos e a degradação do colágeno levam à destruição da cartilagem articular, e as metaloproteinasas da matriz (MMPs) têm um papel fundamental, estimulando, por exemplo a degradação do colágeno tipo I (Kuchler-Bopp et al. 2020). Nesse estudo, foi mostrado que na AR da ATM ocorre redução do colágeno tipo I (coloração vermelho-alaranjado) e aumento do colágeno tipo III (branco-esverdeado). Lemos et al (2016) mostraram que animais com artrite induzida por CFA na ATM apresentaram uma menor intensidade da coloração vermelho-alaranjada na birrefringência, sugerindo desarranjo da rede de colágeno e destruição dos componentes da matriz extracelular. Já Salo et al (1995) observaram uma maior quantidade de colágeno tipo III no côndilo mandibular em amostra tecidual de paciente com AR, sugerindo uma tentativa de reparo dessa cartilagem articular.

De Sousa et al (2019) avaliaram a imunexpressão de TNF- alfa e Il-1 beta na membrana sinovial da ATM de ratos artríticos e constataram que o aumento da imunexpressão dessas citocinas está associado com a presença de *pannus*. Na progressão da artrite, as células inflamatórias migram para a região de cartilagem articular, levando a degradação dessa cartilagem (McInnes and Schett, 2011) No nosso estudo, foi observado um aumento da imunexpressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 na cartilagem articular dos animais artríticos. Essas citocinas pro-inflamatórias podem contribuir para a destruição articular na AR por meio da liberação das MMPs através da inibição de síntese de proteoglicanos em condrócito articular, suprimindo a síntese de colágenos II e IX e aumentando a produção do colágeno tipo III, levando a uma reparação tecidual inadequada (Veloso et al. 2003; García et al. 2010; Ghassemi-Nejad et al. 2011; Narazaki, 2017).

Foi observado que tanto a proteína Wnt-10b como a β -catenina tiveram um aumento significativo da sua imunexpressão no grupo AR, e esta via pode estar associada com a progressão dos danos articulares da ATM, assim como aumento das citocinas pró-inflamatórias, redução do colágeno tipo I, aumento do colágeno tipo III e redução dos proteoglicanos na cartilagem articular.

A via canônica Wnt está envolvida na regulação da homeostase da cartilagem articular, desempenhando um papel crucial na proliferação celular e regulação do fenótipo dos condrócitos (Zheng et al. 2017). Com sua ativação, a proteína β -catenina é translocada da região citoplasmática para a região nuclear, e esta é responsável por

ativar fatores de transcrição gênica, como as MMPs. (Zhang et al., 2018). Zhang et al (2018) mostraram que a superexpressão de β -catenina, ocasionou uma *upregulation* da via canônica Wnt, e que esta desempenha um papel significativo no aumento da expressão da MMP-13 nos condrócitos, facilitando a degradação da matriz extracelular e induzindo a osteoartrite.

C-Myc e a ciclina D1 são proteínas também ativadas pela translocação nuclear de β -catenina. C-Myc está envolvido na ativação, proliferação e transformação celular, sendo um importante marcador na regulação do crescimento das células sinoviais (Lee et al. 2019). Trabalhos relataram que a supressão de c-Myc foi capaz de reduzir efetivamente a proliferação de células sinoviais, inflamação, e a expressão de citocinas como a TNF- α , mostrando a importância dessa proteína como possível e importante alvo terapêutico para a AR (Hashiramoto et al., 1999; Lee et al. 2019). Já a ciclina D1 atua na proliferação dos condrócitos, sendo uma proteína-chave no ciclo celular (Zheng et al. 2017). Sun et al (2015) mostraram que o aumento da expressão de ciclina D1 ativou a via Wnt/ β -catenina, estimulando a apoptose celular dos condrócitos e conseqüentemente, aumentando a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6. O aumento da imunoexpressão desses dois marcadores estão associados à ativação da via canônica Wnt no grupo AR.

O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias não ocasiona apenas repercussões a níveis de tecidos sinoviais, mas também contribui para o estabelecimento da sensibilização periférica (Bas et al. 2016). TNF- α e IL-1 β atuam nos neurônios sensoriais primários, reduzindo o limiar de excitabilidade dos mesmos, contribuindo para a hiperalgesia na AR. (Bas et al. 2016). Já a citocina IL-6 é capaz de estimular a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), potencializando a atividade neuronal, sugerindo sua atuação direta em neurônios nociceptivos (Favalli, 2020). Estudos experimentais mostraram que injeções de IL-6 nas articulações do joelho desencadearam respostas aumentadas dos neurônios espinhais ao estímulo mecânico, sensibilizando as fibras C (Brenn et al. 2007).

Em nosso estudo, o comportamento nociceptivo foi avaliado através do aparelho Von Frey eletrônico e a hipernocicepção observada na região de ATM em animais artríticos mostra a sensibilização de fibras nervosas periféricas. Lanzillo et al. (1998), em estudo em humanos, mostraram que o nervo periférico pode apresentar alterações

morfológicas e eletrofisiológicas, mesmo na ausência de evidência clínica de comprometimento do mesmo, sendo o ponto de partida para o envolvimento do Sistema Nervoso na AR.

Nos gânglios sensitivos, os corpos celulares dos neurônios estão circundados por células satélites e a comunicação neurônio – célula satélite tem sido implicada na cronificação da dor e em processos inflamatórios (Takeda et al. 2007). Após lesão periférica, as células satélites reagem exibindo alterações morfofisiológicas secundárias a alterações neuronais, implicando na ativação de mecanismos de sinalização entre os neurônios e estas células. Takeda et al (2007) mostraram que as células satélites podem modular a excitabilidade dos neurônios nociceptivos do gânglio trigeminal via IL-1 β , induzindo despolarização e aumento da expressão de receptor da interleucina-1 (IL-1R) no corpo neuronal.

Em nosso estudo, observamos uma aumentada expressão de β -catenina em células satélites e de Wnt10b no corpo celular neuronal em gânglio trigeminal. Kim et al (2021) mostraram em um modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel que há o aumento de expressão de Wnt3a, Wnt10a e de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) em neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal e de β -catenina em células satélites. Nesse estudo, os autores mostraram que a administração de antagonista da via canônica Wnt, reduziu a expressão de TNF- α , IL-1 β , proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), Wnt3a, e de Wnt10a.

Zhang et al (2013) mostraram que as proteínas Wnt3a e β -catenina são expressas em gânglio e corno dorsal da medula espinhal em um modelo de dor neuropática em ratos, entretanto em nosso estudo observamos aumento da expressão da Wnt10b e de β -catenina somente em gânglio trigeminal e que há aumento de expressão de c-Fos ao longo da via trigeminal. Não houve imunoexpressão de Wnt10b e de β -catenina no trato espinhal do trigêmeo no tempo avaliado de 24 h após a terceira injeção intra-articular de mBSA (dados não mostrados). Desse modo, acreditamos que para melhor compreender a participação via Wnt canônica, novos estudos deverão ser realizados para avaliar a cinética de imunoexpressão dessas proteínas ao longo da via trigeminal em diferentes tempos após a indução da AR na ATM, bem como investigar a participação das células gliais ao longo da cronificação da AR..

Diante disso, concluímos que a via Wnt/ β -catenina está associada com a progressão dos danos articulares e na sensibilização periférica no modelo experimental de AR na ATM. Um acompanhamento mais prolongado desse modelo experimental para a investigação da sensibilização do sistema nervoso central, com o uso de bloqueadores da via canônica Wnt, se faz necessário para o entendimento da dor e da inflamação, para posterior desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para a AR crônica.

Referências

- Ahmed U, Anwar A, Savage SS, Costa ML, Mackay N, Filer A, Raza K, Watts RA, Winyard PG, Tarr J, Haigh RC, Thornalley PJ, Rabbani N. 2015. Biomarkers of early stage osteoarthritis, rheumatoid arthritis and musculoskeletal health. *Sci.* 9259(5): 1-7.
- Baron R, Kneissel M. 2013. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat.Med.* 19(2): 179-192.
- Bas DB, Su J, Wigerblad G, Svensson C. 2016. Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. *Pain Manag.* 6(3): 265–284
- Van der Bosh M, Blom AB, Kram V, Maeda A, Sikka S, Gabet Y, Kilts TM, Berg WB, Lent PL, Kraan PM, Young MF. 2017. WISP1/CCN4 aggravates cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 25 (2017): 1900-1911.
- Brenn D, Richter F, Schaible H. 2007. Sensitization of Unmyelinated Sensory Fibers of the Joint Nerve to Mechanical Stimuli by Interleukin-6 in the Rat: An Inflammatory Mechanism of Joint Pain. *Arthritis Rheum.* 56(1): 351–359.
- Corr M. 2008. Wnt- β -catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature.* 10(4): 550-556.
- Costa ACF, Sousa, LM, Alves JMA, Goes P, Pereira KMA, Alves APNN, Vale ML, Gondim DV. 2021. Anti-inflammatory and Hepatoprotective Effects of Quercetin in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation.* [accessed 2021 July 31]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10753-021-01479-y>.
- Cunha VR, Brenol CV, Fuchs SC, Arlindo EM, Melo IMF, Machado CA, Castro Chaves Jr H. 2012. Metabolic syndrome prevalence is increased in rheumatoid arthritis patients and is associated with disease activity. *Scand J Rheumatol.* 41(2012):186–191.
- De Sousa LM, Alves JMS, Martins CS, Pereira KMA, Goes P, Gondim DV. 2019. Immunoexpression of canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats. *Inflamm. Res.* (68): 889-900.

- Favalli EG. 2020. Understanding the Role of Interleukin-6 (IL-6) in the Joint and Beyond: A Comprehensive Review of IL-6 Inhibition for the Management of Rheumatoid Arthritis. *Rheumatol Ther.* 7(2020):473–516.
- Ferreira AEC, Barros-Silva PG, Oliveira CCO, Verde MEQL, Sousa FB, Mota MRL, Lima-Júnior RCP, Alves APNN. 2020. Influence of infliximab therapy on bone healing post-dental extraction in rats. *Arch. Oral Bio.* 112(2020):104680.
- Garcia S, Forteza J, López-Otin C, Gómes-Reino JJ, González A. 2010. Matrix metalloproteinase-8 deficiency increases joint inflammation and bone erosion in the K/BxN serum-transfer arthritis model. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R224.
- Gatica-Andrades M, DimitriosVagenas D, Kling J, Nguyen TTK, Benham H, Thomas R, Korner H, Venkatesh B, Cohen J, Blumenthal A. 2017. WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. *Blood Adv.* 2017 Jul 10;1(16):1274-1286.
- Ghassemi-Nejad S, Kobezda T, Rauch TA, Matesz C, Glant TT, Mikecz K. 2011. Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular joints in mice with autoimmune inflammatory arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 19(4):458-465.
- Hashiramoto A, Sano H, Maekawa T, Kawahito Y, Kimura S, Kusaka Y, Wilder RI, Kato H, Kondo M, Nakajima H. 1999. C-Myc antisense oligodeoxynucleotides can induce apoptosis and down-regulate Fas expression in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 42(5):954–962.
- Humphries AC, Mlodzik M. 2018. From instruction to output: Wnt/PCP signaling in development and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 2018 (51):110–116.
- Kim HE, Bae J, Lee SH, Hwang SH, Kim MJ, Jun S, Cervantes CL, Jung YS, Back S, et al. 2021. Blockers of Wnt3a, Wnt10a, or β -Catenin Prevent Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain In Vivo. *Neurotherapeutics.* 18(2021):601–614.
- Kroese JM, Volgenant CMC, Schaardenburg DV, Loss BG, Crielaard W, Lobbezoo F. 2020. Temporomandibular joint function, periodontal health, and oral microbiome in early rheumatoid arthritis and at-risk individuals: a prospective cohort study protocol. *BDJ Open.* 6(2020):1-5.
- Kuchler-Bopp S, Mariotte A, Strub M, Po C, De Cauwer A, Schulz G, Bellinghen XV, Fioretti F, Clauss F, Georgel P, Benkirane-Jessel N, Bornert F. 2020. Temporomandibular joint damage in K/BxN arthritic mice. *Int J Oral Sci.* 2020 Feb 6;12(1):5.
- Lanzillo B, Pappone N, Crisci C, Girolamo C, Massini R, Caruso G. 1998. Subclinical peripheral nerve involvement in patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 41(7):1196-1202.
- Lee Y, Guo H, Zhao G, Yang C, Chang H, Yan R, Chen L, Lee S. 2019. Tylophorine-based compounds are therapeutic in rheumatoid arthritis by targeting the caprin-1

ribonucleoprotein complex and inhibiting expression of associated c-Myc and HIF-1 α . *Pharmacological Research*. 152(2): 104581.

Lemos GA, Rissi R, Pires ILS, Oliveira LP, Aro AA, Pimentel ER, Palomari ET. 2016. Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the temporomandibular joint. *Lasers Med Sci*. 31(6):1051-9.

Lin Y, Anzaghe M, Schulke S. 2020. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 880(9): 9040880.

McInnes IB, Schett G. 2011. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 365(23): 2205-2219.

Miao C, Yang Y, He X, Li X, Huang C, Huang Y, Zhang L, Lv X, Jin Y, Li J. 2013. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal*. 25(10):2069-78.

Narazaki M, Tanaka T, Kishimoto T. 2017. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Review Of Clinical Immunology*. 13(6): 535-551.

Oliva CA, Montecinos-Oliva C, Inestrosa N. 2018. Wnt signaling in the Central Nervous System: New Insights in Health and Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018 (153):81-130.

Pontes RB, Lisboa MRPL, Pereira AF, Lino JÁ, Oliveira FB, Mesquita AKV, Alves BWF, Lima-Júnior RCP, Vale ML. 2019. Involvement of Endothelin Receptors in Peripheral Sensory Neuropathy Induced by Oxaliplatin in Mice. *Neurotox Res* 36(2019):688–699.

Ruparelia PB, Shah DS, Ruparelia K, Sutaria SP, Pathak D. 2014. Bilateral TMJ involvement in Rheumatoid Arthritis. *Cas Rep Dent*. 2014: 262430.

Salo LA, Raustia AM. 1995. Type II and Type III Collagen in Mandibular Condylar Cartilage of Patients With Temporomandibular Joint Pathology. *J Oral Maxillofac Surg*. 53(1995):39-44.

Sen, M. 2005. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 44(6):708–713.

Shi Y, Yuan S, Li B, Wang J, Carlton SM, Chung K, Chung JM, Tang SJ. 2012. Regulation of Wnt signaling by nociceptive input in animal models. *Mol Pain*. 19(8). [accessed 2021 July 31]. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-47>.

Singh V, Holla S, Ramachandra SG, Balaji KN. 2015. WNT-inflammasome signaling mediates NOD2-induced development of acute arthritis in mice. *J Immunol*. 194(7):3351-3360.

Sodhi A, Naik S, Pai A, Anuradha A. 2015. Rheumatoid arthritis affecting temporomandibular joint. *Contemporary Clinical Dentistry*. 6(1): 124-127.

Sun, J, Yan, P, Chen, Y, Chen, Y, Yang, J, Xu, G, Mao, H, Qiu, Y. 2015. MicroRNA-26b inhibits cell proliferation and cytokine secretion in human RASF cells via the Wnt/GSK-3 β / β -catenin pathway. *Diagnostic pathology*. 10(72). [accessed 2021 July 11]. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0309-x>.

Takeda M, Tanimoto T, Kadoi J, Nasu M, Takahashi M, Kitagawa J, Matsumoto S. 2007. Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain*. 129(1-2):155-66.

Velosa APP, Teodoro WR, Yoshinari, NH. 2003. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 43(3):160-166.

Walsh DA, McWilliams DF. 2014. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 10(10):581-92.

Wang JF, Xu HJ, He Z, Yin Q, Cheng W. 2020. Crocin Alleviates Pain Hyperalgesia in AIA Rats by Inhibiting the Spinal Wnt5a/ β -Catenin Signaling Pathway and Glial Activation. *Neural Plasticity*. 2020. [accessed 2021 July 01]. <https://doi.org/10.1155/2020/4297483>.

Zhang YK, Huang ZJ, Liu S, Liu YP, Song AA, Song XJ. 2013. WNT signaling underlies the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. *J Clin Invest*. 123(5):2268-2286.

Zhang HX, Sun C, Yu HC, Song B, Pan ZX. 2018. Targeted inhibition of β -catenin by miR-320 and decreased MMP-13 expression in suppressing chondrocyte collagen degradation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 22(18):5828-5835.

Zhao Y, Yang Z. 2018. Effect of Wnt signaling pathway on pathogenesis and intervention of neuropathic pain. *Exp Ther Med*. 16(4):3082-3088.

Zheng W, Lin P, Ma Y, Shao X, Chen H, Chen D, Liu X, Li X, Ye H. 2017. Psoralen promotes the expression of cyclin D1 in chondrocytes via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *International journal of molecular medicine*. 40(5): 1377–1384.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

1. Animais com AR na ATM apresentaram destruição das camadas da cartilagem articular, hiperplasia sinovial, presença de células inflamatórias na membrana sinovial, reabsorção da camada de recobrimento ósseo e redução da metacromasia, devido a diminuição dos proteoglicanos.
2. Animais artríticos tiveram uma menor porcentagem da birrefringência de colágeno tipo I e aumento da porcentagem de colágeno tipo III na ATM.
3. A AR na ATM aumentou a expressão de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 na membrana sinovial e na cartilagem articular, assim como ativou a via NF- κ B.
4. A AR na ATM ativa a via Canônica Wnt, e esta está relacionada com a progressão dos danos articulares e da membrana sinovial, aumentando a expressão de Wnt-10b, β -catenina, c-Myc e ciclina D1.
5. A AR reduz limiar nociceptivos de ratos após as injeções intra-articulares de mBSA na ATM
6. O grupo AR apresentou uma maior expressão de c-Fos na via trigeminal
7. Animais artríticos apresentaram uma maior expressão de Wnt-10b e β -catenina no gânglio trigeminal.

REFERÊNCIAS

- AHMED, N.; CATRINA, A.I.; ALYAMANI, A.O.; MUSTAFA, H.; ALSTERGREN, P. Deficient cytokine control modulates temporomandibular joint pain in rheumatoid arthritis. **European Journal of Oral Sciences**, v. 123, p. 235-241. 2015.
- ASQUITH, D.L.; MILLER, A.M.; MCINNES, I.B.; LIEW, F.Y. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2040-2044, 2009.
- BARON, R.; KNEISSEL, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 179–192, 2013.
- BAS, D. B.; SU, J.; WIGERBLAD, G.; SVENSSON, C. I. Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. **Pain Management**, v. 6, n. 3, p. 265 – 284, 2016.
- BONFANTE, R.; NAPIMOGA, M. H.; MACEDO, C. G.; ABDALLA, H. B.; PIERONI, V.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. The P2X7 Receptor, Cathepsin S and Fractalkine in the Trigeminal Subnucleus Caudalis Signal Persistent Hypernociception in Temporomandibular Rat Joints. **Neuroscience**, v. 391, p. 120–130, 2018.
- CAMPOS, D.; DE ARAÚJO FERREIRA MUNIZ, I.; DE SOUZA VILLARIM, N. L.; RIBEIRO, I.; BATISTA, A., BONAN, P.; DE SALES, M. Is there an association between rheumatoid arthritis and bone changes in the temporomandibular joint diagnosed by cone-beam computed tomography? A systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 5, p. 2449–2459. 2021.
- CORR M. Wnt-beta-catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Clinical Practice. Rheumatology**, v. 4, n. 10, p. 550–556. 2008.
- COSTA, A.; DE SOUSA, L. M.; DOS SANTOS ALVES, J. M.; GOES, P.; PEREIRA, K.; ALVES, A.; VALE, M. L.; GONDIM, D. V. Anti-inflammatory and Hepatoprotective Effects of Quercetin in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. **Inflammation**, 10.1007/s10753-021-01479-y. 2021.
- CUNHA, C. O.; PINTO, L. M. S.; MENDONÇA, L. M.; SALDANHA, A. D. D.; CONTI, A. C. C. F.; CONTI, P. C. R. Bilateral Asymptomatic Fibrous-Ankylosis of the Temporomandibular Joint Associated with Rheumatoid Arthritis: A Case Report. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 6, p. 779-782. 2012.
- DE MORAES, L. O.C.; TEDESCO, R. C.; ARRAEZ-AYBAR, L. A.; KLEIN, O.; MÉRIDA-VELASCO, J. R.; ALONSO, L. G. Development of synovial membrane in the temporomandibular joint of the human fetus. **European Journal of Histochemistry : EJH**, v. 59, n. 4, 2569. 2015.
- DE SOUSA, L. M.; DOS SANTOS ALVES, J. M.; DA SILVA MARTINS, C.; PEREIRA, K.; GOES, P.; GONDIM, D. V. Immunoexpression of canonical Wnt and NF-κB signaling pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats. **Inflammation Research**, v. 68, n. 10, p. 889–900. 2019.

DIJKGRAAF, L. C.; DE BONT, L. G.; BOERING, G.; LIEM, R. S. Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, n. 3, p. 332–338. 1996.

GATICA-ANDRADES, M.; VAGENAS, D.; KLING, J.; NGUYEN, T.; BENHAM, H.; THOMAS, R.; KÖRNER, H.; VENKATESH, B.; COHEN, J.; BLUMENTHAL, A. WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. **Blood Advances**, v. 1, n. 16, p. 1274–1286. 2017.

GE, Q.; WANG, H.; XU, X.; XU, L.; ZHAI, L.; TAO, R. PDK1 promotes apoptosis of chondrocytes via modulating MAPK pathway in osteoarthritis. **Tissue & Cell**, v. 49, n. 6, p. 719–725. 2017.

HU, C.; ZHAO, Y. T.; CUI, Y. B.; ZHANG, H. H.; HUANG, G. L.; LIU, Y.; LIU, Y. F. Wnt/beta-Catenin Signaling Contributes to Vincristine-Induced Neuropathic Pain. **Physiological Research**, v. 69, n. 4, p. 701–710. 2020.

HUANG, J.; BLOE, C. B.; ZHOU, X.; WU, S.; ZHANG, W. The Role of the Spinal Wnt Signaling Pathway in HIV-Related Neuropathic Pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 40, n. 7, p. 1075–1085. 2020.

HUMPHRIES, A. C.; MLODZIK, M. From instruction to output: Wnt/PCP signaling in development and cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 51, p. 110–116. 2018.

IMAI, K.; MORIKAWA, M.; D'ARMIENTO, J.; MATSUMOTO, H.; KOMIYA, K.; OKADA, Y. Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 4, p. 1615–1620. 2006

KROESE, J. M.; VOLGENANT, C.; VAN SCHAARDENBURG, D.; LOOS, B. G.; CRIELAARD, W.; LOBBEZOO, F. Temporomandibular joint function, periodontal health, and oral microbiome in early rheumatoid arthritis and at-risk individuals: a prospective cohort study protocol. **BDJ open**, v. 6, n. 7. 2020.

KUCHLER-BOPP, S.; MARIOTTE, A.; STRUB, M.; PO, C.; DE CAUWER, A.; SCHULZ, G.; VAN BELLINGHEN, X.; FIORETTI, F.; CLAUSS, F.; GEORGEL, P.; BENKIRANE-JESSEL, N.; BORNERT, F. Temporomandibular joint damage in K/BxN arthritic mice. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 1, p. 5. 2020.

LE MOS, G. A.; RISSI, R.; DE SOUZA PIRES, I. L.; DE OLIVEIRA, L. P.; DE ARO, A. A.; PIMENTEL, E. R.; PALOMARI, E. T. Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the temporomandibular joint. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 6, p. 1051–1059. 2016.

LIU, W.; WU, T.; DONG, X.; ZENG, Y. A. Neuropilin-1 is upregulated by Wnt/ β -catenin signaling and is important for mammary stem cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10941. 2017.

MIAO, C. G.; YANG, Y. Y.; HE, X.; LI, X. F.; HUANG, C.; HUANG, Y.; ZHANG, L.; LV, X. W.; JIN, Y.; LI, J. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 10, p. 2069–2078. 2013

NOZAWA-INOUE, K.; AMIZUKA, N.; IKEDA, N.; SUZUKI, A.; KAWANO, Y.; MAEDA, T. Synovial membrane in the temporomandibular joint--its morphology, function and development. **Archives of Histology and Cytology**, v. 66, n. 4, p. 289–306. 2003

OKAMATO, Y.; GHOSH, T.; OKAMOTO, T.; SCHUYLER, R. P.; SEIFERT, J.; CHARRY, L. L.; VISSER, A.; FESER, M.; FLEISCHER, C.; PEDRICK, C.; AUGUST, J.; MOSS, L.; BEMIS, E. A.; NORRIS, J. M.; KUHN, K. A.; DEMORUELLE, M. K.; DEANE, K. D.; GHOSH, D.; HOLERS, V. M.; HSIEH, E. Subjects at-risk for future development of rheumatoid arthritis demonstrate a PAD4-and TLR-dependent enhanced histone H3 citrullination and proinflammatory cytokine production in CD14^{hi} monocytes. **Journal of Autoimmunity**, v. 117, 102581. 2021.

OLIVA, C. A.; MONTECINOS-OLIVA, C.; INESTROSA, N. C. Wnt Signaling in the Central Nervous System: New Insights in Health and Disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 153, p. 81–130. 2018.

SILVA QUINTEIRO, M.; HENRIQUE NAPIMOGA, M.; GOMES MACEDO, C.; FURTADO FREITAS, F.; BALASSINI ABDALLA, H.; BONFANTE, R.; TRINDADE CLEMENTE-NAPIMOGA, J. 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 58–65. 2014.

RAJA, S. N.; CARR, D. B.; COHEN, M.; FINNERUP, N. B.; FLOR, H.; GIBSON, S.; KEEFE, F. J.; MOGIL, J. S.; RINGKAMP, M.; SLUKA, K. A.; SONG, X. J.; STEVENS, B.; SULLIVAN, M. D.; TUTELMAN, P. R.; USHIDA, T.; VADER, K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982. 2020.

RUPARELIA, P. B.; SHAH, D. S.; RUPARELIA, K.; SUTARIA, S. P.; PATHAK, D. Bilateral TMJ Involvement in Rheumatoid Arthritis. **Case Reports in Dentistry**, v. 2014, 262430. 2014.

SEN M. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 44, n. 6, p. 708–713. 2005.

SHI, Y.; YUAN, S.; LI, B.; WANG, J.; CARLTON, S. M.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M.; TANG, S. J. Regulation of Wnt signaling by nociceptive input in animal models. **Molecular Pain**, v. 8, n. 47. 2012.

SHIM, J. S.; KIM, C.; RYU, J. J.; CHOI, S. J. Correlation between TM joint disease and rheumatic diseases detected on bone scintigraphy and clinical factors. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4547. 2020.

SINGH, V.; HOLLA, S.; RAMACHANDRA, S. G.; BALAJI, K. N. WNT-inflammasome signaling mediates NOD2-induced development of acute arthritis in mice. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 7, p. 3351–3360. 2015.

SODHI, A.; NAIK, S.; PAI, A.; ANURADHA, A. Rheumatoid arthritis affecting temporomandibular joint. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 6, n.1, p. 124–127. 2015.

VAN DEN BOSCH, M. H.; BLOM, A. B.; KRAM, V.; MAEDA, A.; SIKKA, S.; GABET, Y.; KILTS, T. M.; VAN DEN BERG, W. B.; VAN LENT, P. L.; VAN DER KRAAN, P. M.; YOUNG, M. F. WISP1/CCN4 aggravates cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 11, p. 1900–1911. 2017.

WADHWA, S.; KAPILA, S. TMJ disorders: future innovations in diagnostics and therapeutics. **Journal of Dental Education**, v. 72, n.8, p. 930–947. 2008.

WALSH, D. A.; MCWILLIAMS, D. F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 581–592. 2014.

WANG, J.; ZHANG, S.; LI, L.; ZHANG, L. Involvement of Wnt5a within the cerebrospinal fluid-contacting nucleus in nerve injury-induced neuropathic pain. **The International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 2, p. 147–153. 2015

WANG, J. F.; XU, H. J.; HE, Z. L.; YIN, Q.; CHENG, W. Crocin Alleviates Pain Hyperalgesia in AIA Rats by Inhibiting the Spinal Wnt5a/ β -Catenin Signaling Pathway and Glial Activation. **Neural Plasticity**, v. 2020, 4297483. 2020.

YUAN, S.; SHI, Y.; TANG, S. J. Wnt signaling in the pathogenesis of multiple sclerosis-associated chronic pain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 904–913. 2012.

ZHANG, Y. K.; HUANG, Z. J.; LIU, S.; LIU, Y. P.; SONG, A. A.; SONG, X. J. WNT signaling underlies the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 5, p. 2268–2286. 2013.

ZHANG, A.; LEE, Y. C. Mechanisms for Joint Pain in Rheumatoid Arthritis (RA): from Cytokines to Central Sensitization. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 5, p. 603–610. 2018.

ZHAO, Y.; YANG, Z. Effect of Wnt signaling pathway on pathogenesis and intervention of neuropathic pain. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 4, p. 3082–3088. 2018.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – UFC)



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA NA PROGRESSÃO DA ARTRITE REUMATOIDE CRÔNICA DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS: UMA ANÁLISE MORFOLÓGICA E NOCICEPTIVA", protocolada sob o CEUA nº 4747280219 (ID 000921), sob a responsabilidade de **Delane Viana Gondim e equipe; LUANE MACEDO DE SOUSA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 09/04/2019.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF WNT/B-CATENIN SIGNALING PATHWAY IN THE PROGRESSION OF CHRONIC RHEUMATOID ARTHRITIS IN RATS TEMPOROMANDIBULAR JOINT: A MORPHOLOGICAL AND NOCICEPTIVE ANALYSIS", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 4747280219 (ID 000921), under the responsibility of **Delane Viana Gondim and team; LUANE MACEDO DE SOUSA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/09/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [02/2021](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 4 meses](#)

N: [60](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [180 a 220 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

Fortaleza, 29 de outubro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará



Immunoexpression of canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats

Luane Macêdo de Sousa¹ · Joana Maria dos Santos Alves² · Conceição da Silva Martins¹ · Karuza Maria Alves Pereira^{1,2} · Paula Goes^{1,2} · Delane Viana Gondim^{1,2}

Received: 31 January 2019 / Revised: 24 July 2019 / Accepted: 27 July 2019 / Published online: 1 August 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

Objective To investigate the participation of canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways in an experimental model of chronic arthritis induced by methylated bovine serum albumin (mBSA) in rat temporomandibular joint (TMJ).

Materials and methods Wistar rats were sensitized by mBSA+Complete Freund Adjuvant (CFA)/Incomplete Freund Adjuvant (IFA) on the first 14 days (1 \times /week). Subsequently, they received 1, 2 or 3 mBSA or saline solution injections into the TMJ (1 \times /week). Hypernociceptive threshold was assessed during the whole experimental period. 24 h after the mBSA injections, the TMJs were removed for histopathological and immunohistochemical analyses for TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, RANKL, Wnt-10b, β -catenin and DKK1.

Results The nociceptive threshold was significantly reduced after mBSA injections. An inflammatory infiltrate and thickening of the synovial membrane were observed only after mBSA booster injections. Immunolabeling of TNF- α , IL-1 β and Wnt-10b was increased in the synovial membrane in arthritic groups. The immunoexpression of nuclear β -catenin was significantly higher only in the group that received 2 booster TMJ injections. However, NF- κ B, RANKL and DKK1 immunoexpression were increased only in animals with 3 mBSA intra-articular injections.

Conclusion Our results suggest that canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways participate in the hypernociception and inflammatory response in TMJ synovial membrane during the development of rheumatoid arthritis in rats.

Keywords Arthritis · Rheumatoid · Inflammation · Wnt signaling pathway · NF-kappa B kinase · Synovial membrane · Temporomandibular joint

Responsible Editor: Jason J. McDougall.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00011-019-01274-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Delane Viana Gondim
delanegondim@yahoo.com.br

¹ Post Graduate Program in Morphofunctional Sciences, Department of Morphology, Federal University of Ceará, Rua Delmiro de Farias, S/N, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE CEP 60416-030, Brazil

² Post Graduate Program in Dentistry, Department of Clinical Dentistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an example of a chronic, progressive and systemic inflammatory disease characterized by synovial inflammation and hyperplasia, production of autoantibodies and destruction of cartilage and bone [1, 2]. RA affects approximately 1% of the adult population [3] and its etiology is still unknown [4]. It is estimated that 65% of patients with RA report symptoms of affections of the temporomandibular joint (TMJ), and 75% of those have bilateral involvement [5, 6]. Symptoms may include facial pain, edema, limited mandibular movements (due to the restriction of condylar translation), headache, trismus, crackling and muscle spasms [5].

During chronic inflammation, the synovial membrane of the TMJ is responsible for releasing pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α), to the synovial fluid, leading to

synovial hyperplasia, connective tissue degeneration, fibrosis and perforation of the articular disc [7].

Experimental models of RA are useful to replicate many characteristic features of the human disease. The arthritis induced by methylated bovine serum albumin (mBSA) reproduces an immunomediated inflammation with the presence of pro-inflammatory cytokines, cellular hypertrophy, angiogenesis and cartilage and bone destruction [8–10]. An interesting goal of this experimental model is that it promotes a monoarthritis. Thus, the contralateral joint can be used as internal control [11].

Wnt pathway regulates cell homeostasis processes, such as cell differentiation, proliferation, migration and adhesion and participates in many pathological conditions [12–14], including RA [4, 15]. There are at least 3 types of Wnt pathways. Among them, the canonical pathway is the most studied and best understood so far. The binding of Wnt to its receptor inhibits the glycogen synthase kinase 3- β , releasing β -catenin from its destruction complex and increasing the presence of the cytoplasmic-free β -catenin. This β -catenin excess translocates into the nucleus and induces a cellular response throughout gene transduction [4]. The canonical Wnt pathway can promote synovial hyperplasia and inflammation, pannus formation and bone and cartilage erosion during the progression of this disease [15].

The activation of the nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway is the most critical signaling in inflammatory processes and it is closely involved in chronic inflammatory disorders, including RA [16]. NF- κ B has the ability to control the expression of gene products affecting various cellular responses, including cell proliferation and apoptosis [17]. This signaling can stimulate neoangiogenesis and inflammation in the synovial membrane [18]. During the rheumatic disease, chondrocytes express many of NF- κ B-mediated cytokines and chemokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-8 and receptor activator of NF- κ B (RANKL), increasing the synthesis of catabolic factors and further inflammation [18]. In human TMJ arthritis, the NF- κ B activation in synovial fibroblasts is associated with COX-2 expression induced by TNF- α , contributing to nociceptive sensitization and inflammatory response [7].

There is a functional cross-regulation between canonical Wnt pathway and NF- κ B signaling in the pathogenesis of various inflammatory diseases [19] but this correlation is not fully elucidated in TMJ RA. Therefore, considering the role of the host response in the destruction of the TMJ during RA, experimental studies are essential to understand the pathological mechanisms underlying the tissue breakdown, leading to the development of new therapeutic approaches. For this purpose, our group investigated the morphological changes of the synovial membrane during the development of TMJ arthritis, as well as the participation of canonical

Wnt and NF- κ B pathways in the progression of this chronic disease.

Materials and methods

Ethics statement

The experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Ceará, Brazil (No. 35/15) and performed in accordance with their Animal Care Standards. All rats were housed in a room that was held at a constant ambient temperature (22–24 °C) with a 12-h light/dark cycle and easy access to food and water.

TMJ rheumatoid arthritis induction and experimental groups

The experiments were performed in 24 male Wistar rats (200–250 g). The animals were divided into the following groups ($n=6$): control (C), with animals not submitted to RA induction; mBSA (1)/Saline (1), with animals that received 1 intra-articular injection of mBSA in the left TMJ and 0.9% saline solution in the right TMJ; mBSA (2)/Saline (2), with animals that received 2 intra-articular injections of mBSA in the left TMJ and saline solution in the right TMJ; mBSA (3)/Saline (3), with animals that received 3 intra-articular injections of mBSA in the left TMJ and saline solution in the right TMJ. Initially, the mBSA groups were sensitized with 500 μ g of mBSA in 200 μ L of an emulsion containing 100 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) and 100 μ L of Complete Freund Adjuvant (CFA), which was subcutaneously administered. Booster injections of mBSA dissolved in Incomplete Freund Adjuvant (IFA) were administered 7 and 14 days after the first immunization [20]. Twenty-one days after subcutaneous injections, the animals were intraperitoneally anesthetized with ketamine 10% (70 mg/kg) and xylazine 2% (6 mg/kg) and the arthritis was induced in the left TMJ in immunized animals by an intra-articular injection of mBSA (10 μ g/articulation) dissolved in 10 μ L of PBS. Booster injections of mBSA were given on days 28 and 35 [20]. The animals were euthanized 24 h after each mBSA injection in the left TMJ. The control group did not receive any mBSA administration. The animals that received 1, 2 or 3 mBSA injections in the left TMJ, also received saline (0.9%; 10 μ L; i.art) in the right TMJ [Saline (1), Saline (2) and Saline (3)]. (Supplementary File).

Evaluation of mechanical hyperalgesia

Mechanical hyperalgesia in TMJ was evaluated by measuring the intensity of force that needed to be applied to the

TMJ region until a reflex response occurs (e.g., head withdrawal). For this purpose, a digital analgesymeter (electronic von Frey Digital, Insight Instruments, São Paulo, SP, Brazil) was used to measure the nociceptive threshold (in grams) when the transducer was applied to the surface of the TMJ area. The measurements were performed by a calibrated examiner unaware of the rendered treatments [21].

The animals were subjected to a conditioning session of head withdrawal threshold measurements in the experimental room for 5 consecutive days under controlled temperatures and low illumination. The mechanical hyperalgesia tests were performed on days 0, 1, 3, 6, 7, 11, 13, 14, 18 and 20 after the subcutaneous induction of mBSA and Freund's Adjuvant, and on days 21 (6 h after the first intra-articular injection of mBSA), 24, 28, 31 and 35.

Histopathological analysis

The rats were euthanized, and the TMJ and periarticular tissue were removed. The tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h, demineralized in 10% EDTA, embedded in paraffin and sectioned along the long axis of the TMJ. Sections (4 μ m) with condyle, articular disc, synovial membrane, articular cartilage, and periarticular tissue were evaluated under light microscopy (Leica DM 2000, Wetzlar, Germany). The specimens were stained with hematoxylin–eosin (HE) and the sections were evaluated by a blinded and experienced pathologist. Scores were semi-quantitatively given for the evaluated parameters: inflammatory infiltrate and thickening of the synovial membrane. Sections were classified on a 0–3 scale for inflammatory infiltrate, where: 0=no infiltrate; 1=discrete infiltration in synovium; 2=moderate synovial infiltrate; 3=intense synovial infiltration. For thickening of the synovial membrane, a scale of 0–3 was used, where: 0=no thickening; 1=discrete thickening of the synovial membrane; 2=moderate synovial thickening; 3=intense thickening of the synovial membrane [22].

Immunohistochemical analysis for TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, RANKL, Wnt-10b, β -catenin and DKK1

Immunohistochemistry for TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, RANKL, Wnt-10b, β -catenin and DKK1 were performed on groups mBSA (2) and mBSA (3), using the streptavidin-biotin peroxidase method in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections (4- μ m thick) mounted on poly-L-lysine-coated microscope slides. The right TMJ of saline mBSA (2) and saline mBSA (3) were used as control. After deparaffinization, antigenic recuperation was performed with retrieval solution with citrate buffer (pH 6.0) for 20 min at 95 °C. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 10 min to reduce non-specific binding. The sections were

then incubated with anti-TNF- α 1:100 (Abcam; Cambridge, UK), anti-IL-1 β 1:100 (Abcam; Cambridge, UK), anti-NF- κ B P50 1:400 (Santa Cruz Biotechnology; California, USA), anti-RANKL (1:100 dilution; Santacruz Biotechnology; California, USA), anti-Wnt-10b (1:400 Abcam; Cambridge, UK), anti- β -Catenin (1:200 dilution; DAKO; California, USA) and anti-DKK1 (1:100 dilution; Santacruz Biotechnology; California, USA), diluted in DAKO antibody diluent for 1 h. The antibody binding sites were visualized by the incubation with diaminobenzidine–H₂O₂ (DAB, DAKO; California, USA) solution. A negative control lacking the primary antibody was performed in parallel with incubation. Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated in graded alcohol series, cleared in xylene and coverslipped. Positivity for TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, RANKL, Wnt-10b and DKK1 was determined by brown staining at the level of the cytoplasm in synovial membrane. For β -catenin, positive staining was labeled separately for cytoplasm and nucleus. The sections were evaluated by an examiner unaware of the treatment. Cytoplasmic and nuclear quantification of immunolabeled cells of the synovial membrane were performed in five randomly selected high-power (400 \times) fields under a microscope (Leica DM 2000, Wetzlar, Germany), and the percentage average value was used as the final immunoreactivity value [23].

Statistical analysis

The data were presented as mean \pm SEM or as medians with variation range (maximum and minimum) when appropriate from 6 animals per group. *One-way* ANOVA or *two-way* ANOVA both followed by Tukey's post hoc test were used. All tests were two-sided and considered to be statistically significant if probability level (*p* value) < 0.05. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism software, La Jolla, CA, USA) and SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) computer software program.

Results

Mechanical hyperalgesia analysis of mBSA-induced rheumatoid arthritis

The mechanical hyperalgesia evaluation in the left TMJ was performed on days 0, 1, 3, 6, 8, 11, 13, 15, 18 and 20 (sensitization phase). Significant differences were not observed during these days, suggesting that subcutaneous administration of mBSA did not modify the nociceptive threshold in the TMJ (supplementary file) (*p*=0.3397; *n*=6). On day 21, 6 h after the first mBSA intra-articular injection, a new measurement was registered and a significant reduction of

the nociceptive threshold was observed ($p < 0.0001$; $n = 6$). On day 28, 6 h after the second mBSA injection, a significant reduction of the nociceptive threshold was observed, when compared to days 21 and 24 ($p < 0.05$; $n = 6$). In the third booster administration of mBSA in the left TMJ, on day 35, the nociceptive threshold remained low and it was statistically significant compared to days 20, 21 and 24 (Fig. 1a; $p < 0.05$; $n = 6$). Saline solution was administered in the right TMJ of rats that received 1, 2 or 3 injections of mBSA in the left TMJ and was statistically different, when compared to its respective left side during all administrations of mBSA at TMJ (Fig. 1b, c, d; $p < 0.05$; $n = 6$). No statistical

difference was observed when compared to the control group ($p > 0.05$; $n = 6$).

Histopathological analysis of the TMJ

No alterations were observed in the articular tissues of the control group (Fig. 2a), as well as in the right TMJ of animals that received saline injections (Fig. 2b, c, d). On the other hand, the mBSA (1) group presented a discrete inflammatory infiltrate in the synovial membrane and thickening of the articular disc without the presence of joint cartilage destruction (Fig. 2e, e).

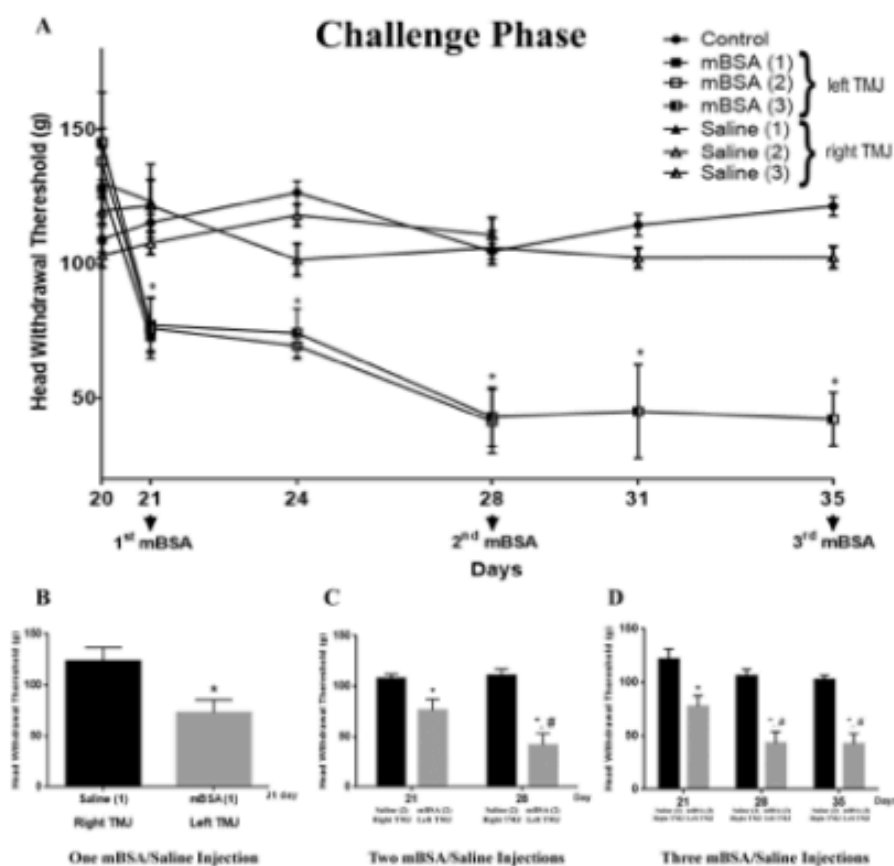


Fig. 1 Evaluation of nociception in chronic RA during mBSA or saline administrations at TMJ. **a** The head withdrawal threshold of all groups. **b** The significant difference of the mBSA 1 and Saline 1 (right TMJ) groups after the first (day 21) injection of mBSA in the TMJ. **c** The significant difference of the mBSA 2 and Saline 2 (right TMJ) groups after the first (day 21) and second (day 28) injections of mBSA in the TMJ. **d** The significant difference of the mBSA 3 and

Saline 3 (right TMJ) groups after the first (day 21), second (day 28) and third (day 35) injections of mBSA in the TMJ. Points represent the mean \pm SEM of 6 animals per group. *Significant difference compared to the saline group (contralateral—right TMJ). #Significant difference compared to day 21 ($p < 0.0001$; two-way ANOVA followed by Tukey's test)

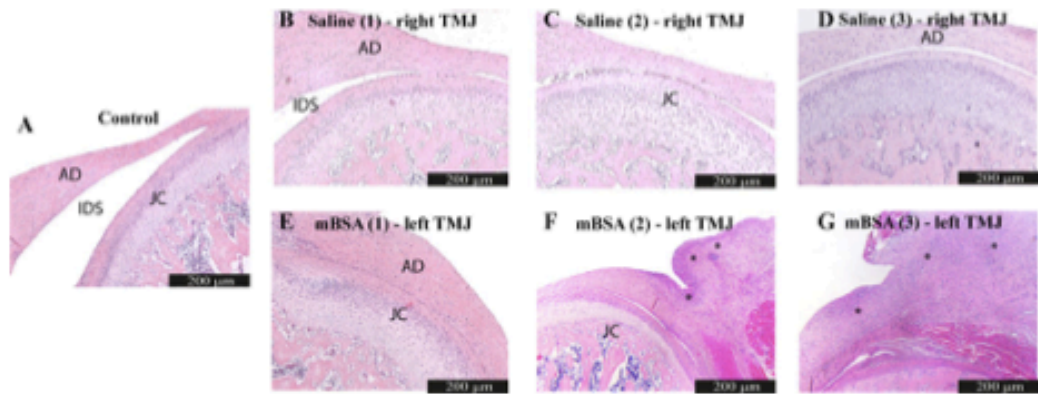


Fig. 2 Photomicrographs of the TMJ of the experimental groups. **a** Normal TMJ. **b** TMJ of the saline (1) group (right TMJ). **c** TMJ of the saline (2) group (right TMJ). **d** TMJ of the saline (3) group (right TMJ). **e** TMJ of the mBSA (1) group. **f** TMJ of the mBSA (2) group.

g TMJ of the mBSA (3) group. *JC* joint cartilage, *AD* articular disc, *IDS* infra-articular space. (*) inflammatory infiltrate. Hematoxylin & eosin (H&E). 100 \times magnification

The mBSA (2) group, however, showed an intense mononuclear inflammatory infiltrate, thickening of the articular disc, but without joint destruction (Figs. 2f, 3f). In addition, mBSA (3) group presented an intense mononuclear infiltrate, thickening of the articular disc and synovial membrane, extensive joint destruction and *pannus* formation (Figs. 2g, 3g).

After histopathological analysis, scores were applied to the experimental groups for inflammatory infiltrate and thickening of the synovial membrane. The mBSA (3) group was described by the pathologist and showed higher

scores. The cell types observed in this group were predominantly macrophages, lymphocytes and plasma cells, characteristic features of chronic inflammation (Fig. 3g). Moreover, mBSA (2) group presented expressive scores for inflammatory infiltrate, but there was no statistical difference, compared to mBSA (3) group. Saline and mBSA (1) groups did not present any statistical difference, compared to the control group (Table 1; $n=6$). Thereby, for immunohistochemical analysis, only groups mBSA (2) and mBSA (3) and their contralateral TMJs [Saline (2) and Saline (3)] were used.

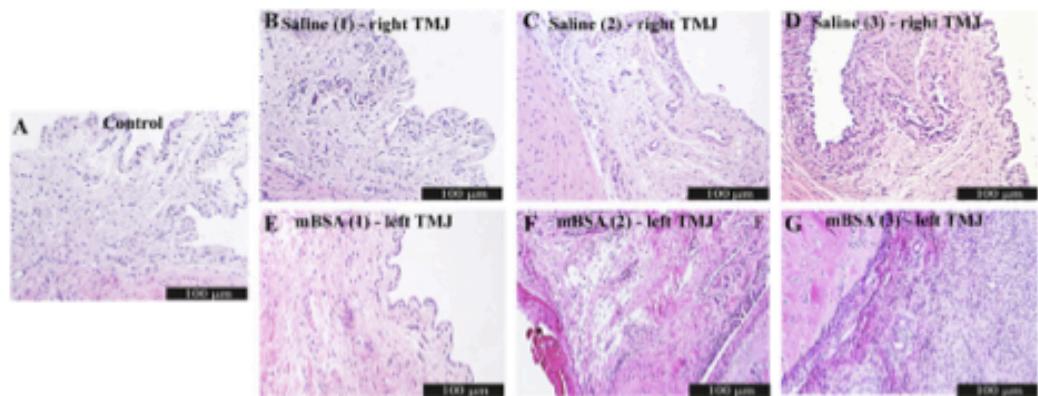


Fig. 3 Photomicrographs of the TMJ synovial membrane. **a** Normal TMJ synovial membrane. **b** Synovial membrane of the saline (1) group. **c** Synovial membrane of the saline (2) group. **d** Synovial membrane of the saline (3) group. **e** Synovial membrane of the

mBSA (1) group. **f** Synovial membrane of the mBSA (2) group. **g** Synovial membrane of the mBSA (3) group. Hematoxylin & eosin (H&E). 200 \times magnification

Table 1 Histopathological analysis of synovial membrane of groups of RA animals induced by mBSA

Groups	Thickness of synovial membrane <i>N</i> (lower–highest) ±SD	Inflammatory infiltrate of synovial membrane
Control	0 (0–0) ± 0.5000	0 (0–0) ± 0.2500
Saline (1)	0 (0–0) ± 0.2944	0 (0–0) ± 0.2000
Saline (2)	0 (0–0) ± 0.5000	0 (0–0) ± 0.0
Saline (3)	0 (0–1) ± 0.5774	0 (0–1) ± 0.0
mBSA (1)	0 (0–1) ± 0.6432	0 (0–2) ± 0.2000
mBSA (2)	1 (1–3) ± 1.414	1 (1–3) ± 0.5000
mBSA (3)	3 (2–3) ^a ± 0.5477	3 (2–3) ^a ± 0.6667

Data are reported as median scores and scores variation for 6 animals per group

SD standard deviation

^aRepresents the significant difference between mBSA (3) and other groups. ($p < 0.05$, Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test)

Immunostaining assay for TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, RANKL, Wnt-10b, β -catenin and DKK-1

Immunohistochemical analysis for TNF- α and IL-1 β showed an increase in the immunoeexpression of these cytokines, which was characterized by brown-colored cells in arthritic TMJ of rats injected with mBSA (Fig. 4c, d, g, h), compared to the contralateral TMJs (Fig. 4a, b, e, f). No immunolabeling was evidenced in any of the antibodies tested on the slides used as the negative control, where the primary antibody was replaced by the diluent antibody (Dako, St. Louis, USA).

There was an increase of TNF- α immunolabeling in the synovial membrane in groups of animals that received mBSA booster injections. The mBSA (2) and mBSA (3) groups showed higher immunolabeling for TNF- α when compared to the Saline groups ($p < 0.05$; $n = 5$). There was no statistical difference between the arthritic groups (Fig. 5a; $p > 0.05$; $n = 5$).

The mBSA groups showed higher immunolabeling for IL-1 β in the synovial membrane when compared to Saline groups ($p < 0.0001$; $n = 5$). Nonetheless, there was no significant difference between mBSA (2) and mBSA (3) groups (Fig. 5b; $p > 0.05$; $n = 5$).

Our results also showed an increased expression of NF- κ B (Fig. 4l) and RANKL (Fig. 4p) in rats with 3 mBSA booster injections in TMJ when compared to the mBSA (2) (Fig. 4k, o) and saline groups (Fig. 4i, j, m, n) and these were statistically different ($p < 0.0001$; $n = 5$); Fig. 5c, d).

Wnt-10b showed increased immunolabeling in TMJ of arthritic rats (Fig. 6c, d). In mBSA (2) and mBSA (3) groups, the Wnt-10b expression in synovial membrane was significantly higher when compared to Saline groups, and the mBSA (2) group showed a greater immunolabeling of this protein when compared to mBSA (3) (Fig. 5e; $p < 0.05$; $n = 5$).

There was no statistical difference in cytoplasmic β -catenin immunolabeling among the groups (Fig. 5g; $p > 0.05$; $n = 5$). However, there was a significant increase in immunoeexpression of nuclear β -catenin only in the mBSA (2) group (Figs. 6g, h, 5h; $p < 0.05$; $n = 5$). In addition, the immunoeexpression of DKK1, a Wnt antagonist, was significantly increased only in mBSA (3) group, when compared to other groups (Fig. 6l and 5i; $p < 0.05$; $n = 5$).

Discussion

In the present study, it was observed that the sensitization phase with subcutaneous administration of CFA or IFA and mBSA did not alter the head withdrawal threshold. This nociceptive threshold was reduced after 6 h of the first intra-articular mBSA injection in the left TMJ. In accordance with previous studies, 1 mBSA injection was able to reduce the nociceptive threshold in rat's knee [24] and mice's tibiofemoral joint [25]. Quinteiro et al. reported that 24 h after 1 mBSA injection in the TMJ of rats, the animals presented a painful behavior and an important inflammatory influx [8].

After 24 h of 1 mBSA injection in rats' TMJ, a reduction of the nociceptive threshold and a discrete acute inflammatory infiltrate, marked by neutrophils, was observed. Therefore, morphologically, it could not simulate a chronic arthritic process. In such wise, booster injections of mBSA were used in the TMJ [20], to verify the development of RA. Those injections were able to reproduce the same findings of a human RA. Thereby, it was observed in the present study that only the mBSA (3) group showed an expressive chronic inflammatory infiltrate, with macrophages, lymphocytes and plasma cells, and *pannus* formation.

An interesting goal of this experimental model is that it promotes a monoarthritis and the contralateral joint can be used as internal control [11]. We confirm this fact in arthritic animals that received saline solution injection in

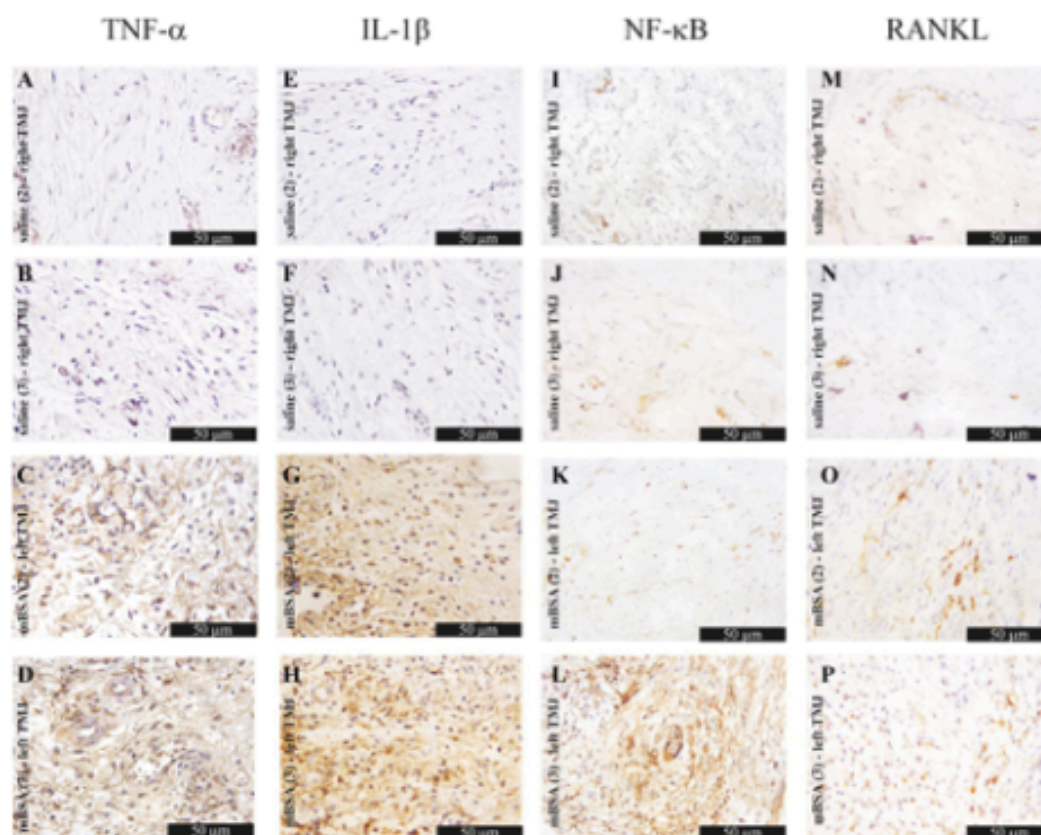


Fig. 4 Photomicrographs of immunopositive cells in synovial membrane for TNF- α , IL-1 β , NF- κ B and RANKL after mBSA booster injections in TMJ. Immunopositive cells in synovial membrane for TNF- α in Saline (2) (a), Saline (3) (b), mBSA (2) (c) and mBSA (3) (d) groups. Immunopositive cells in synovial membrane for IL-1 β of

Saline (2) (e), Saline (3) (f), mBSA (2) (g) and mBSA (3) (h) groups. Immunopositive cells in synovial membrane for NF- κ B of Saline (2) (i), Saline (3) (j), mBSA (2) (k) and mBSA (3) (l) groups. Immunopositive cells in synovial membrane for RANKL of Saline (2) (m), Saline (3) (n), mBSA (2) (o) and mBSA (3) (p) groups

the right TMJ and this joint did not show hyperalgesia to the mechanical stimuli or the presence of inflammatory infiltrate.

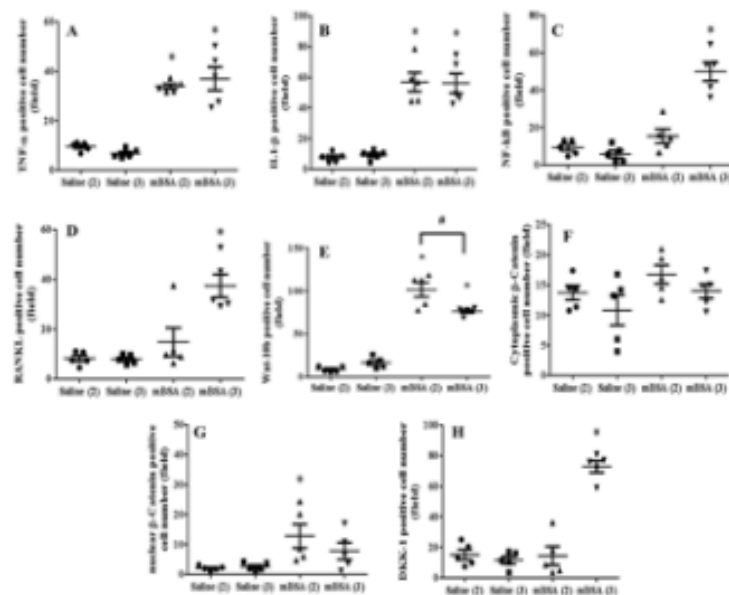
TNF- α and IL-1 β are present in inflammation of the synovial membrane, and, considering their involvement of cytokines in the RA pathogenesis, novel therapeutic approaches have been used for RA management [26–28]. The administration of TNF- α inhibitors is a well-established therapeutic approach for RA in other joints [29]. Food and Drug Administration (FDA) approved the use of an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) for RA treatment [30, 31]. An increase of IL-1 β expression in the synovial membrane was observed in the *pannus* area of the animals that received 2 or 3 injections of mBSA. Mononuclear cells from the inflammatory *pannus*, spontaneously produce IL-1 β [32]

and this cytokine plays an important role in the recruitment of inflammatory cells to the joint [28].

TNF- α has a direct contribution to synovial inflammation and tissue degradation. High levels of TNF- α have been found in the RA joints. This can lead to an increase in adhesion molecules expression, chemokine production, angiogenesis and nociceptors activation [32]. Thus, TNF- α induces the osteoclastogenesis and contributes to the inhibition of osteoblastic differentiation [33]. In our study, TNF- α expression was significantly higher in the synovial membrane of the arthritic groups.

Classical pro-inflammatory cytokines, TNF- α and IL-1 β , play an important role in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases, and stimulate the canonical NF- κ B pathway. Studies have shown that NF- κ B activation promotes

Fig. 5 Quantitative analysis of immunopositive cells in synovial membrane for TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, RANKL, Wnt-10b, β -catenin (cytoplasmic and nuclear) and DKK-1, after mBSA booster injections in TMJ. The rats were treated with saline (right TMJ) or 2 and 3 mBSA injections (left TMJ). Count of immunopositive cells for TNF- α (a), IL-1 β (b), NF- κ B (c), RANKL (d), Wnt-10b (e), cytoplasmic β -catenin (f), nuclear β -catenin (g) and DKK-1 (h) in synovial membrane was performed. Results are expressed as the mean \pm SEM of at least 5 animals per group. * $p < 0.05$ saline versus mBSA groups, # $p < 0.05$ mBSA (2) versus mBSA (3) group (one-way ANOVA and Tukey's test)



synovial hyperplasia, stimulating the proliferation and inhibiting the apoptosis of fibroblast-like synoviocytes [16, 17]. The NF- κ B pathway results in the synthesis of pro-inflammatory mediators, causing synovitis accompanied by morphological alterations of the synovial membrane, such as infiltration of mononuclear cells and edema [18]. Although, both RA-induced groups showed increased expression of TNF- α and IL-1 β , only the mBSA (3) group showed high expression of NF- κ B in the synovial membrane. Lawrence demonstrated that the activation of NF- κ B pathway is due to the increased expression of those cytokines, leading to the transcription of target genes of pro-inflammatory mediators [34]. These factors can increase inflammatory response, synovial hyperplasia and articular destruction, as found in this arthritic group.

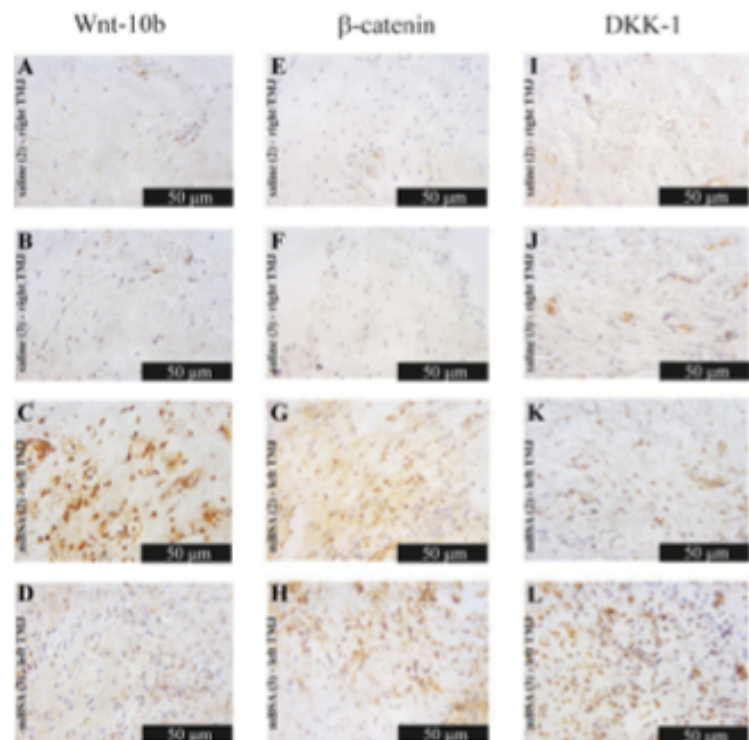
Studies also have demonstrated that NF- κ B pathway is activated by RANKL [35, 36]. It was shown that the RANKL expression is increased in the synovium of RA patients [37]. Although the authors relate the expression of RANKL more frequently to osteocytes and osteoblasts, it is also present in synovial cells, activated T cells, B cells, and natural killer cells [37, 38]. The abundance of monocytic cells in the synovial membrane, which respond to RANKL, enhances the formation of osteoclasts. The mBSA (3) group

showed an increased immunoeexpression of RANKL in the synovium, which can be related to NF- κ B activation.

Wnt proteins have a central role in a variety of developmental processes and events, which include organogenesis, morphogenesis, cell differentiation and tissue remodeling [39], and are expressly activated in the synovial tissues of patients with RA [12, 40]. Wnt proteins participate in joint development (Wnt 4, 5 and 14) and chondrogenesis inhibition (Wnt 7a) [12]. Studies suggest that Wnt-10b increases angiogenesis and cell-growth regulation, but its behavior in TMJ arthritis was not yet elucidated. Studies have shown the presence of inflammatory cell aggregates in the synoviocytes layer and these cells have been involved in RA pathogenesis [41, 42]. Our data showed an increased immunolabeling for Wnt-10b in the synovial membrane, suggesting a specific activation of the Wnt pathway in the TMJ synovium of arthritic rats.

In RA patients, Wnt-10b and β -catenin were noticed in fibroblasts, endothelial and synovial lining cells [12]. This could lead to an increased production of cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases (MMP), stimulating inflammation, synovial hyperplasia and cartilage erosion [12, 43, 44]. β -Catenin is the key mediator of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. In an inactivated stage, the

Fig. 6 Photomicrographs of immunopositive cells in synovial membrane for Wnt-10b, β -catenin and DKK-1. Immunopositive cells in synovial membrane for Wnt-10b of Saline (2) (a), Saline (3) (b), mBSA (2) (c), mBSA (3) (d). Immunopositive cells in synovial membrane for β -catenin of Saline (2) (e), Saline (3) (f), mBSA (2) (g) and mBSA (3) (h). Immunopositive cells in synovial membrane for DKK-1 of Saline (2) (i), Saline (3) (j), mBSA (2) (k) and mBSA (3) (l) groups



β -catenin levels are low in the cytoplasm, while in an activated stage, it accumulates in the cytoplasm. The cytoplasmic β -catenin excess translocates into the nucleus, regulating target genes responsible for cell activation and proliferation [40]. Our results showed a lower expression of Wnt-10b and nuclear β -catenin in mBSA (3) group, when compared to mBSA (2). This fact corroborates with other studies that suggest that Wnt-10b expression may be increased in synovium in parallel with the decreased inflammatory infiltrate [45, 46].

The Dickkopf (DKK) family is an endogenous Wnt signaling inhibitor which blocks its signaling by binding to low-density lipoprotein receptor protein (LRP) homologues [47]. Studies have shown that DKK1 is secreted by the synovium in response to inflammation and its immunoeexpression is inversely correlated with the radiographic disease severity in arthritic joints [4, 48]. Our results showed an increased labeling of DKK1 in the mBSA (3) group. This can be related to the decreased Wnt-10b and nuclear β -catenin expression in the mBSA (3) group, as a negative feedback for Wnt-10b synthesis. Studies have shown that canonical Wnt signaling leads to DKK1 production as a negative feedback through the activation of β -catenin/TCF transcription complex [49, 50]. Thus, DKK1 is involved in the remodeling and repairing

processes of the articular bone in human systemic rheumatic diseases such as RA [4]. These results can indicate a possible mechanism of joint repair in the TMJ. The interaction among the mediators of the canonical Wnt signaling pathway must be further investigated.

Wnt signaling pathway can regulate some target genes of NF- κ B and positive and negative cross-regulations have been observed [51, 52]. Another possible relation is that NF- κ B activation could inhibit the nuclear translocation of β -catenin by interfering with the formation of the transcriptional complex β -catenin/TCF [52]. In the mBSA (3) group, a reduction of nuclear β -catenin occurs, and this leads us to question why cytoplasmic β -catenin does not translocate to the nucleus. This fact may be related to the increase of NF- κ B immunoeexpression in this group. Also, the components of the canonical Wnt signaling pathway can also modulate immune and inflammatory response by the interaction with NF- κ B [52, 53]. The activation of both pathways in chondrocytes could synergistically upregulate the lymphoid enhancer-binding factor-1 (Lef1) expression by a complex formation that could lead to cartilage destruction [54], alterations only seen in mBSA (3) group.

Our results suggest the participation of the canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways during the development of

TMJ arthritis in rats. The greater expression of DKK1 in the mBSA (3) group may be a result of negative feedback in the canonical Wnt signaling. A longer follow-up of the progression of TMJ RA experimental model and the investigation of canonical Wnt and NF- κ B blockers would be helpful to better understand the participation of these signaling pathways in the chronification of this disease. Thereby, further investigation of these interactions must be studied.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Howard Lopes Ribeiro Júnior, Flávia de Araújo Silva and Adalberto Nascimento de Lima Júnior. This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

References

- Cunha CO, Pinto LMS, Mendonça LM, Saldanha ADD, Conti ACCF, Conti PCR. Bilateral asymptomatic fibrous-ankylosis of the temporomandibular joint associated with rheumatoid arthritis: a case report. *Braz Dent J*. 2012;23:77982. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402012000600025>.
- Sodhi A, Naik S, Pai A, Anuradha A. Rheumatoid arthritis affecting temporomandibular joint. *Contemp Clin Dent*. 2015;6:124–7. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.149308>.
- Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:229. <https://doi.org/10.1186/ar2669>.
- Miao CG, Yang YY, He X, Li XF, Huang C, Huang Y, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal*. 2013;25:2069–78. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.002>.
- Ruparelia PB, Shah DS, Ruparelia K, Sutaria SP, Pathak D. Bilateral TMJ involvement in rheumatoid arthritis. *Case Rep Dent*. 2014;2014:262430. <https://doi.org/10.1155/2014/262430>.
- Ahmed N, Catrina AI, Alyamani AO, Mustafa H, Alstergren P. Deficient cytokine control modulates temporomandibular joint pain in rheumatoid arthritis. *Eur J Oral Sci*. 2015;123:235–41. <https://doi.org/10.1111/eos.12193>.
- Ke J, Long X, Liu Y, Zhang YF, Li J, Fang W, Meng QG. Role of NF- κ B, in TNF- α induced COX-2 expression in synovial fibroblasts from human TMJ. *J Dent Res*. 2007;86:363–7. <https://doi.org/10.1177/154405910708600412>.
- Quinteiro MS, Napimoga MH, Macedo CG, Freitas FF, Abdalla HB, Bonfante R, Trindade-Clemente Napimoga J. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.002>.
- Chandrupatla DMSH, Weijers K, Gent YYJ, Greeuw I, Lammermsma AA, Jansen G, Laken CJ, Molthoff CFM. Sustained macrophage infiltration upon multiple intra-articular injections: an improved rat model of rheumatoid arthritis for PET guided therapy evaluation. *Biomed Res Int*. 2015;2015:509295. <https://doi.org/10.1155/2015/509295>.
- Bonfante R, Napimoga MH, Macedo CG, Abdalla HB, Pieroni V, Clemente Napimoga JT. The P2X7 receptor, cathepsin S and fractalkine in the trigeminal subnucleus caudalis signal persistent hypernociception in temporomandibular rat joints. *Neuroscience*. 2018;391:120–30. <https://doi.org/10.1016/j.neurosci.2018.09.005>.
- Elsaid KA, Jay GD, Chichester CO. Reduced expression and proteolytic susceptibility of lubricin/superficial zone protein may explain early elevation in the coefficient of friction in the joints of rats with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:108–16. <https://doi.org/10.1002/art.22321>.
- Imai K, Morikawa M, D'Armiento J, Matsumoto H, Komiya K, Okada Y. Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345:1615–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.075>.
- Gatica-Andrades M, Vagenas D, Kling J, Nguyen TTK, Benham H, Thomas R, Körner H, Venkatesh B, Cohen J, Blumenthal A. WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. *Blood Adv*. 2017;1:1274–86. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017006163>.
- Humphries AC, Mlodzik M. From instruction to output: Wnt/PCP signalling in development and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;51:110–6. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2017.12.005>.
- Sen M. Wnt signaling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2005;44:708–13. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh553>.
- Liu YR, Yan X, Yu HX, Yao Y, Wang JQ, Li XF, Chen RN, Xu QQ, Ma TT, Huang C, Li J. NLRC5 promotes cell proliferation via regulating the NF- κ B signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Mol Immunol*. 2017;91:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.08.024>.
- Xia ZB, Meng FR, Fang YX, Wu X, Zhang CW, Liu Y, Liu D, Li GQ, Feng FB, Qiu HY. Inhibition of NF- κ B signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis. *Medicine*. 2018;97:e10920. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000010920>.
- Rigoglou S, Papavassiliou AG. The NF- κ B signaling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45:2580–4. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.018>.
- Chandrakesan P, Jakkula LU, Ahmed I, Roy B, Anant S, Umar S. Differential effects of β -catenin and NF- κ B interplay in the regulation of cell proliferation, inflammation and tumorigenesis in response to bacterial infection. *PLoS One*. 2013;8:e79432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079432>.
- Lora VRMM, Clemente-Napimoga JT, Abdalla HB, Macedo CG, Canales GT, Barbosa CMR. Botulinum toxin type A reduces inflammatory hypernociception induced by arthritis in the temporomandibular joint of rats. *Toxicol*. 2017;129:52–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.02.010>.
- Gondim DV, Costa JL, Rocha SS, Brito GA, Ribeiro RA, Vale ML. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90:395–405. <https://doi.org/10.1139/y2012-003>.
- Chaves HV, do Val DR, Ribeiro KA, Lemos JC, Souza RB, Gomes FIF, da Cunha RMS, de Paulo Teixeira Pinto V, Filho GC, de Souza MHL, Bezerra MM, de Castro Brito GA. Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K^+ channels. *Inflamm Res*. 2018;67:407–22. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1133-z>.
- Liu YD, Liao LF, Zhang HY, Lu L, Jiao K, Zhang M, Wang MQ. Reducing dietary loading decreases mouse temporomandibular joint degeneration induced by anterior crossbite prosthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22:302–12. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.11.014>.
- Oliveira MC, Tavares LP, Vago JP, Batista NT, Queiroz-Junior CM, Vieira AT, Ferreira AVM. Tumour Necrosis Factor, but not neutrophils, alters the metabolic profile in acute experimental

- arthritis. *Plos One*. 2016;11:e0146403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146403>.
25. Farinon M, Lora PS, Francescato LN, Bassani VL, Henriques AT, Xavier RM, De Oliveira PG. Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) in Antigen-Induced Arthritis. *Open Rheumatol J*. 2013;7:129–33. <https://doi.org/10.2174/1874312901307010129>.
 26. Westacott CI, Witcher JT, Barnes IC, Thompson D, Swan AJ, Dieppe PA. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 1990;49:676–81. <https://doi.org/10.1136/ard.49.9.676>.
 27. Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1993;52:870–5. <https://doi.org/10.1136/ard.52.12.870>.
 28. Towle CE, Hung HH, Bonassar LJ, Treadwell BV. Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997;5:293–300. [https://doi.org/10.1016/s1063-4584\(97\)80008-8](https://doi.org/10.1016/s1063-4584(97)80008-8).
 29. Passio A, Adami G, Gatti D, Orsolini G, Giollo A, Idolazzi L, Benini C, Vantaggiato E, Rossini M, Viapiana O. Inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with early rheumatoid arthritis results in acute changes of bone modulators. *Int Immunopharmacol*. 2019;67:487–9. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.050>.
 30. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. Biologics: target-specific treatment of systemic and cutaneous autoimmune diseases. *Indian J Dermatol*. 2009;54:100–9. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.53175>.
 31. Gertel S, Mahagna H, Karmon G, Watad A, Amital H. Tofacitinib attenuates arthritis manifestations and reduces the pathogenic CD4⁺ T cells in adjuvant arthritis rat. *Clin Immunol*. 2017;184:77–81. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.04.015>.
 32. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis—shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:63–8. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.171>.
 33. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*. 1986;319:516–8. <https://doi.org/10.1038/319516a0>.
 34. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
 35. Kim HJ, Park C, Kim GY, Park EK, Jeon YJ, Kim S, Hwang HJ, Choi YH. Sargassum serratifolium attenuates RANKL-induced osteoclast differentiation and oxidative stress through inhibition of NF- κ B and activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Biosci Trends*. 2018;12(3):257–65. <https://doi.org/10.5582/bst.2018.01107>.
 36. Kim JM, Lee JH, Lee GS, Noh EM, Song HK, Gu DR, Kim SC, Lee SH, Kwon KB, Lee YR. Sophorae Flos extract inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation by suppressing the NF- κ B/NFATc1 pathway in mouse bone marrow cells. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):164. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1550-x>.
 37. Lee EJ, So MW, Hong S, Kim YG, Yoo B, Lee CK. Interleukin-33 acts as a transcriptional repressor and extracellular cytokine in fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2016;77:35–43. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.005>.
 38. Boman A, Kokkonen H, Arlestig L, Berglin E, Rantapää-Dahlqvist S. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) but not sclerostin or gene polymorphisms is related to joint destruction in early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017;2017(36):1005–12. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3570-4>.
 39. Rabelo PS, da Mota LM, Lima RA, Lima FA, Barra GB, de Carvalho JF, Amato AA. The Wnt signaling pathway and rheumatoid arthritis. *Autoim Rev*. 2019;9:207–10. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.08.003>.
 40. Xiao CY, Pan YF, Guo XH, Wu YQ, Gu JR, Cai DZ. Expression of β -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Rheumatol*. 2011;2011(40):26–33. <https://doi.org/10.3109/03009742.2010.486767>.
 41. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001;344:907–16. <https://doi.org/10.1056/NEJM20010323441207>.
 42. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;2003(423):356–61. <https://doi.org/10.1038/nature01661>.
 43. Van der Bosh MH, Blom AB, Sloetjes AW, Koenders MI, van de Loo FA, van den Berg WB, van Lent PL, van der Kraam PM. Induction of canonical Wnt signaling by synovial overexpression of selected Wnts leads to protease activity and early osteoarthritis-like cartilage damage. *Am J Pathol*. 2015;185(7):1970–80. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.013>.
 44. Van der Bosh MH, Blom AB, van de Loo FA, Koenders MI, Lafeber FP, van den Berg WB, van der Kraam PM, van Lent PL. Synovial Wnt signaling induces the expression of MMPs and is associated with disease progression in early symptomatic osteoarthritis patients. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(10):1978–83. <https://doi.org/10.1002/art.40206>.
 45. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RA. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991;34:1125–32. <https://doi.org/10.1002/art.1780340908>.
 46. Kraan MC, Patel DD, Haringman JJ, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, Breedveld FC, Tak PP. The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). *Arthritis Res*. 2002;3(1):65–71. <https://doi.org/10.1186/ar141>.
 47. Malysheva K, Rooji K, Lowik CWGM, Baten DL, Rose-John S, Stoika R, Korchynski O. Interleukin6/Wnt interactions in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblast. *Croat Med J*. 2016;57(2):89–98. <https://doi.org/10.3325/cmj.2016.57.89>.
 48. Honsawek S, Tanavelee A, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Saetan N, Tantavisut S. Dickkopf-1 (DKK-1) in plasma and synovial fluid is inversely correlated with radiographic severity of knee osteoarthritis patients. *BMC Musculoskel Dis*. 2010;11:257. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-257>.
 49. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the β -catenin/TCF pathway. *Oncogene*. 2004;23:8520–6. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207892>.
 50. Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of β -catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J*. 2005;24(1):73–84. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600460>.
 51. Ma B, Fey M, Hottiger MO. Wnt/ β -catenin signaling inhibits CBP-mediated RelA acetylation and expression. Of proinflammatory NF- κ B target genes. *J Cell Sci*. 2015;128:2430–6. <https://doi.org/10.1242/jcs.168542>.

52. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00378>.
53. Nejak-Bowen K, Kikuchi A, Monga SP. Beta-catenin-NF- κ B interactions in murine hepatocytes: a complex to die for. *Hepatology.* 2013;57:763–74. <https://doi.org/10.1002/hep.26042>.
54. Yun K, Choi YD, Nam JH, Park Z, Im SH. NF- κ B regulates *Lef1* gene expression in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357:589–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.170>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

