



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ABATACEPT NO REPARO DE
ÚLCERAS TRAUMÁTICAS EM MUCOSA JUGAL DE RATOS

KARINE CESTARO MESQUITA

FORTALEZA

2018

KARINE CESTARO MESQUITA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ABATACEPT NO REPARO DE
ÚLCERAS TRAUMÁTICAS EM MUCOSA JUGAL DE RATOS**

Projeto de pesquisa a ser apresentado ao
Programa de Pós-graduação em
Odontologia da Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem da
Universidade Federal do Ceará. Área de
concentração: Clínica Odontológica
Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa

FORTALEZA

2018

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

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

M544 Mesquita, Karine Cestaro.
INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ABATACEPT NO REPARO DE ÚLCERAS
TRAUMÁTICAS EM MUCOSA JUGAL DE RATOS / Karine Cestaro Mesquita. – 2018.
55 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa.

1. Abatacept. 2. Cicatrização de feridas. 3. Úlcera oral. 4. Linfócito T. I. Título.

CDD 617.6

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais **Bosco e Luceli**, e meu irmão **Matheus**, pelo apoio e amor incondicional, sendo sempre exemplos de força, persistência e dedicação, obrigada também pela paciência e torcida, amo muito vocês.

Ao meu noivo **João Paulo**, por me incentivar a sempre buscar meus objetivos de forma determinada, ser um grande exemplo de dedicação e comprometimento e por ser um porto seguro sempre que necessário.

Aos professores **Fabício Bitu Souza**, meu orientador, por todo o crescimento profissional e pessoal que me foi permitido durante o período da graduação e pós graduação, por todas as oportunidades concedidas, mas principalmente, pela confiança depositada, a qual tento ao máximo honrar desde a época de graduação, **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, exemplo de comprometimento, esforço e dedicação em todas as suas atividades, agradeço imensamente pela atenção, cuidado, conselhos e conhecimentos compartilhados durante todo esse período, a senhora é um grande exemplo de profissional e pessoa, e **Mário Rogério Lima Mota**, muito obrigada principalmente pela paciência e orientações, por sempre nos incentivar, através de seu conhecimento, a nos aperfeiçoar e não parar a busca pelo conhecimento. Considero-os meus maiores exemplos de trabalho, conhecimento e companheirismo.

Aos técnicos do laboratório de patologia e de pós-graduação da UFC, **Alceu Machado**, pela imensa contribuição na parte laboratorial da pesquisa, e **Davi Queiroz**, que participaram em diversas etapas de minha pesquisa, orientando com relação aos equipamentos e técnicas, colaborando ativamente com a parte laboratorial.

A todos os demais **funcionários da UFC**, em especial a **Sônia Loiola**, *in memoriam*, que partiu esse ano, mas sempre foi um anjo na vida de todos os que a conheciam, nos ensinando a amar ao próximo e a viver sempre com intensa alegria.

À equipe do **biotério do departamento de farmacologia e fisiologia da UFC**, a veterinária responsável **Gabriela** e os funcionários **Adalto e Moreira**, que durante a fase experimental foram de extrema colaboração para a realização da pesquisa.

À **equipe da pulsoterapia do Hospital Universitário Walter Cantídio**, em especial à **Daniele**, que contribuíram ativamente para a realização da pesquisa, sem essa colaboração a pesquisa não seria viável, obrigada também por serem sempre solícitos e amigos.

Aos meus grandes amigos **Bárbara, Sara, Larissa, Denise, Camila**, pela compreensão durante as ausências necessárias, em especial **Diana e Nara**, com as quais almejei iniciar a vida acadêmica, obrigada por toda a torcida e incentivo e por sempre se fazerem presentes.

A todos os meus amigos do Laboratório de Patologia Bucodental **Sthefane, Ronildo, Ealber, Diego, Gabriela, Erasmo, Thales, Thaís**, por termos compartilhado juntos esses dois anos de rotina intensa e conhecimento, em especial **Ernando e Camila**, pelas orientações e ajuda durante todo o período experimental, incluindo períodos de recessos e feriados, **Thinali, Isabelly e Elisa** pela amizade sincera, conhecimentos e experiências divididas, por todo o cuidado dispendido durante todos os momentos, sou muito grata a vocês pelo suporte sempre presente e o carinho que sempre me trataram, e **Paulo Goberlânio**, obrigada pela confiança em mim depositada, pela imensurável ajuda durante todos os momentos do mestrado e, principalmente, pela amizade e infinita paciência. A todos muito obrigada, graças a vocês os dias foram mais leves e o aprendizado possível.

Aos alunos de iniciação científica que contribuíram ativamente nas pesquisas e trabalhos no decorrer do mestrado, em especial aos alunos **Imaculada, Mariana Dantas, Francisco Denis, Juliana e Lucas** e a ex-aluna **Lyria**, os quais me ensinaram e me ajudaram imensamente durante todo o curso do mestrado.

Agradeço principalmente a Deus, pois graças a Ele que tudo foi possível, as oportunidades foram criadas, os problemas superados e as melhores pessoas foram colocadas em meu caminho. O Senhor tornou tudo possível. Obrigada.

Resumo

O Abatacept regula a ativação dos Linfócitos T (LT) e modula a liberação de citocinas, podendo interferir no mecanismo de cicatrização. O presente trabalho visou avaliar o processo cicatricial de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar em tratamento com Abatacept. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, sendo um controle tratado com solução salina subcutânea, e três grupos tratados com Abatacept por administração subcutânea nas doses 3,2 (ABA 3,2), 8 (ABA 8) e 20 (ABA 20) mg/kg/semana. A administração de solução salina e abatacept foi iniciada 14 dias antes da confecção da úlcera e continuada até o final a eutanásia, realizada nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 após a indução da úlcera. As úlceras orais foram induzidas na mucosa jugal direita com punch dermatológico de 8mm de diâmetro e 2mm de profundidade. Mensurou-se o diâmetro da úlcera, variação ponderal e foram confeccionadas lâminas para análise histopatológicas (escores) e histomorfométrica (contagem de polimorfonucleares, mononucleares, vasos e fibroblastos/miofibroblastos). Foi realizada coloração de Picrosirius Red para análise da colagênese e imuno-histoquímica para óxido nítrico sintase induzida (iNOS), Interleucina(IL)-1beta(1 β), -6, -10, CD8 e CD30. O experimento foi repetido para realização de ensaio de permeabilidade vascular e hemograma. ANOVA-1-way e -2-way/Bonferroni e Kruskal-Wallis/Dunn foram utilizados para análise estatística (GraphPad Prism 5.0®, $p < 0,05$). O tratamento com Abatacept reduziu o diâmetro da úlcera ($p < 0,001$), o número de polimorfonucleares ($p < 0,001$) e mononucleares ($p = 0,027$), a relação CD8⁺/CD30⁺ ($p < 0,001$) e a permeabilidade vascular ($p < 0,001$), e aumentou a colagênese ($p < 0,001$) e a expressão de IL-10 ($p = 0,016$) no início do protocolo. Porém, na maior dose (ABA 20) houve retardo do reparo ($p < 0,001$) do número de vasos ($p = 0,017$), redução de fibroblastos/miofibroblastos ($p < 0,001$), além de prolongamento da expressão de iNOS ($p = 0,026$), IL-1 β ($p = 0,007$) e IL-6 ($p < 0,001$). Conclui-se que o abatacept acelera a cicatrização de úlceras orais através de redução da migração de células inflamatórias, mas a sobredose leva ao retardo do reparo e prolongamento da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Palavras Chave (DeCS): Abatacept; Úlcera Oral; Linfócitos T; Cicatrização de feridas.

Abstract

Abatacept is known for the regulation of T cell activation and modulation of inflammatory cytokines, and due to this to mechanisms it may interfere on wound healing. The aim of this study was to evaluate the ulcer's healing process on buccal mucosa of male Wistar rats administered with Abatacept subcutaneously. The rats were randomized between a control group, injected with saline subcutaneously, and other three study groups, administered with Abatacept subcutaneously in the doses of 3.2 (ABA 3.2), 8 (ABA 8) and 20 mg/kg/week (ABA 20). The administration of saline and Abatacept was performed 14 days before oral ulcer induction and continued until euthanasia, performed on days 1, 3, 7, 14 and 21 after the ulcer induction. Oral ulcers of 8 mm diameter and 2 mm deep were induced on the left buccal mucosa. Ulcer diameter, body mass variation, Picrosirius red, immunohistochemistry for iNOS, interleukin (IL) 1 beta, IL 6, IL 10, CD8 and CD30, vascular permeability and blood count were recorded. Histological slides were performed for histopathological (scores) and histomorphometric analysis, such as: polymorphonuclear, mononuclear, angiogenesis and fibroplasia. ANOVA-1-way and -2-way/Bonferroni and Kruskal-Wallis/Dunn were used in the statistical analysis (GraphPad Prism 5.0®, $p < 0.05$). Abatacept administration decreased ulcer diameter ($p < 0.001$), polymorphonuclear ($p < 0.001$) and mononuclear count ($p = 0.027$), CD8⁺/CD30⁺ relation ($p < 0.001$) and vascular permeability ($p < 0.001$). However, the collagenesis ($p < 0.001$) and IL-10 expression levels ($p = 0.016$) increased on days 3 and 7. In the ABA 20 group, the over Abatacept doses were related to late wound healing ($p < 0.001$), reduced angiogenesis ($p = 0.017$) and extended period of high levels of iNOS ($p = 0.026$), IL 1 beta ($p = 0.007$) and IL 6 ($p < 0.001$). This study demonstrated that Abatacept accelerates ulcer healing on the buccal mucosa of male Wistar rats due to the reduced migration of inflammatory cells, meanwhile, higher doses were associated with delayed repair and extended expression of proinflammatory cytokines.

Keywords (MeSh): Abatacept; CTLA4 Ig; Oral Ulcer; T-Lymphocytes; Wound healing.

Lista de ABREVIATURAS e SIGLAS

ABA- Abatacept

APCs- Células Apresentadoras de Antígenos

AR- artrite reumatoide

CEUA- Comissão Ética no Uso de Animais

CTLA-4 – antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

DAB -3,3-diamino-benzidina

EPM- Erro padrão da média

ICAM1- Molécula de adesão celular 1

IgE- Imunoglobulina E

IgG1- Imunoglobulina G1

IL- Interleucina

INF- Interferon

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

IV- Via intravenosa

LT – Linfócitos T

LTCD4- Linfócitos T CD4

LTCD8- Linfócitos T CD8

MCP-1 - Proteínas quimioatraentes de monócitos-1

MHC- Molécula principal de histocompatibilidade

NF- κ B - Fator Nuclear kappa B

NK - Células Natural Killer

SC- Subcutânea

TCR- Receptor de células T

Th- Linfócitos T helper

TMA - Tissue microarray

TNF- Fator de necrose tumoral

Treg- Linfócitos T reguladores

VCAM-1 - Molécula de adesão celular-vascular 1

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Cicatrização de úlceras mucosas	10
1.2 Linfócitos T e cicatrização de feridas	10
1.3 Abatacept.....	13
2. PROPOSIÇÃO	16
2.1.1 Objetivo geral	16
2.1.2 Objetivos específicos.....	16
3. HIPÓTESE	17
4. CAPÍTULOS	18
4.1. Capítulo 1: Influence of treatment with abatacept on the repair of traumatic ulcers in the jugal mucosa of rats	19
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Materiais e Métodos	22
Resultados.....	27
Discussão.....	42
Conclusão.....	45
Referências.....	45
5.CONCLUSÃO GERAL.....	49
6. REFERÊNCIAS	50
Anexo A – Seguimento do Regimento Interno	53
Anexo B- Aprovação do comitê de ética em pesquisa animal.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cicatrização de úlceras mucosas

Úlceras orais, lesões em região do epitélio com exposição de tecido conjuntivo, podem surgir devido a traumas mecânicos, doenças autoimunes, neoplasias, infecções infecciosas, deficiências nutricionais ou reações ao uso de drogas (COMPILATO *et al.*, 2009), consistindo, portanto, em frequente achado na prática clínica odontológica.

O processo de cicatrização, de forma geral, é caracterizado pelo início do processo inflamatório, neoformação tecidual e remodelação (HART, 2002) em região mucosa ou cutânea.

A lesão tecidual causa envolvimento de vasos sanguíneos, ativação plaquetária com formação do tampão primário, ativação da cascata de coagulação e formação de fibrina (HART, 2002). Simultaneamente, macrófagos e mastócitos residentes liberam aminas vasoativas (histamina e serotonina), resultando no aumento da permeabilidade vascular, caracterizada pela saída de transudatos (eletrólitos e pequenas moléculas), exudatos (albumina e fibrinogênio), além da liberação de citocinas inflamatórias, como Interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e quimiocinas, principalmente IL-8, que atrai neutrófilos, os primeiros leucócitos a migrar em 24 horas (HART, 2002; GLIM *et al.*, 2013).

Posteriormente, entre 48 e 96 horas, os neutrófilos passam a ser amplamente substituídos por macrófagos, envolvidos no processo de debridamento da ferida, atividade antimicrobiana, quimiotaxia, ativação de células inflamatórias por liberação de citocinas (IL-1 β , TNF- α) (GLIM *et al.*, 2013) e angiogênese, estimulando a síntese e remodelamento da matriz com importante papel na orquestração da formação de novos tecidos em locais de lesão (HART 2002; ABBAS *et al.*, 2010; GLIM *et al.*, 2013).

O recrutamento de linfócitos T (LT) é realizado posteriormente ao de neutrófilos e monócitos/macrófagos através de proteínas quimioatraentes de monócitos-1 (MCP-1), que também recrutam monócitos e células Natural Killer (NK) (ABBAS *et al.*, 2010; GLIM *et al.*, 2013). Os Linfócitos T são recrutados por volta do terceiro e quinto dia, atingindo sua máxima concentração entre o quinto e sétimo dia (a depender de LTCD4 ou LTCD8, respectivamente), e apresentam importante papel no processo de reparo, pois são responsáveis pela produção de fatores de crescimento e reguladores (FISHEL *et al.*,

1987; AGAIBY e DYSON, 1999; HART, 2002; KEEN, 2008), relacionando-os com a velocidade de cicatrização e com o aparecimento de queloides na pele (DAVIS *et al.*, 2001; KEEN, 2008; GLIM *et al.*, 2013). Linfócitos T $\gamma\delta$ tiveram importância comprovada no processo de cicatrização de feridas cutâneas (WORKALEMAHU *et al.*, 2003), porém, na mucosa oral, essas células são encontradas em pequena quantidade (DUTZAN *et al.*, 2016). Na região de mucosa oral aproximadamente 50% dos linfócitos são os TCD4, dos quais cerca de 10 a 15% são constituídos de linfócitos T reguladores (Treg) (DUTZAN *et al.*, 2016), também relacionados com o processo cicatricial. As células Treg foram relacionadas com a cicatrização devido ao seu papel na produção de interleucina-10 e expressão de receptores do fator de crescimento epidermal observado após lesão cutânea (NOSBAUM *et al.*, 2016). Também foi observado em pacientes com baixas concentrações de Treg um maior surgimento de lesões de estomatite aftosa recorrente (LEWKOWICZ *et al.*, 2008).

1.2 Linfócitos T e cicatrização de feridas

Linfócitos T, células relacionadas com o processo de cicatrização de feridas cutâneas e mucosas, são originadas a partir de células tronco pluripotentes localizadas na região da medula óssea, e sofrem o processo de maturação e ativação no timo (LUCKHEERAM *et al.*, 2012). Durante a fase de LT imaturo, 95% dos linfócitos são formados por cadeias α e β e darão origem aos correceptores CD4 e CD8, e os demais são compostos por cadeias γ e δ , cujo processo de ativação não foi ainda completamente esclarecido (STUTMAN, 1978; SOUZA, 2010).

Os LTs CD4⁺, após saída do timo, são também chamados de LT naive ou T helper 0 (Th0). A depender das citocinas presentes na região essas células poderão se diferenciar em diversos subtipos, os principais são: Th 1, Th 2, Th 17 ou Treg induzido. As células Th1 e Th17 contribuem para o surgimento de doenças inflamatórias específicas nos órgãos (LUCKHEERAM *et al.*, 2012).

A resposta Th1 é responsável pelo controle de patógenos intracelulares, estando também relacionado, juntamente com o Th17, à patogênese de doenças reumáticas. A expressão de LTh1 decorre da produção de grandes quantidades de IL-2, citocina relacionada com a proliferação de LT CD4⁺ e LT CD8⁺, bem como o aumento da citotoxicidade de LTCD8⁺. O LTh1 produz Interferón-gama (INF- γ) que ativa macrófagos

infectados com patógenos intracelulares (micobactérias, protozoários e fungos), também estando relacionado com a ativação dos LT CD8⁺ e com a retroalimentação positiva da via, causando a inibição da ativação do Th2 (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2010; LUCKHEERAM *et al.*, 2012).

A resposta Th2 apresenta importante papel na geração de resposta a infecções por helmintos e doenças alérgicas. As principais citocinas relacionadas são IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. A IL-4 é responsável pela diferenciação de células B em plasmócitos secretores de Imunoglobulina E (IgE), com consequente supressão da produção de LTh1, (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2010; LUCKHEERAM *et al.*, 2012).

Os LTh 17 estão intimamente associados com o aumento da inflamação, devido ao recrutamento de neutrófilos, apresentando, portanto, importante papel em alterações inflamatórias mediadas por células. Sua superexpressão está relacionada com o surgimento de doenças autoimunes, e sua ativação com o aumento das citocinas IL-22, IL-26, e as citocinas da família da IL-17, as quais são relacionadas com a indução da inflamação. (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2010; LUCKHEERAM *et al.*, 2012). Os LTreg (linfócitos T reguladores), por sua vez, apresentam como principal função a liberação de citocinas que regulam o sistema imunológico reduzindo as respostas autoimunes (SAKAGUSHI *et al.*, 1995).

A diferenciação do LTh0 ocorrerá através de citocinas que são liberadas após a realização de ligações primárias e secundárias entre Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) e LTs naïve presentes nos órgãos linfóides. Ligações primárias são realizadas entre a molécula principal de histocompatibilidade (MHC), presente nas APCs, e o receptor de células T (TCR), presente nos LTs. Ligações secundárias são realizadas através de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 e CD86), presente nas APCs, e CD28, presente nos LTs (Figura 1). As citocinas liberadas atuam como fatores de crescimento e/ou diferenciação de linfócitos, passando a ter atividade efetora da imunidade inata (LINSLEY *et al.*, 1991; GEMMELL *et al.*, 2001; PAWLAK *et al.*, 2005; MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010).

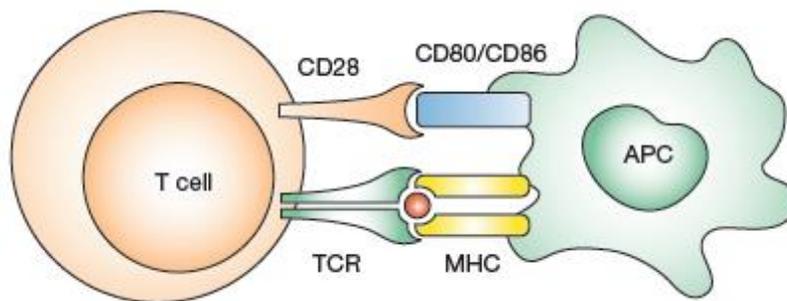


Figura 1: Ativação de LT CD4⁺ naive após ligação primária e secundária com APCs.

Fonte: RUDERMAN *and* POPE, 2006.

Regulação negativa dessa ativação é feita pelo antígeno 4 associado com LT Citotóxico (CTLA-4), também conhecido como CD152, que consiste em uma molécula homóloga do CD28, resultando na redução da proliferação celular e da produção de citocinas. O receptor CTLA4 apresenta maior afinidade de ligação com os receptores B7, porém, é expresso nos estágios finais de ativação dos LTs, diferentemente do CD28, expresso em LT ainda em repouso (Figura 2) (LINSLEY *et al.*, 1991; FREEMAN *et al.*, 1992; LINSLEY *et al.*, 1996; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013). Nas células Treg, entretanto, o receptor CTLA-4 é constitutivo devido ao importante papel imunomodulador dessas células (TAKAHASHI *et al.*, 2000; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013).

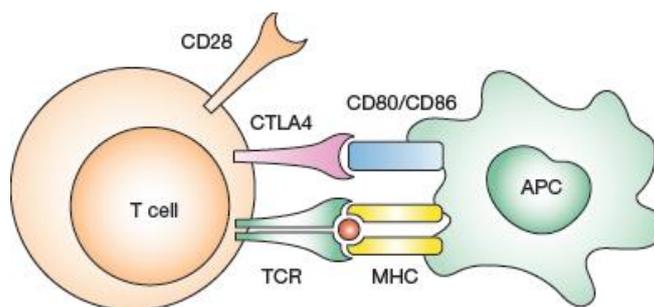


Figura 2: Controle negativo da ativação de LTCD4⁺ realizado por ligação da molécula de CTLA-4 aos receptores B7 (CD80/86) de APCs.

Fonte: RUDERMAN *and* POPE, 2006.

Linfócitos T foram relacionados com a imunopatologia de doenças autoimunes, pois, enquanto a maioria dos LTh apresentam importante papel na produção de citocinas e ativação de linfócitos B, a redução de linfócitos Treg contribui para menor controle no desenvolvimento de doenças autoimunes. Dessa forma, a ação dos LT passou

a ser estudada como uma nova opção de tratamento para doenças imunologicamente mediadas e, a partir desses estudos, foi desenvolvido o abatacept (TAKAHASHI *et al.*, 2000; KLIWINSKI *et al.*, 2005; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013).

1.3 Abatacept

O Abatacept (ORENCIA®, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA), inibidor da ativação de linfócitos TCD4⁺, teve seu uso aprovado no tratamento de pacientes com artrite reumatoide que apresentavam resposta inadequada aos antagonistas do TNF- α nos Estados Unidos (2005), na Europa (2007) e no Brasil (2010) (ÖSTÖR, 2008).

Esse fármaco consiste em uma proteína recombinante solúvel, com estrutura advinda da fusão do domínio extracelular CTLA-4 associado ao fragmento modificado Fc do IgG1 humana (Figura 3) (ÖSTÖR, 2008; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013).

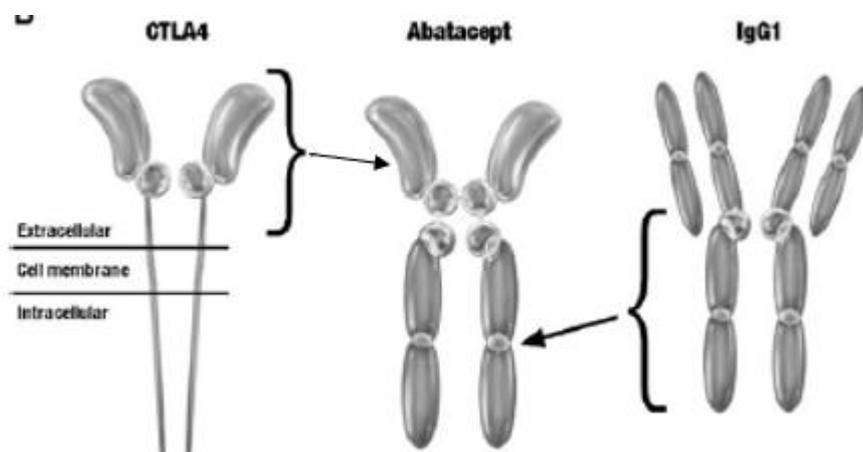


Figura 3: Imagem ilustrativa da forma molecular do abatacept, que consiste na união do domínio extracelular CTLA-4 com fragmento modificado Fc do IgG1 humana.

Fonte: adaptada de ÖSTÖR, 2008.

O mecanismo de ação desse fármaco consiste na inibição da via CD28:CD80/86 através da mimetização do efeito do receptor CTLA-4, agindo como um regulador negativo da ativação dos LT (Figura 4) (ÖSTÖR, 2008), que parecem não alterar em quantidade (ÖSTÖR, 2008; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-

VARELA, 2013), por ligação aos receptores CD80/86, presentes na superfície de APCs. A ativação de células B, responsáveis pela produção de anticorpos, é diminuída com a administração de abatacept (KREMER *et al.*, 2005; SOLOMON, 2010), também tendo sido observado impacto na concentração de diversas citocinas, TNF- α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ , e redução da expressão do fator reumatoide em pacientes com AR (KLIWINSKI *et al.*, 2005; WEISMAN *et al.*, 2006; ALI *et al.*, 2015;).

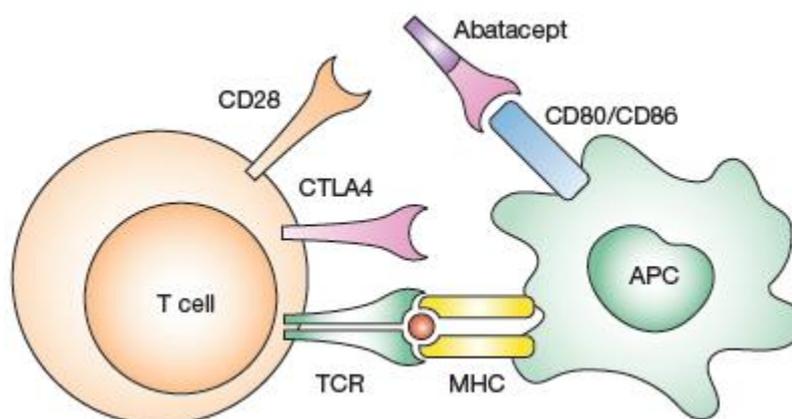


Figura 4: Imagem ilustrativa da ação do abatacept unindo-se ao receptor CD80/86 de células dendríticas e impedindo a ativação de LT.

Fonte: RUDERMAN *and* POPE, 2006.

O abatacept apresenta-se como o único agente biológico que pode ser administrado através de via intravenosa (IV) ou subcutânea (SC), sendo ambas igualmente eficazes. A dose IV varia de 500 – 1000 mg, a depender do peso do paciente (Quadro 1), e deverá ser administrada em doses fracionadas até a dose total recomendada e esse protocolo deverá ser repetido mensalmente. A dose SC, por sua vez, é de 250 mg e deverá ser administrada semanalmente. As administrações podem ainda ser realizadas com dose de ataque IV seguido de doses de manutenção por via SC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; IWAHASHI *et al.*, 2015).

Quadro 1: Dose de abatacept IV de acordo com o peso.

Peso do paciente	Dose	Fracionamento da dose
Menor que 60 kg	500 mg	2 x por semana
Entre 60 e 100kg	750 mg	3 x por semana
Mais do que 100kg	1000mg	4 x por semana

Fonte: Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 2016.

A inibição de uma resposta pró-inflamatória promovida pela utilização do abatacept pode interferir no processo de cicatrização de úlceras orais. Embora o papel do LT na remodelação de úlceras em cavidade bucal seja questionável, devido ao cunho relativamente agudo da condição, a inibição de LT pode deprimir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e modular a resposta imune inespecífica, crucial no processo de cicatrização de feridas. Dessa forma, o uso do abatacept pode exercer importante influência no processo de remodelação de úlceras orais. O papel dos linfócitos T na cicatrização, e da inibição dos mesmos, inclusive pela utilização do abatacept, tem sido atualmente alvo de diversas pesquisas, porém muito ainda há para esclarecer sobre seu mecanismo de ação e seu impacto no processo cicatricial de pacientes submetidos a seu uso crônico.

PROPOSIÇÃO

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar o processo cicatricial de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com abatacept.

2.1.2 Objetivos específicos

Avaliar em ratos machos da espécie Wistar submetidos ao modelo de úlcera em mucosa jugal e sob tratamento com abatacept o curso temporal do processo cicatricial e da variação ponderal. O aspecto cicatricial microscópico, através de análise histopatológica, histomorfométrica e do perfil de colagênese. Além do curso da permeabilidade vascular, os perfis hematológicos, de citocinas e de linfócitos.

3. HIPÓTESE

- Hipótese nula: o abatacept não altera o processo de cicatrização de úlceras traumáticas orais;
- Hipótese alternativa: o abatacept altera o processo de cicatrização de úlceras traumáticas orais.

4. CAPÍTULOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato (Anexo A) e exige certificação de línguas. Por se tratar de pesquisas envolvendo animais, ou partes deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo de Nº 118/16 (Anexo B) intitulado “**INFLUENCE OF TREATMENT WITH ABATACEPT ON REPAIR OF TRAUMATIC ULCERS IN CHEEK OF RATS**”. Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo contendo: um artigo científico no formato de submissão para o periódico “**Oral Diseases**”, conforme descrito abaixo:

4.1. Capítulo 1: Influence of abatacept treatment on oral wound healing: experimental model on rats.

Title Page

Original Article

Influence of treatment with abatacept on the repair of traumatic ulcers in the jugal mucosa of rats

Running Head

Abatacept treatment in oral healing

Authors and name affiliations

Karine Cestaro Mesquisa¹, Thinali Sousa Dantas¹, Paulo Goberlânio de Barros Silva¹, Ana Paula Negreiros Nunes Alves¹, Mário Rogério Lima Mota¹, Fabrício Bitú Sousa¹.

¹Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

*Correspondence author: Ms. Karine Cestaro Mesquita

Division of Oral Pathology

Department of Clinical Dentistry

School of Dentistry

Federal University of Ceará

Alexandre Barauna Street, 949, Rodolfo Teofilo,

60430-160, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Phone 1/Fax Number: +55 85 3366 8421.

Phone 2: +55 85 8798 0409.

E-mail: karinecemesq@gmail.com

Abstract

Abatacept is known for the regulation of T cell activation and modulation of inflammatory cytokines, and due to this to mechanisms it may interfere on wound healing. The aim of this study was to evaluate the ulcer's healing process on buccal mucosa of male Wistar rats administered with Abatacept subcutaneously. The rats were randomized between a control group, injected with saline subcutaneously, and other three study groups, administered with Abatacept subcutaneously in the doses of 3.2 (ABA 3.2), 8 (ABA 8) and 20 mg/kg/week (ABA 20). The administration of saline and Abatacept was performed 14 days before oral ulcer induction and continued until euthanasia, performed on days 1, 3, 7, 14 and 21 after the ulcer induction. Oral ulcers of 8 mm diameter and 2 mm deep were induced on the left buccal mucosa. Ulcer diameter, body mass variation, Picrosirius red, immunohistochemistry for iNOS, interleukin (IL) 1 beta, IL 6, IL 10, CD8 and CD30, vascular permeability and blood count were recorded. Histological slides were performed for histopathological (scores) and histomorphometric analysis, such as: polymorphonuclear, mononuclear, angiogenesis and fibroplasia. ANOVA-1-way and -2-way/Bonferroni and Kruskal-Wallis/Dunn were used in the statistical analysis (GraphPad Prism 5.0®, $p < 0.05$). Abatacept administration decreased ulcer diameter ($p < 0.001$), polymorphonuclear ($p < 0.001$) and mononuclear count ($p = 0.027$), CD8⁺/CD30⁺ relation ($p < 0.001$) and vascular permeability ($p < 0.001$). However, the collagenesis ($p < 0.001$) and IL-10 expression levels ($p = 0.016$) increased on days 3 and 7. In the ABA 20 group, the over Abatacept doses were related to late wound healing ($p < 0.001$), reduced angiogenesis ($p = 0.017$) and extended period of high levels of iNOS ($p = 0.026$), IL 1 beta ($p = 0.007$) and IL 6 ($p < 0.001$). This study demonstrated that Abatacept accelerates ulcer healing on the buccal mucosa of male Wistar rats due to the reduced migration of inflammatory cells, meanwhile, higher doses were associated with delayed repair and extended expression of proinflammatory cytokines.

Keywords (MeSh): Abatacept; CTLA4 Ig; Oral Ulcer; T-Lymphocytes; Wound healing.

Introdução

Úlceras orais consistem em exposição de tecido conjuntivo devido a descontinuidade dos epitélios orais e são um achado frequente na clínica odontológica. Elas podem surgir devido a traumas mecânicos, doenças autoimunes e neoplasias, por exemplo (COMPILATO *et al.*, 2009).

O processo de cicatrização dessas úlceras envolve liberação de citocinas inflamatórias, quimiotaxia de neutrófilos nas primeiras 24 horas (HART, 2002; GLIM *et al.*, 2013), e ativação e migração de macrófagos logo em seguida. Após isso, há recrutamento de linfócitos T (LT), realizado por volta do terceiro e quinto dia (a depender de LTCD4 ou LTCD8, respectivamente), que exercem importante papel no processo de reparo, atuando principalmente na produção de fatores de crescimento e como reguladores do processo inflamatório (FISHEL *et al.*, 1987; AGAIBY e DYSON, 1999; HART, 2002; KEEN, 2008).

A efetividade dos LT é dependente de sua ativação que ocorre após dupla ligação entre a Molécula Principal de Histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimuladoras B7 (CD80 e CD86), presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs) e receptores de células T (TCR) e CD28, presentes na superfície de LT respectivamente (LINSLEY *et al.*, 1991; GEMMELL *et al.*, 2001; PAWLAK *et al.*, 2005). Após ativadas, a regulação negativa dessas células é dependente do receptor de linfócito T Citotóxico 4 (CTLA-4 - CD152), homólogo ao CD28, porém com maior afinidade de ligação aos receptores B7 (FREEMAN *et al.*, 1992; LINSLEY *et al.*, 1991; LINSLEY *et al.*, 1996; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013) (Figura 5).

Mimetizando a atividade do CTLA-4, foi desenvolvido o Abatacept (CTLA-4-Ig) (ORENCIA®, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA), proteína de fusão recombinante solúvel, resultante da fusão do domínio extracelular CTLA-4, associado ao fragmento modificado Fc do IgG1 humana (ÖSTÖR, 2008; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013), para uso no tratamento de paciente com artrite reumatoide quando apresentam inadequada resposta aos antagonistas do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (ÖSTÖR, 2008).

Diversos estudos trazem a importância dos LT (LTCD4, LTCD8, LTreg) na remodelação de úlceras cutâneas e orais (DAVIS *et al.*, 2001; LEWKOWICZ *et al.*, 2008; NOSBAUM *et al.*, 2016), de forma que a inibição de uma resposta pró-inflamatória, promovida pela utilização do abatacept, pode interferir no processo de cicatrização de

úlceras orais. A compreensão do mecanismo de ação desse fármaco no processo cicatricial poderá contribuir para o desenvolvimento de fármacos que acelerem esse processo. Assim, é objetivo deste trabalho avaliar a influência do tratamento com abatacept no reparo de úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos.

Materiais e Métodos

Animais, princípios éticos e cálculo amostral

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, protocolado com o número 118/16, estando de acordo com a Lei Federal nº 11.794 (2008) e o decreto número 6.689 (2009) (www.planalto.gov.br/ccivil/03/Ato200720102008LeiL11794.htm), que regulamentam a experimentação animal no país.

Assim, o presente estudo foi desenhado para utilizar o mínimo de animais e, para isso, foi realizado cálculo amostral baseado nos achados de Kliwinski *et al.* (2005), que observou em modelo de artrite induzida por colágeno o efeito do tratamento com abatacept na redução da expressão de IL-1 α de 50 ± 3 (média \pm erro padrão da média, n=8) para 31 ± 4 (média \pm erro padrão da média, n=8), e estimou-se avaliar seis ratos por grupo de estudo por dia de eutanásia, a fim de obter uma amostra que represente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste trabalho.

Um total de 180 ratos (*rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar com cerca de seis a oito semanas foram acondicionados no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da referida Universidade em temperatura média de 24° C, com ciclos de 12 horas de luz-escuro e acesso irrestrito a água e ao alimento. Os animais foram aleatoriamente (comando aleatório, Microsoft Excel) distribuídos em quatro grupos de estudo conforme protocolo adotado.

Tratamento com abatacept e modelo experimental

Devido à falta de padronização das doses de abatacept utilizadas na literatura, foi construída curva dose resposta baseada inicialmente na conversão da dose usualmente utilizada em humanos para ratos (8 mg/kg/semana) (NAIR & JACOB, 2016). Como a maior dose encontrada na literatura foi de 20 mg/kg/semana (BIGBEE *et al.*, 2007; LON

et al., 2013), criou-se uma proporção entre essas duas doses (no valor de 2,5 vezes) e foi determinada uma subdose de 3,2 mg/kg/semana.

Assim, os animais foram divididos em um grupo controle tratado com 0,2ml/kg de solução salina 0,9% estéril, e três grupos experimentais, tratados com abatacept 3,2 (ABA 3,2), 8 (ABA 8) e 20 (ABA 20) mg/kg/semana. O fármaco foi administrado por via subcutânea fracionada em três administrações semanais, com início duas semanas antes da indução da úlcera (dia 0) até o dia de eutanásia, para garantir a manutenção de níveis adequados de abatacept circulantes ao longo do protocolo (LON, *et al.*, 2013; NA, *et al.*, 2017). Os ratos foram eutanasiados após 1, 3, 7, 14 e 21 dias da indução da úlcera por sobredose de pentobarbital (150 mg/kg).

Indução das úlceras orais

Após anestesia intraperitoneal (IP) dos animais, com xilazina 25 mg/kg e quetamina 75 mg/kg, foi realizada antissepsia da mucosa com digluconato de clorexidina 0,12% e indução da úlcera em mucosa jugal esquerda, com *punch* dermatológico circular com 8mm de diâmetro e 2mm de profundidade (Rhosse®). Lâmina nº 15 em bisturi de Bad Parker utilizada para remoção do tecido remanescente (adaptado de CAVALCANTE *et al.*, 2011). Os animais ficaram em observação até recobrem os reflexos.

Análises clínicas: tamanho da úlcera e variação de peso

Após a eutanásia, as úlceras foram medidas com paquímetro digital (Digimess®) com 0,01mm de precisão no maior e no menor diâmetro (D = maior diâmetro e d = menor diâmetro) para o cálculo da área ($A = \pi.d.D/4$) de úlcera. Além disso, os animais foram pesados no dia de indução da úlcera e no dia de eutanásia para cálculo da variação percentual de massa corpórea inicial. Após a eutanásia, as úlceras foram acondicionadas em formol tamponado 10% por 24 horas para processamento histológico.

Análise histológica

As mucosas fixadas em formol tamponado a 10% foram emblocadas em parafina e seccionados a 3 µm para montagem em lâmina histológica e coloração com hematoxilina-eosina. A análise das lâminas foi feita através da adoção de escores variando de 0 a 4 para comparação do estadiamento da úlcera. Foi considerado escore 0 na ausência de úlcera com tecido conjuntivo remodelado; escore 1, ausência de úlcera com discreta/moderada fibrose associada a inflamação crônica; escore 2, presença de úlcera com fibrose e moderada inflamação crônica; escore 3, úlcera e processo inflamatório crônico (tecido de granulação); e escore 4, úlcera e processo agudo (ectasia, vasos dilatados, infiltrado inflamatório misto) (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

Análise histomorfométrica: avaliação do infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia

Cinco microcampos (três na superfície e dois na profundidade, totalizando 1,30 mm²) de cada lâmina corada por hematoxilina-eosina foram selecionados e fotografados no aumento de 400X utilizando microscópio (DM2000, Leica®) com câmera (DFC295, Leica®) e software (LAS, Leica®) acoplados. Utilizando o comando *Cell counter* do software ImageJ®, foram contados o total (somatório) de células polimorfonucleares neutrófilos, células mononucleares, vasos sanguíneos (excluindo brotos endoteliais e vasos maduros) e fibroblastos/miofibroblastos. O resultado foi expresso como média ± EPM (BRIZENO *et al.*, 2016).

Análise histoquímica: avaliação da colagênese

Cortes de 3 µm foram realizados para coloração por Picrosirius Red para avaliar a deposição de colágeno. Após desparafinização e reidratação, as amostras foram incubadas em solução de picrosirius (ScyTek®), lavadas rapidamente com ácido clorídrico 5% e contracoradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos. Cinco microcampos de cada lâmina foram fotografados seguindo a mesma metodologia descrita para as lâminas coradas por hematoxilina-eosina, e as imagens foram exportadas para o Image J® (RSB) para análise do percentual de área corada em vermelho (colágeno total).

As imagens das lâminas coradas por picosirius foram calibradas utilizando o comando *Color Thershold (Image > Adjust > Color Thersold)* na função RGB para ajuste de cores para vermelho (mínimo: 71, máximo: 255), verde (mínimo: 0, máximo: 69) e azul (mínimo: 0, máximo: 92) a fim de selecionar apenas a marcação em vermelho (fibras de colágeno). Após a calibração, as imagens foram convertidas para escala de 8-bits (*Image > Type > 8-bit*), binarizadas (*Process > Binary > Make Binary*) e o total de área de colágeno foi mensurada (*Analyze > Analyze Particles*). A média dos campos foi utilizada como unidade amostral e expressa em forma de média \pm EPM (BRIZENO *et al.*, 2013).

Arranjo em matriz de imuno-histoquímica de mostras teciduais (TMA - tissue microarray) e imuno-histoquímica

Os blocos dos animais de todos os grupos tiveram duas áreas representativas (duplicata) utilizadas para a confecção de blocos de TMA através do dispositivo “*tissue microarrayer*” (Quick-Ray UNITMA®). Após confecção dos blocos, foi realizado corte de 3 μ m dispostos sobre lâminas silanizadas para reação através da técnica da estreptavidina-biotinilada.

Após desparafinação e reidratação, foi realizada recuperação antigênica com solução de citrato pH 6,0. Posteriormente ao resfriamento em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em solução tampão de fosfato (PBS) e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% diluído PBS por 30 minutos. Após lavagens em PBS, realizou-se incubação *overnight* com os anticorpos primários **para citocinas inflamatórias**, anti-óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Abcam®, 1:100), anti-Interleucina 1 beta (IL-1 β) (Abcam®, 1:150), **duais**, anti-IL-6 (Abcam®, 1:300), anti-inflamatórias, anti-IL-10 (Abcam, 1:100®), **para avaliação do perfil de resposta Th1,** anti-CD8 (Dako®, pronto para uso) **e Th2**, anti-CD30 (Dako®, pronto para uso).

Após lavagens com PBS, realizou-se incubação com o polímero Histofine® (Nichei) por 60 minutos, revelação com 3,3-diamino-benzidina (DAB) (Dako®) e contra coloração com Hematoxilina de Harris por 10 segundos e montadas com Enthellam®.

Cinco microcampos de cada lâmina foram analisados seguindo a mesma metodologia descrita para as lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Para os

marcadores celulares foram contados o número total de células mononucleares CD8⁺ e de células CD30⁺. Para os marcadores inflamatórios foram definidos escores de imunomarcção dados por dois observadores de forma cega, variando de 0 a 3 (sendo 0, ausência de células positivas; 1, 1-33% de células positivas; 2, variação de 34-66% de células marcadas e 3, valores de 67-100% de células marcadas, respectivamente) no tecido conjuntivo analisado (BRIZENO *et al.*, 2013).

Teste de permeabilidade vascular e análise hematológica

O experimento foi repetido para os grupos salina e ABA 8 em todos os dias de protocolo (1, 3, 7, 14 e 21). Após as duas semanas de tratamento com solução salina 0,9% estéril ou abatacept 8 mg/kg/semana por via subcutânea, foi confeccionada a úlcera na mucosa jugal esquerda dos ratos. No dia da indução da úlcera, após anestesia, os animais foram submetidos a coleta de 0,5mL de sangue da veia caudal para realização de hemograma completo. As amostras foram acondicionadas em solução 1% de EDTA trissódico e analisadas por princípio de refratometria (Sistema ABC Vet, Horiba ABX®).

Nos dias de eutanásia, uma hora antes, os animais receberam injeção de corante azul de Evans (25mg/kg) por via intravascular (veia dorsal peniana) dissolvido em soro fisiológico estéril e, após uma hora, foi realizada eutanásia com sobredose de pentobarbital (150 mg/kg).

As mucosas jugais ulcerada (teste) e não ulcerada (controle interno) foram excisadas cirurgicamente com o *punch* utilizado para confecção da úlcera a fim de padronizar a quantidade de tecido retirado (8 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade), e pesadas em balança 10⁻⁵g de precisão. As amostras foram incubadas em 1,0 mL de formamida PA, mantida a 37°C, por 48h para extração do azul de Evans. A solução foi lida em duplicata em leitor de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) (TP reader NM-ThermoPlate®) (630nm) e os dados foram plotados em modelo de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans previamente realizada, sendo expressos como µg de azul de Evans/mg tecido.

A quantidade de azul de Evans do lado ulcerado foi dividida pela quantidade de azul de Evans do lado não ulcerado sendo expressa a média ± EPM do extravasamento relativo de proteínas em relação ao controle interno (adaptado de BRIZENO *et al.*, 2016).

Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos em forma de média \pm EPM, analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados utilizando o teste ANOVA-1-way e ANOVA-2-way, seguido do pós-teste de Bonferroni (dados paramétricos). Os escores histológicos e de imunomarcção foram expressos como mediana (máxima e mínima) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

Em todas as análises estatísticas considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0.05$) e todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Efeito do abatacept sobre parâmetros clínicos da úlcera oral e variação ponderal de ratos

Todos os grupos experimentais mostraram redução significativa da média de área de úlcera ao longo do protocolo experimental ($p < 0,001$). Os grupos tratados, salina, ABA 3,2 e ABA 8, apresentaram redução significativa da área de úlcera em relação ao 1º dia, a partir do 14º dia experimental ($p < 0,001$). O grupo ABA 20 mostrou redução de área de úlcera em relação ao 1º dia, a partir do 7º dia ($p < 0,001$) (Figura 1, Tabela 1).

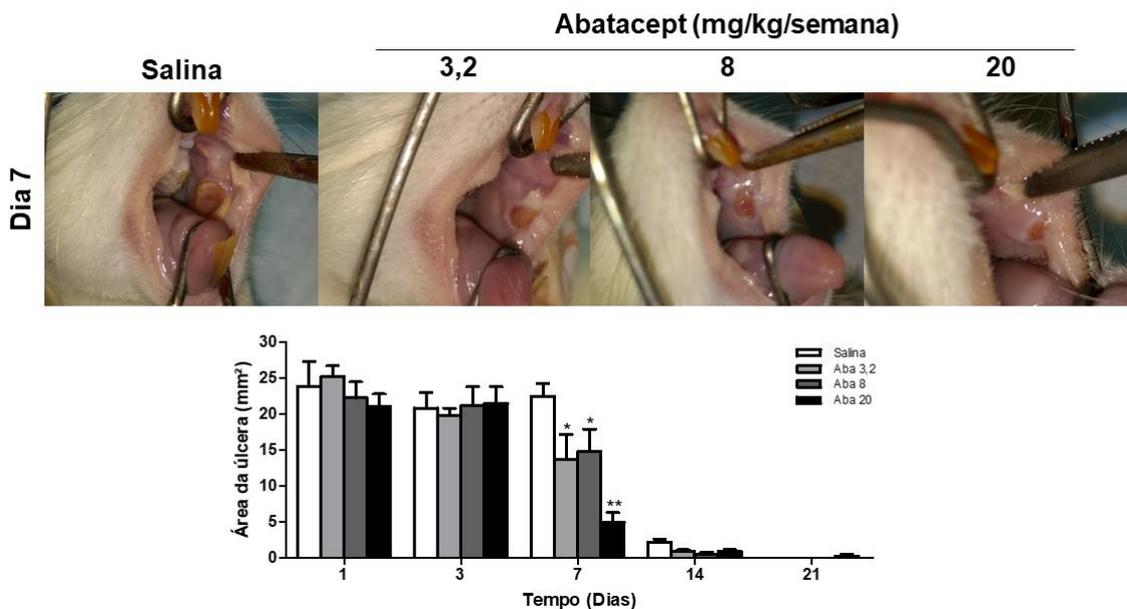


Figura 5: Perfil de cicatrização clínico de úlceras em mucosa jugal de ratos em tratamento com Abatacept.

* $p < 0,05$ versus Salina no mesmo dia; ** $p < 0,05$ versus Aba 3,2 e Aba 8 mg/kg/semana no mesmo dia (Média±EPM; ANOVA-2-way/Bonferroni).

No 7º dia do protocolo os animais dos ABA 3,2, ABA 8 e ABA 20 mostraram menor área de úlcera que os animais do grupo salina ($p = 0,003$). Ao final do 21º dia de experimento todos os grupos apresentaram úlcera clínica totalmente cicatrizada, com exceção do grupo tratado com ABA 20 (Figura 5, Tabela 1).

Com relação a variação de massa, todos os grupos mostraram ganho de peso ao longo do curso temporal, iniciando o ganho significativo a partir do 7º dia após a ulceração ($p < 0,001$) e continuando a ganhar massa até o desfecho do estudo. Não houve diferença significativa no perfil de ganho de massa corpórea entre os quatro grupos experimentais ($p = 0,163$) (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação dos parâmetros clínicos em ratos tratados com Abatacept® em diferentes doses.

	Dias					<i>p-Valor</i> ^a	<i>p-Valor</i> ^b
	1	3	7	14	21		
Área de úlcera (cm²)							
Salina	23,9±3,4	20,8±2,2	22,5±1,8	2,3±0,4*	0,0±0,0*	<0,001	0,003
ABA 3,2	25,2±1,5	19,8±1,0	13,7±3,5 [†]	0,9±0,2*	0,0±0,0*	<0,001	
ABA 8,0	22,2±2,2	21,1±2,6	14,8±3,1 [†]	0,6±0,3*	0,0±0,0*	<0,001	
ABA 20,0	21,0±1,8	21,5±2,3	5,0±1,4*** [†]	1,0±0,3*	0,3±0,2*	<0,001	
Variação ponderal (%)							
Salina	69,7±2,3	85,7±3,1	106,2±5,7*	107,6±3,6*	107,5±7,4*	<0,001	0,163
ABA 3,2	64,5±3,1	76,7±2,6	96,0±3,3*	112,3±6,9*	116,4±4,1*	<0,001	
ABA 8,0	55,8±3,7	81,7±1,8	83,6±3,7*	115,9±7,2*	97,2±8,1*	<0,001	
ABA 20,0	59,0±2,5	73,2±2,3	91,0±7,2*	109,9±4,6*	103,2±4,1*	<0,001	

^aTeste ANOVA-1-way/Bonferroni; ^bTeste ANOVA-2-way/Bonferroni (média±EPM)

[†]p<0,05 versus dia Salina; **p<0,05 versus ABA 3,2 e ABA 8,0; *p<0,05 versus dia 1;

ABA = ABATACEPT®.

Efeito do abatacept sobre alterações histopatológicas de úlceras orais

Todos os grupos experimentais mostraram redução significativa dos escores histológicos ao longo do protocolo experimental. No primeiro dia de eutanásia, todos os grupos apresentaram escore 4, que representa úlcera aberta com intenso infiltrado polimorfonuclear, sem diferença significativa (p=1,000). No 3° dia e no 7° dia, apesar de pequenas variações, a mediana dos escores histológicos variou de 3 (úlcera aberta com tecido de granulação) a 4 (úlcera e processo agudo, ectasia, vasos dilatados, infiltrado inflamatório misto), sem diferença estatística (p=0,100 e p=0,590, respectivamente). No 14° dia, todos os grupos apresentaram redução significativa dos escores histológicos em relação ao 1° dia, com mediana de escores variando entre 0,5 e 1 (úlcera totalmente cicatrizada com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório), sem diferença significativa entre os grupos (p=0,130) (Figura 6, Tabela 2).

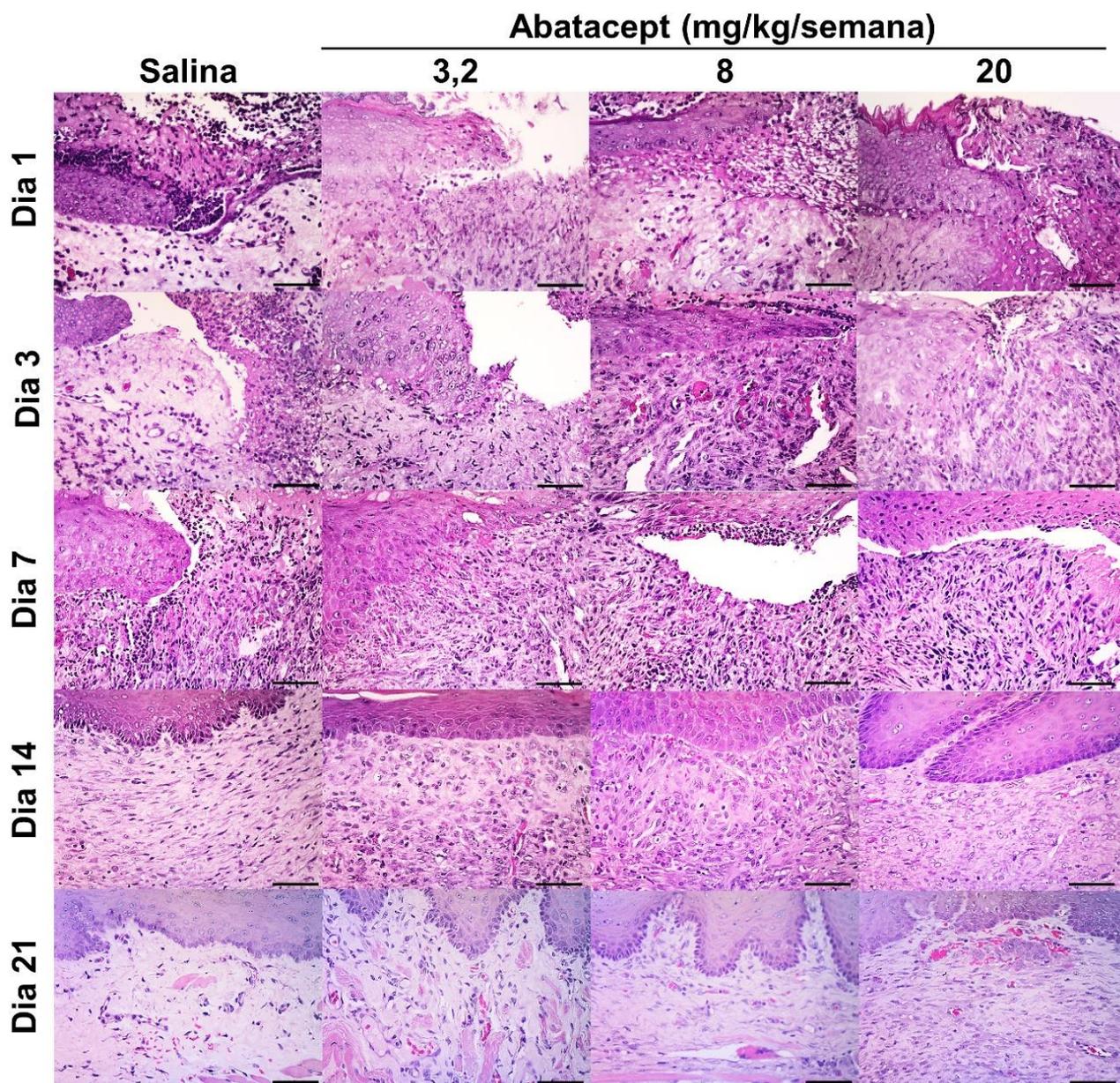


Figura 6: Perfil microscópico de úlceras em mucosa jugal de ratos em tratamento com Abatacept (Aumento: 200x; Barra = 100 μ m).

No 21º dia os grupos salina e ABA 3,2 apresentaram mediana igual a 0 (0-1), que corresponde a úlcera totalmente cicatrizada com ausência de infiltrado inflamatório. O grupo ABA 8 apresentou mediana discretamente superior (0,5, 0-1) com metade dos animais apresentando escore 0 e metade escore 1, e o grupo ABA 20 apresentou mediana de escore significativamente superior ao grupo salina (mediana 1, 1-3) com escores variando de uma úlcera totalmente cicatrizada com pouco infiltrado inflamatório a úlceras abertas com tecido de granulação ($p=0,016$) (Figura 2, Tabela 2).

Tabela 2: Escores microscópicos de ratos tratados com Abatacept® em diferentes doses.

	Dias					<i>p-Valor</i>
	1	3	7	14	21	
Grupos						
Salina	4 (4-4)	4 (3-4)	3 (3-3)	1 (1-3)*	0 (0-1)*	<0,001
ABA 3,2	4 (4-4)	4 (3-4)	3 (1-3)	1 (0-3)*	0 (0-1)*	<0,001
ABA 8,0	4 (4-4)	3 (2-4)	3 (3-4)	0.5 (0-1)*	0.5 (0-1)*	<0,001
ABA 20,0	4 (4-4)	3 (2-4)	3 (1-4)	1 (0-3)*	1 (1-3)*†	<0,001
<i>p-Valor</i>	1,000	0,100	0,590	0,130	0,016	

Dados expressos em forma de mediana (mínimo - máximo); * $p < 0,05$ versus dia 1; † $p < 0,05$ versus grupo salina no mesmo dia Teste de Kruskal-Wallis/Dunn. ABA = Abatacept®.

Estudo histomorfométrico

Perfil celular: Contagem de polimorfonucleares neutrófilos

Todos os grupos experimentais mostraram redução significativa da contagem de polimorfonucleares neutrófilos ao longo do estudo ($p < 0,001$). Tanto o grupo salina, como os grupos ABA 3,2 e ABA 8 apresentaram redução significativa do número de polimorfonucleares neutrófilos no 3º dia após a ulceração em relação ao 1º dia ($p < 0,001$). O grupo ABA 20 apresentou redução significativa do número de polimorfonucleares neutrófilos em relação ao 1º dia apenas a partir do 14º dia experimental ($p < 0,001$) (Figura 2, Tabela 3).

No primeiro dia de eutanásia, os animais do grupo ABA 20 apresentaram menor número de neutrófilos que o grupo salina ($p < 0,001$), apesar de os grupos ABA 3,2 e ABA 8 não diferirem significativamente em relação ao controle. Nos demais dias, não houve diferença entre os quatro grupos experimentais (Figura 2, Tabela 3).

Perfil celular: Contagem de mononucleares

Todos os grupos apresentaram baixo número de mononucleares no 1º e no 3º dia do experimento. Nos grupos salina, ABA 3,2 e ABA 8 houve aumento significativo do número de mononucleares no 7º dia em relação ao 1º dia ($p < 0,001$). No grupo salina e ABA 3,2 houve redução significativa em relação ao 7º dia após 14 dias da ulceração e no

grupo ABA 8 essa redução ocorreu apenas no 21º dia. No grupo ABA 20 não houve variação significativa do número de mononucleares ao longo dos 21 dias de experimento ($p=0,078$) (Figura 2, Tabela 3).

No 7º dia a contagem de mononucleares os animais do grupo ABA 20 e ABA 8 apresentaram menor número de mononucleares em relação ao grupo salina ($p=0,027$). O grupo ABA 3,2 não diferiu significativamente do grupo salina (Figura 2, Tabela 3).

Perfil celular: Contagem vasos neoformados

Nenhum animal apresentou neoformação vascular no 1º e 3º dia após a indução da úlcera. O grupo salina apresentou aumento significativo do número de vasos a partir do 14º dia pós-ulceração, enquanto os grupos ABA 3,2 e ABA 8 apresentaram aumento do número de vasos neoformados a partir do 7º dia do protocolo. O grupo ABA 20 não mostrou variação significativa no número de vasos ao longo do estudo ($p=0,062$). Em todos os dias experimentais o grupo ABA 20 apresentou menor quantidade de vasos neoformados ($p<0,001$) (Figura 6, Tabela 3).

Perfil celular: Fibroblastos/miofibroblastos

Nenhum animal apresentou expressivo número de fibroblastos/miofibroblastos no 1º e 3º dia após a ulceração. Nos grupos salina e ABA 3,2 houve aumento do número dessas células a partir do 14º dia experimental ($p<0,001$). Nos grupos tratados ABA 8 e 20 o aumento do número de fibroblastos/miofibroblastos ocorreu já a partir do 7º dia após a ulceração. Após 21 dias da ulceração, o grupo ABA 20 apresentou número de fibroblastos/miofibroblastos significativamente superior aos demais grupos ($p<0,001$), sem diferença significativa nos demais dias (Figura 6, Tabela 3).

Tabela 3: Perfil celular e tecidual de ratos tratados com Abatacept submetidos a modelo de úlcera traumática em mucosa jugal.

	Dias					<i>p</i> - Valor ^a	<i>p</i> - Valor ^b
	1	3	7	14	21		
PMN							
Salina	352,0±70,6	99,3±26,4 [†]	38,5±9,1 [†]	14,8±2,4 [†]	5,8±3,3 [†]	<0,001	<0,001
ABA 3,2	304,3±52,9	74,2±30,5 [†]	40,5±3,3 [†]	16,6±4,1 [†]	5,0±0,8 [†]	<0,001	
ABA 8,0	337,0±59,8	104,8±17,0 [†]	25,0±4,0 [†]	8,1±2,3 [†]	3,3±0,6 [†]	<0,001	
ABA 20,0	54,2±3,9*	41,0±7,7	20,3±5,4	12,2±3,8 [†]	9,0±5,8 [†]	<0,001	
MN							
Salina	5,8±1,9	4,0±2,4	40,8±4,6 [†]	10,4±6,4 ^{††}	2,0±1,1	<0,001	0,027
ABA 3,2	6,2±1,3	3,2±1,3	51,0±9,6 [†]	19,0±9,4 ^{††}	1,7±0,8	<0,001	
ABA 8,0	0,8±0,7	4,4±1,4	17,0±3,3*	9,9±3,4	1,0±0,6 ^{††}	0,001	
ABA 20,0	1,0±0,4	3,5±0,7	22,4±3,2*	16,0±9,0	2,0±1,5	0,078	
Vasos neoformados							
Salina	0,0±0,0	0,0±0,0	2,6±1,4	9,7±2,2 [†]	11,8±1,6 [†]	<0,001	0,017
ABA 3,2	0,0±0,0	0,0±0,0	8,5±2,0* [†]	11,4±2,5 [†]	9,6±2,0 [†]	<0,001	
ABA 8,0	0,0±0,0	0,0±0,0	5,3±1,5 [†]	8,9±2,0 [†]	7,2±1,6 [†]	0,032	
ABA 20,0	0,0±0,0	0,0±0,0	2,0±1,0**	5,0±2,4**	2,3±1,0**	0,062	
Fibroblastos / Miofibroblastos							
Salina	0,0±0,0	0,3±0,3	69,8±27,3	138,3±23,9 [†]	107,8±29,2 [†]	<0,001	<0,001
ABA 3,2	0,3±0,3	0,0±0,0	82,2±27,4	111,6±23,6 [†]	94,8±19,8 [†]	<0,001	
ABA 8,0	0,0±0,0	0,6±0,6	124,0±23,8 [†]	129,9±14,9 [†]	94,2±33,6 [†]	0,001	
ABA 20,0	0,0±0,0	0,0±0,0	81,8±14,5 [†]	140,8±20,0 [†]	201,4±37,7* [†]	0,035	

^aTeste ANOVA-1-way/Bonferroni; ^bTeste ANOVA-2-way/Bonferroni (média±EPM)

*p<0,05 versus dia Salina; **p<0,05 versus ABA 3,2 e ABA 8,0; [†]p<0,05 versus dia 1; ^{††}p<0,05, versus dia 7.

ABA = Abatacept; PMN = Polimorfonucleares; MN = Mononucleares.

Análise da deposição de colágeno

Não houve deposição de colágeno no 3º dia após a ulceração. Os grupos salina, ABA 3,2 e ABA 8 apresentaram aumento da deposição de colágeno a partir do 14º dia após a ulceração ($p < 0,001$). O grupo ABA 20 mostrou aumento na deposição de colágeno no 7º dia após a indução da úlcera ($p = 0,040$) (Figura 7, Tabela 4).

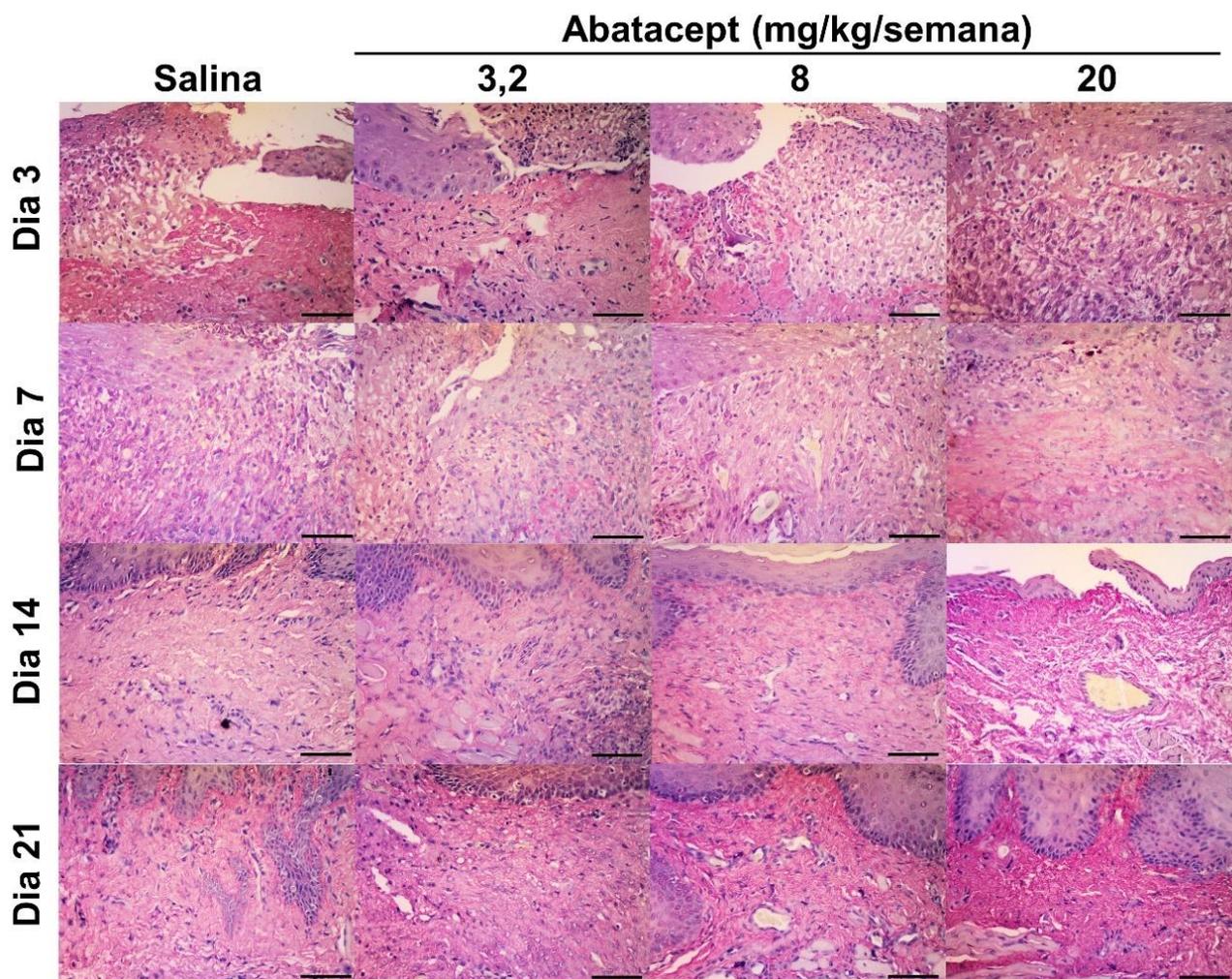


Figura 7: Perfil de colagênese de úlceras em mucosa jugal de ratos em tratamento com Abatacept (Aumento: 200x; Barra = 100 μ m).

No 7º dia do protocolo, a quantidade de colágeno do grupo ABA 20 foi significativamente maior que dos grupos salina, ABA 3,2 e ABA 8 ($p < 0,001$). No 14º dia experimental todos os grupos tratados com abatacept mostraram maior deposição de colágeno que o grupo tratado com solução salina ($p < 0,001$). No 21º dia não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,092$) (Figura 7, Tabela 4).

Tabela 4: Perfil tecidual de ratos tratados com Abatacept submetidos a modelo de úlcera traumática em mucosa jugal.

	Dias					<i>p-Valor</i> ^a	<i>p-Valor</i> ^b
	1	3	7	14	21		
Colágeno (%)							
Salina	-	19,5±1,2	23,7±1,7	31,3±1,3 [†]	46,3±1,4 [†]	<0,001	<0,001
ABA 3,2	-	23,8±3,5	27,4±6,0	40,4±0,5* [†]	48,8±3,0 [†]	<0,001	
ABA 8,0	-	19,7±1,5	22,2±2,2	39,9±1,8* [†]	41,7±1,4 [†]	<0,001	
ABA 20,0	-	18,9±1,8	47,9±1,6* [†]	40,9±1,2* [†]	45,2±1,7 [†]	0,040	

^aTeste ANOVA-1-way/Bonferroni; ^bTeste ANOVA-2-way/Bonferroni (média±EPM)

* $p < 0,05$ versus dia Salina; ** $p < 0,05$ versus ABA 3,2 e ABA 8,0; [†] $p < 0,05$ versus dia 1; ^{††} $p < 0,05$, versus dia 7.

ABA = Abatacept

Avaliação do Perfil linfocitário

O número de células CD8⁺ nos grupos salina ($p = 0,729$), ABA 3,2 ($p = 0,245$), ABA 8 ($p = 0,288$) e ABA 20 ($p = 0,564$) não mostrou variação significativa ao longo do curso temporal. No entanto, no terceiro dia do protocolo todos os grupos tratados com abatacept apresentaram menor número de células CD8⁺ que o grupo tratado com salina ($6,0 \pm 3,2$ células CD8⁺) ($p = 0,047$). Nos demais dias a contagem de células CD8⁺ não mostrou diferença significativa (Figura 8, Tabela 5).

O número de células CD30⁺ também não mostrou variação significativa ao longo do curso temporal nos grupos salina ($p = 0,238$), ABA 3,2 ($p = 0,054$), ABA 8 ($p = 0,161$) ou ABA 20 ($p = 0,228$). Porém, no terceiro dia do protocolo os grupos tratados com as duas maiores doses de abatacept apresentaram contagem de células CD30⁺ maior que o grupo salina ou ABA 3,2 ($p = 0,042$). Nos demais dias do protocolo os grupos não

diferiram significativamente (Figura 8, Tabela 5).

Quando se avalia a relação entre células CD8⁺/CD30⁺ observa-se que o grupo salina e o grupo ABA 3,2 mostram redução significativa da relação de células CD8⁺/CD30⁺ do 3º para o 7º dia do protocolo (p<0,001 e p=0,003, respectivamente), ao passo que os grupos ABA 8 (p=0,435) e ABA 20 (p=0,553) não mostraram variação significativa da relação entre células CD8⁺/CD30⁺. A relação entre células CD8⁺/CD30⁺ mostrou-se significativamente reduzida em todos os grupos tratados com abatacept em relação ao grupo salina (p<0,001) no 3º dia do protocolo. Nos demais dias não houve variação significativa na relação entre células CD8⁺/CD30⁺ (Figura 8, Tabela 5).

Tabela 5: Perfil celular de ratos tratados com Abatacept submetidos a modelo de úlcera traumática em mucosa jugal.

	Dias					p-Valor ^a	p-Valor ^b
	1	3	7	14	21		
Linfócitos CD8⁺							
Salina	-	6,0±3,2	1,0±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,729	0,047
ABA 3,2	-	0,9±0,6*	1,0±0,4	0,2±0,2	0,0±0,0	0,245	
ABA 8,0	-	0,7±0,5*	1,1±0,7	0,2±0,2	0,0±0,0	0,288	
ABA 20,0	-	0,6±0,4*	0,7±0,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,564	
Linfócitos CD30⁺							
Salina	-	10,3±2,3	20,3±5,7	18,0±4,4	18,7±7,5	0,238	0,042
ABA 3,2	-	6,9±2,1	11,6±2,5	21,0±5,5	15,0±3,0	0,054	
ABA 8,0	-	28,3±9,4*	9,5±1,2	17,8±4,0	12,3±2,7	0,161	
ABA 20,0	-	27,8±11,8*	9,5±1,5	14,5±4,1	4,0±1,1	0,228	
Relação CD8⁺/CD30⁺							
Salina	-	1,91±0,56	0,05±0,02	0,07±0,02	0,04±0,01	<0,001	<0,001
ABA 3,2	-	0,33±0,09*	0,12±0,03	0,07±0,02	0,09±0,02	0,003	
ABA 8,0	-	0,34±0,15*	0,16±0,03	0,12±0,04	0,16±0,07	0,435	
ABA 20,0	-	0,16±0,09*	0,20±0,05	0,02±0,02	0,20±0,06	0,553	

^aTeste ANOVA-1-way/Bonferroni; ^bTeste ANOVA-2-way/Bonferroni (média±EPM)

*p<0,05 versus dia Salina; **p<0,05 versus ABA 3,2 e ABA 8,0; †p<0,05 versus dia 1; ††p<0,05, versus dia 7.

ABA = Abatacept

Análise do perfil imunoinflamatório

Todos os grupos apresentaram uma alta expressão citoplasmática para iNOS no tecido conjuntivo três, sete e quatorze dias após a ulceração (mediana = 3). Nos grupos salina (2, 2-3), ABA 3,2 (1, 1-3) e ABA 8 (1, 1-2) houve redução significativa da expressão para iNOS no 21º dia após a indução da úlcera. O grupo ABA 20 não mostrou variação significativa dos escores de imunomarcção para iNOS ao longo do protocolo experimental, demonstrando valores (3, 2-3) significativamente superiores aos demais grupos no 21º dia (Figura 8, Tabela 6).

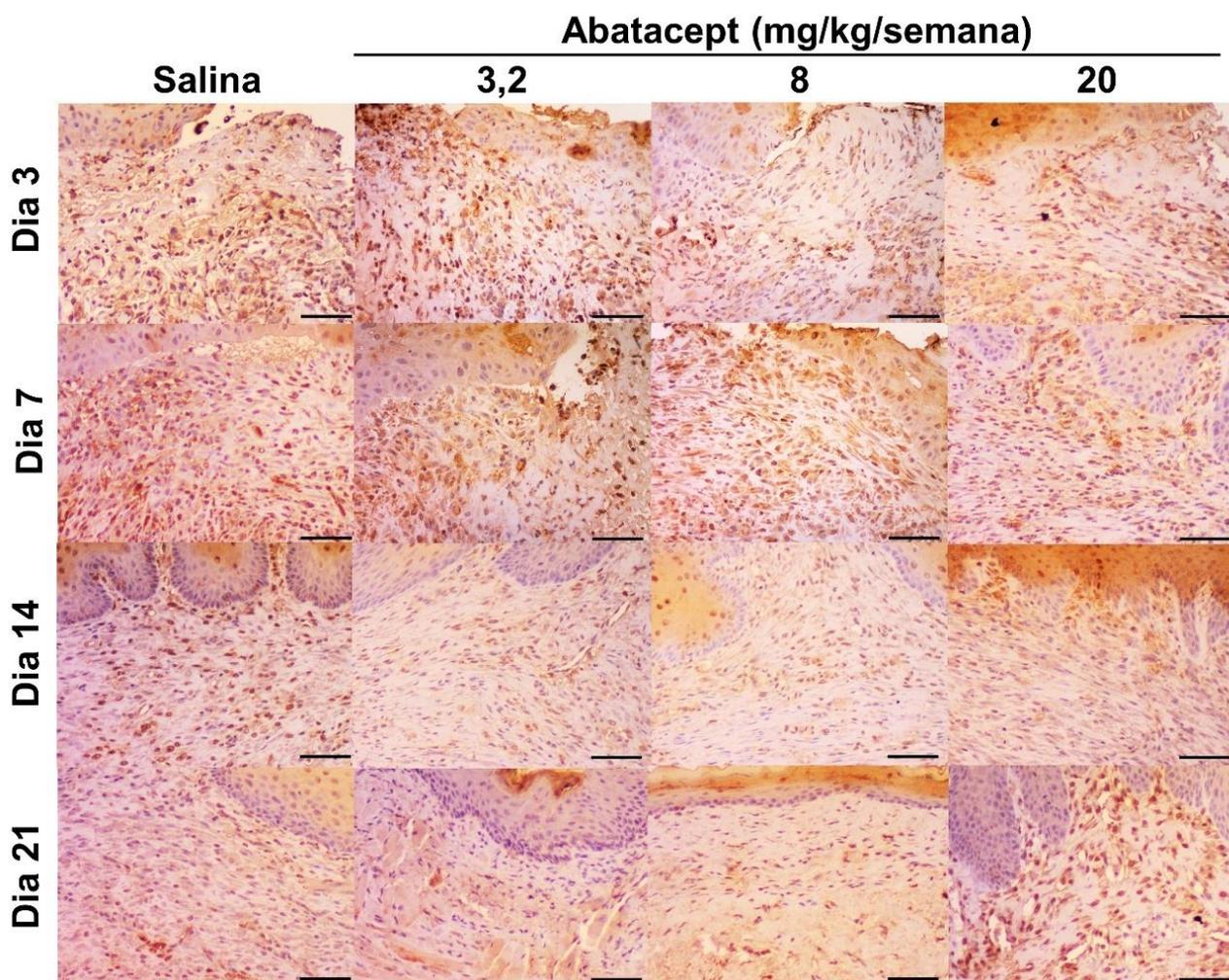


Figura 8: Imunoexpressão para iNOS em mucosa jugal ulcerada de ratos em tratamento com Abatacept (Aumento: 200x; Barra = 100 μ m).

A expressão para IL-1 β mostrou-se elevada em todos os grupos no 3 $^{\circ}$ e 7 $^{\circ}$ dia após a indução da úlcera. Nos grupos salina (2, 0-2) e ABA 3,2 (2, 0-3) houve redução significativa da expressão para IL-1 β a partir do 14 $^{\circ}$ dia experimental. No grupo ABA 8 a redução só ocorreu a partir do 21 $^{\circ}$ dia (2, 1-3), e no grupo ABA 20 mg/kg/semana não houve variação significativa na expressão de IL-1 β ao longo do curso temporal ($p=0,099$), estando significativamente elevados em relação ao grupo salina no 14 $^{\circ}$ ($p=0,007$) e 21 $^{\circ}$ ($p=0,011$) dia (Figura 9, Tabela 6).

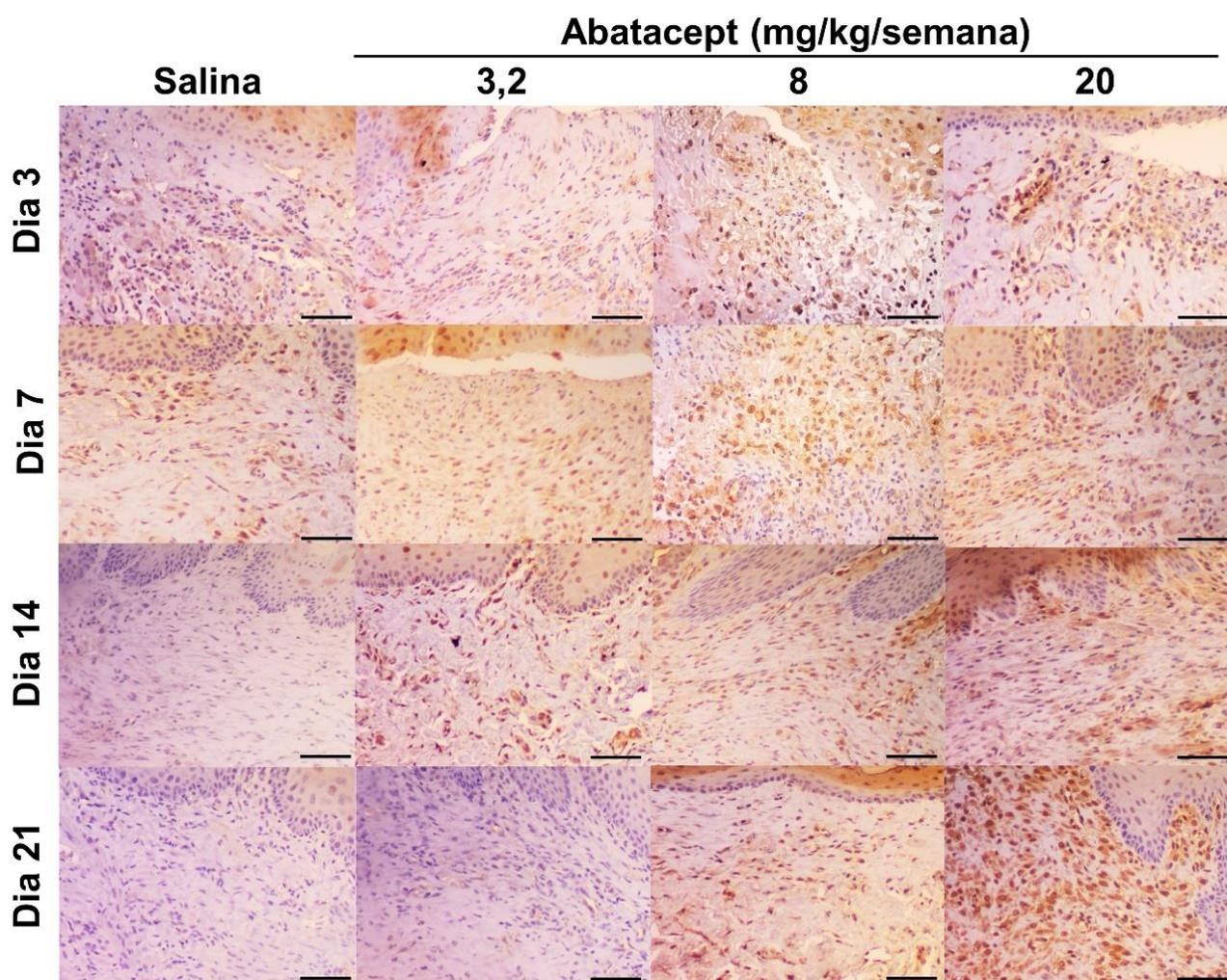


Figura 9: Imunoexpressão para IL-1 β em mucosa jugal ulcerada de ratos em tratamento com Abatacept (Aumento: 200x; Barra = 100 μ m).

O grupo salina apresentou escores para IL-6 baixos ao longo de todo o protocolo ($p=0,587$). Os grupos ABA 3,2 ($p=0,012$) e ABA 8 ($p=0,031$) apresentaram redução dos escores a partir do 21 $^{\circ}$ dia, e o grupo ABA 20 demonstrou escores altos ao longo de todo o curso temporal sem variação significativa ($p=0,589$) apresentaram escores

elevados ao longo de todo o protocolo. No 3º dia os grupos ABA 8 (3, 3-3) e ABA 20 (3, 3-3) mostraram escores significativamente superiores comparados ao grupo salina. Nos 7º, 14º e 21º dias, todos os grupos tratados com abatacept exibiram escores significativamente mais altos para IL-6 que o grupo salina (Figura 10, Tabela 6).

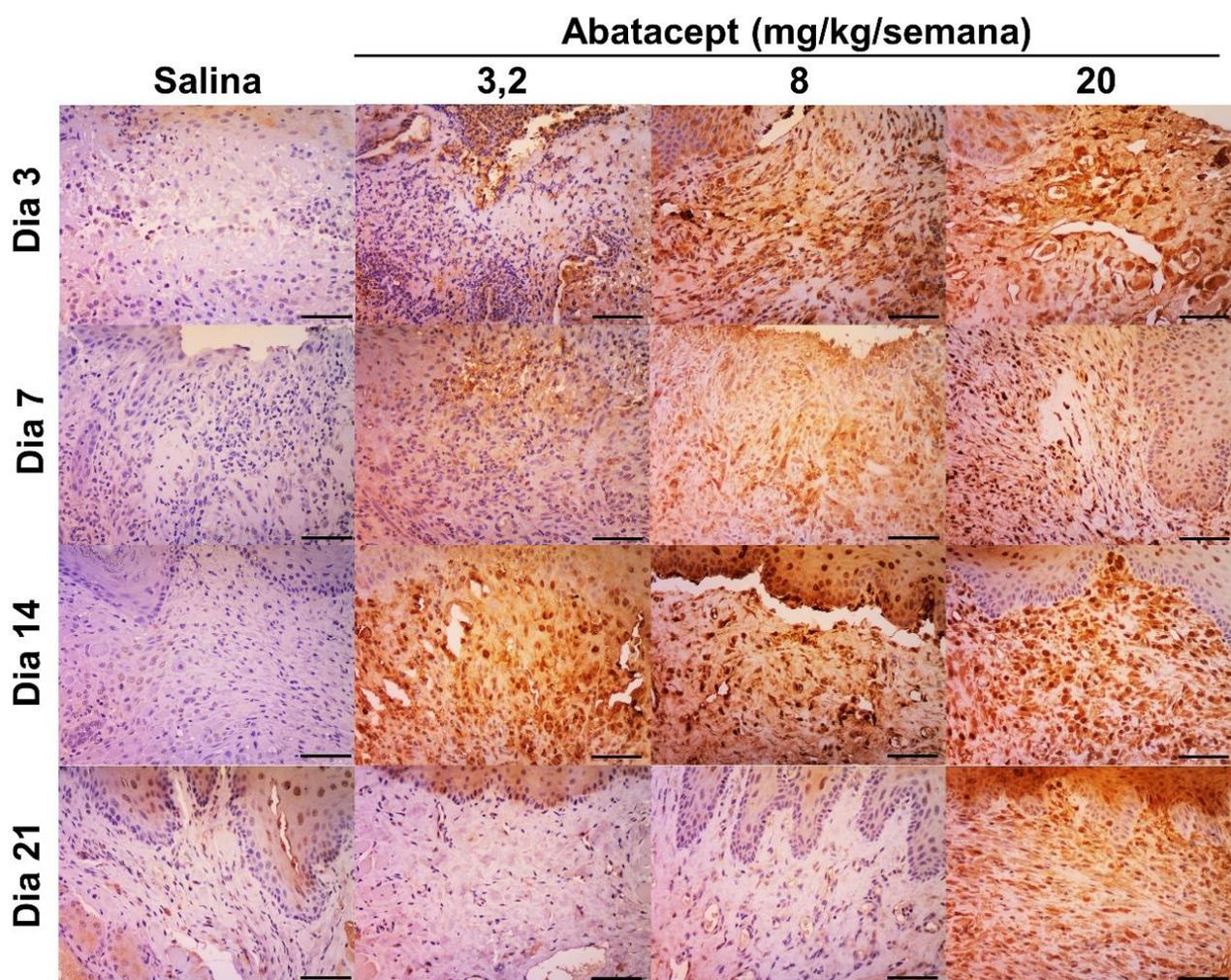


Figura 10: Imunoexpressão para IL-6 em mucosa jugal ulcerada de ratos em tratamento com Abatacept. (Aumento: 200x; Barra = 100 µm).

O grupo salina mostrou baixa expressão para IL-10 no 3º (2, 1-3) e 7º (2, 2-3) dia, com aumento significativo apenas a partir do 14º dia (3, 3-3) ($p=0,020$), enquanto os grupos tratados com abatacept não mostraram variação significativa dos escores para este marcador ao longo do curso temporal. Os escores para IL-10 dos grupos tratados com abatacept mostraram-se significativamente superiores no 3º e 7º dia (medianas = 3) após a ulceração em relação ao grupo salina ($p=0,026$ e $p=0,016$, respectivamente). Não houve diferença significativa na expressão para IL-10 entre os grupos no 14º e 21º dia (Figura

11, Tabela 6).

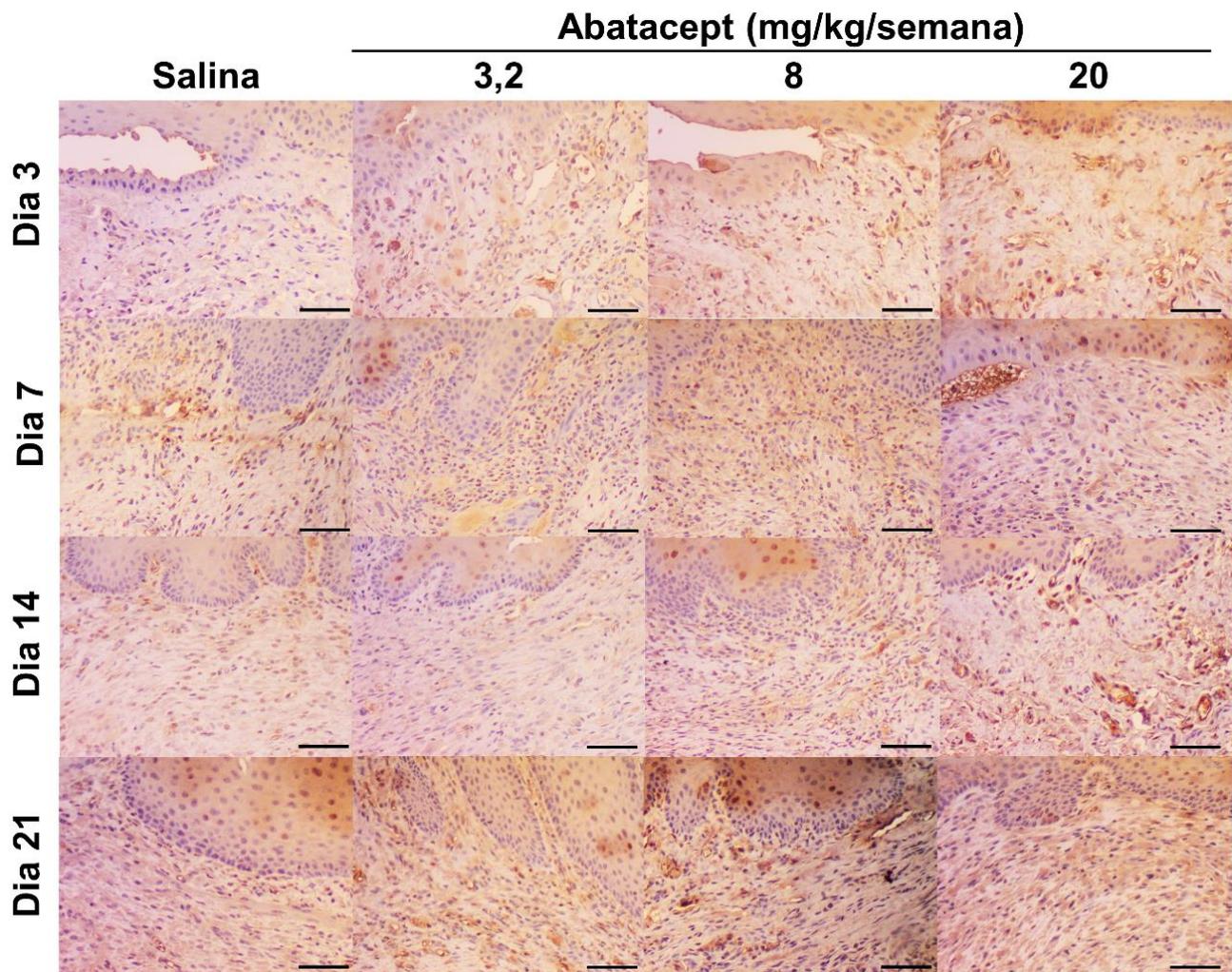


Figura 11: Imunoexpressão para IL-10 em mucosa jugal ulcerada de ratos em tratamento com Abatacept (Aumento: 200x; Barra = 100 μ m).

Tabela 6: Escores de imuno-histoquímica para marcadores inflamatórios no tecido conjuntivo de ratos tratados com Abatacept em diferentes doses e submetidos a modelo de úlcera oral.

	Dias				<i>p-Valor</i>
	3	7	14	21	
iNOS					
Salina	3 (3-3)	3 (2-3)	3 (2-3)	2 (2-3) [†]	0,006
ABA 3,2	3 (2-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	1 (1-3) [†]	0,002
ABA 8,0	3 (2-3)	3 (2-3)	3 (2-3)	1 (1-2) [†]	0,013
ABA 20,0	3 (1-3)	3 (2-3)	3 (0-3)	3 (2-3)**	0,586
<i>p-Valor</i>	0,288	0,697	0,724	0,026	
IL-1β					
Salina	3 (3-3)	3 (2-3)	2 (0-2) [†]	0 (0-1) [†]	<0,001
ABA 3,2	3 (3-3)	3 (2-3)	2 (0-3) [†]	1 (0-2) [†]	0,002
ABA 8,0	3 (3-3)	3 (3-3)	2,5 (1-3)	2 (1-3) [†]	0,047
ABA 20,0	3 (3-3)	3 (2-3)	3 (2-3)*	3 (3-3)*	0,099
<i>p-Valor</i>	1,000	0,752	0,007	0,011	
IL-6					
Salina	2 (0-3)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	0,587
ABA 3,2	2 (1-3)	3 (2-3)*	3 (2-3)*	1 (1-3) [†] *	0,012
ABA 8,0	3 (3-3)*	3 (3-3)*	3 (3-3)*	2,5 (2-3) [†] *	0,031
ABA 20,0	3 (3-3)*	3 (3-3)*	3 (3-3)*	3 (2-3)*	0,589
<i>p-Valor</i>	0,040	<0,001	0,003	0,004	
IL-10					
Salina	2 (1-3)	2 (2-3)	3 (3-3) [†]	3 (3-3) [†]	0,020
ABA 3,2	3 (1-3)*	3 (2-3)*	3 (2-3)	3 (2-3)	0,504
ABA 8,0	3 (2-3)*	3 (3-3)*	3 (2-3)	3 (3-3)	0,554
ABA 20,0	3 (1-3)*	3 (3-3)*	3 (1-3)	3 (3-3)	0,253
<i>p-Valor</i>	0,026	0,016	0,451	0,993	

Dados expressos em forma de mediana (mínimo - máximo); [†]p<0,05 versus dia 3; *p<0,05 versus grupo salina no mesmo dia; **p<0,05 versus grupo ABA 3,2 e ABA 8 Teste de Kruskal-Wallis/Dunn. ABA = Abatacept. 0 = 0% de células marcadas; 1 = 1-33% de células marcadas; 2 = 34-66% de células marcadas; 3 = 67-100% de células marcadas (Brizeno *et al.*, 2016).

Ensaio de permeabilidade vascular

O grupo salina apresentou elevado extravasamento relativo de proteínas no 1º, 3º e 7º dia após a ulceração, havendo redução significativa deste parâmetro a partir do 14º dia após a ulceração ($p<0,001$). O ABA 8 não mostrou variação significativa na permeabilidade vascular ao longo do curso temporal ($p=0,094$), com valores significativamente inferiores ao grupo controle no 1º, 3º e 7º dia após a indução da úlcera ($p<0,001$) (Figura 12).

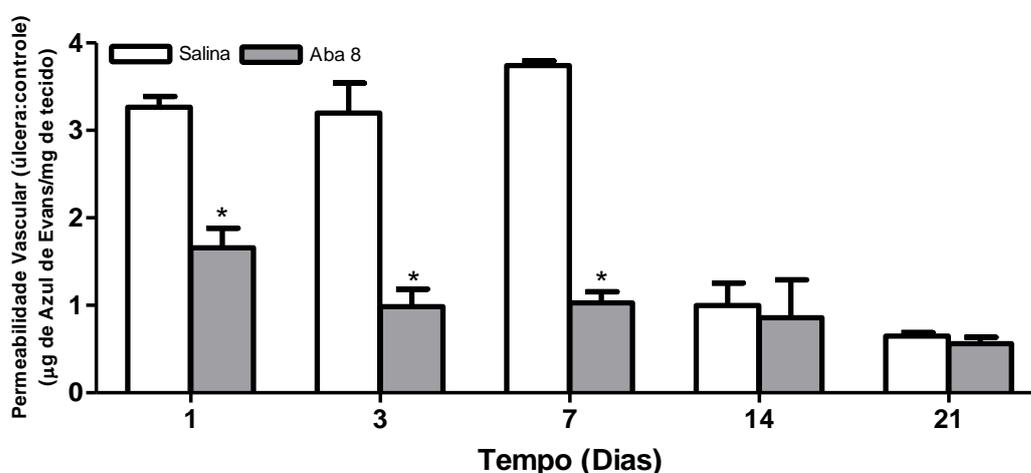


Figura 12: Ensaio de permeabilidade vascular por Azul de Evans em ratos tratados com Abatacept submetidos a modelo de úlcera traumática em mucosa jugal.

* $p<0,05$, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (Média±EPM). ABA = ABATACEPT.

Análise hematológica

O grupo ABA 8mg/kg/semana apresentou antes da indução das úlceras maior número médio de leucócitos totais circulantes (9750 ± 317) em relação ao grupo salina (7867 ± 420) ($p=0,012$). Esse aumento ocorreu devido ao elevado número de neutrófilos (1601 ± 32 versus 691 ± 188 , $p=0,005$) e linfócitos (7995 ± 260 versus 6798 ± 415 , $p=0,023$) circulantes. O número médio de eosinófilos (Salina = 53 ± 33 ; ABA 8 = 52 ± 430 ; $p=0,981$) e monócitos (Salina = 48 ± 15 ; ABA 8 = 103 ± 59 ; $p=0,317$) circulantes não diferiu significativamente entre os grupos.

Discussão

No presente estudo pôde-se observar que, apesar de não haver diferença significativa da variação de massa corpórea entre os quatro grupos experimentais, a avaliação clínica demonstrou redução da área de úlcera mais intensa nos grupos tratados com abatacept de forma dose dependente. Esse avanço no reparo tecidual foi associado ao aumento da colagênese e redução do infiltrado inflamatório e da permeabilidade vascular. Porém, paradoxalmente, a análise histológica demonstrou que o grupo tratado com a maior dose mostrou retardo da cicatrização associado a elevados níveis de IL-1 β , IL-6 e iNOS.

As primeiras células inflamatórias que chegam no local lesionado (úlceras) são os neutrófilos, responsáveis pelo controle de infecções (PARK *and* BARBUL, 2004). No nosso estudo foi observado aumento do número de polimorfonucleares neutrófilos nas primeiras 24 horas nos grupos experimentais e redução gradual desse número. No entanto, no grupo ABA 20 esse número permaneceu baixo desde o início do protocolo, porque o abatacept modula negativamente a expressão de moléculas de adesão como ICAM1 (molécula de adesão celular 1), VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular 1) e E-selectina na superfície de células endoteliais (BONELLI *et al.*, 2013; CUTOULO *et al.*, 2015). Essa redução do infiltrado de células polimorfonucleares foi acompanhada da redução da permeabilidade vascular nos primeiros sete dias após a ulceração com o aumento de neutrófilos no sangue circulante.

Seguindo o processo cicatricial, migram para a região de úlcera células mononucleares como macrófagos (48 a 96 horas) e linfócitos T (cinco a sete dias) (PARK *and* BARBUL, 2004; WANG *et al.*, 2007; GLIM *et al.*, 2013). Um menor número de mononucleares foi observado nos grupos abatacept de maior dose no período de sete dias. Essa redução parece ocorrer devido ao papel da molécula CTLA4-Ig (abatacept) na alteração do formato celular dos monócitos que passam do formato poligonal para um formato arredondado, dificultando a transmigração dessas células. Além disso, também há redução da expressão das moléculas de adesão contribuindo com a redução da migração de mononucleares para o sítio inflamatório levando a manutenção de elevados níveis de linfócitos no sangue circulante (BONELLI *et al.*, 2013).

Simultaneamente a eventos celulares, a cicatrização é também dependente de eventos vasculares, como coagulação, extravasamento celular e angiogênese (HART, 2002; GLIM *et al.*, 2013). A coagulação inicia-se com a formação do tampão primário

através das plaquetas, que, juntamente com os mastócitos próximos aos vasos lesados, liberam histamina, bradicinina e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que são os principais responsáveis pela permeabilidade vascular, e o VEGF pela angiogênese (KVIETYS *and* GRANGER, 2012; GLIM *et al.*, 2013). Observamos em nosso estudo, no período de sete dias de avaliação, que o grupo ABA 3,2 apresentou maior número de vasos com relação ao grupo salina. Esse valor, entretanto, reduziu progressivamente nas demais doses, de forma que o grupo ABA 20, apresentou contagem significativamente menor que o grupo salina. A redução gradual do número de vasos neoformados se deve ao efeito do abatacept no bloqueio dos receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), previamente descrito por Cutoulo *et al.* em 2015. Segundo os autores, esse bloqueio ocorre de forma dose dependente, igualmente observado neste estudo. Tem-se sugerido ainda que esse mecanismo exerce ação compensatória com elevação da síntese de IL-1 β , IL-6 e TNF- α na tentativa de elevar a expressão de VEGF, realizado por macrófagos (KVIETYS *and* GRANGER, 2012), como observado nos grupos tratados com as maiores doses de abatacept.

O bloqueio de mediadores pró-angiogênicos pelo abatacept (CUTOULO *et al.*, 2015) também pode estar relacionado a redução da permeabilidade vascular. A permeabilidade vascular é inicialmente dependente de histamina, bradicinina e posteriormente do VEGF, produzidos principalmente por plaquetas e mastócitos. Em seguida, a permeabilidade passa a ser mais fortemente dependente de VEGF, produzido por macrófagos e células endoteliais, após estímulo de citocinas inflamatórias, aumentando a interdependência desse bloqueio de citocinas moduladas pelo abatacept (KVIETYS *and* GRANGER, 2012; GLIM *et al.*, 2013).

O abatacept não interferiu significativamente nos marcadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e iNOS) nos primeiros dias do processo inflamatório, aumentando, de forma dose dependente no final do protocolo experimental. Contrariamente, os níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória) estavam significativamente mais elevados no início do curso temporal, mantendo-se elevado de forma dose-dependente ao longo do protocolo experimental.

Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e a IL-6 são principalmente produzidas por macrófagos e estimulam células endoteliais a produzir mediadores pró-angiogênicos (KVIETYS *and* GRANGER, 2012), como a iNOS (VERA *et al.*, 1996). Com a redução do número de vasos de forma dose dependente, ocorre aumento compensatório da produção de óxido nítrico para ativação do Fator Nuclear kappa B (NF-

κ B) e angiogênese em células endoteliais (PABER *and* SESSA, 2007; KVIETYS *and* GRANGER, 2012).

É interessante notar que, apesar desse efeito antiangiogênico, nos grupos tratados com elevadas doses de abatacept houve aumento da deposição de colágeno. Infere-se que esses achados são decorrentes dos altos níveis de IL-10, pois essa citocina é produzida principalmente através da diferenciação de células Th 2 ou Treg e apresentam importante papel imunomodulador da atividade e número de fibroblastos e da deposição de colágeno (MAYNARD *et al.*, 2007).

Estudos prévios evidenciaram o papel de células Treg na cicatrização cutânea (NOSBAUM *et al.*, 2016) e associaram sua redução a doenças autoimunes (ALVAREZ-QUIROGA *et al.*, 2011) e ao desenvolvimento de úlceras aftosas recorrentes em seres humanos (LEWKOWICZ *et al.*, 2008). Também foi evidenciado que sua deficiência impacta negativamente na produção de IL-10 e TGF- β (Fator de Crescimento Transformante beta), relacionados com a imunomodulação da produção de fibroblastos e colágeno (MAYNARD *et al.*, 2007), e seu efeito positivo na produção de receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR) (NOSBAUM *et al.*, 2016).

Apesar de o abatacept exercer ação inibitória em LT (RUDERMAN *and* POPE, 2006), tem sido demonstrado que ele não altera a quantidade de células Treg (RAZMARA *et al.*, 2008; KO *et al.*, 2010) mas sim sua atividade (ALVAREZ-QUIROGA *et al.*, 2011), levando ao aumento da síntese de citocinas como IL-10 e transposição para uma resposta Th2 (MAYNARD *et al.*, 2007). Mesmo sem variação significativa no número de LTCD8⁺ e LTCD30⁺ ao longo do curso temporal nos grupos experimentais, foi observada redução significativa da relação entre o número de células CD8⁺/CD30⁺ nos grupos tratados com abatacept no terceiro dia após ulceração. O balanço da atividade Th1 (CD8) \rightarrow Th2 (CD30) está diretamente associado ao aumento da produção de IL-10 (PELLEGRINI *et al.*, 2003) e de deposição de colágeno (SZIKSZ *et al.*, 2015), conforme visto neste estudo.

O controle da síntese de citocinas pró-inflamatórias pode acelerar o processo de cicatrização tecidual e fibrose (WATANABE *et al.*, 2014), como visto nesse estudo. Porém, a supressão desses mediadores provocada por modulação Th1 \rightarrow Th2 de forma excessiva suprime o reparo levando ao aumento compensatório dos mediadores pró-inflamatórios e moléculas vasoativas tardiamente (OLIVEIRA *et al.*, 2016) retardando a cicatrização tecidual.

Conclusão

O tratamento com Abatacept reduziu o diâmetro da úlcera, a migração de células inflamatórias, a relação CD8⁺/CD30⁺ e a permeabilidade vascular e aumentou a colagênese e a expressão de IL-10 no início do protocolo. Porém, na maior dose (ABA 20), houve retardo do reparo, redução do número de vasos e prolongamento da expressão de iNOS, IL-1 β e IL-6.

Referências

- Agaiy ADA, Dyson M (1999). Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. *J Anat* **195**: 531–42.
- Álvarez-Quiroga C, Abud-Mendoza C, Doníz-Padilla L, *et al* (2011). CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* **31**: 588–595.
- Bigbee CL, Gonchoroff DG, Vratsanos G, Nadler SG, Haggerty HG, Flynn JL (2007). Abatacept treatment does not exacerbate chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Arthritis Rheum* **56**: 2557–2565.
- Bonelli M, Ferner E, Göschl L, *et al* (2013). Abatacept (CTLA-4IG) treatment reduces the migratory capacity of monocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **65**: 599–607.
- Brizeno AL, Assreuy AMS, Alves APNN, *et al* (2016). Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model : Implication of. *Life Sci* **155**: 36–47.
- Cavalcante GM, Paula RJS de, Souza, LP de (2011). Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cir. Bras.* **26**: 227-234.
- Compilato D, Cirillo N, Termine N, *et al* (2009). Long-standing oral ulcers: Proposal for a new ‘S-C-D classification system’. *J Oral Pathol Med* **38**: 241–253.
- Cutolo M, Montagna P, Soldano S, *et al* (2015). CTLA4-Ig/CD86 interactions in cultured human endothelial cells: effects on VEGFR-2 and ICAM1 expression. *Clin Exp Rheumatol* **33**: 250–254.
- Davis PA, Corless DJ, Aspinall R, Wastell C (2001). Effect of CD4⁺ and CD8⁺ cell depletion on wound healing. *Br J Surg* **88**: 298–304.
- de Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, *et al* (1996). Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1054–1059.
- Fishel Rs, Barbul A, Beschorner We (1998). Lymphocyte Function In Wound Healing And Following Injury. *Br J Surg* **85**: 444–60.

- Hart J (2002). Inflammation 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care* **11**: 205–209.
- Keen D (2008). A review of research examining the regulatory role of lymphocytes in normal wound healing. *J Wound Care* **17**: 218–220, 222.
- Kliwinski C, Kukral D, Postelnek J, *et al* (2005). Prophylactic administration of abatacept prevents disease and bone destruction in a rat model of collagen-induced arthritis. *J Autoimmun* **25**: 165–171.
- Ko HJ, Cho M La, Lee SY, *et al* (2010). CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population. *J Autoimmun* **34**: 111–120.
- Kvietys P, Granger D (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med* **52**: 556–592.
- Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, *et al* (2008). Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* **37**: 454–461.
- Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* **174**: 561–9.
- Linsley PS, Golstein P (1996). Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. *Curr Biol* **6**: 398–400.
- Lon HK, Liu D, Dubois DC *et al.* (2013) Modeling Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics of Abatacept and Disease Progression in Collagen-Induced Arthritic Rats - A Population Approach. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **40**: 701–712.
- Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, *et al* (2007). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* **8**: 931–941.
- Nair AB, Jacob S (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy* **7**: 27-31.
- Nosbaum A, Prevel N, Truong H-A, *et al* (2016). Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. *J Immunol* **196**: 2010–2014.
- Oliveira BV, Barros Silva PG, Nojosa J, *et al.* (2016). TNF-alpha expression, evaluation of collagen, and TUNEL of *Matricaria recutita* L. extract and triamcinolone on oral ulcer in diabetic rats. *J Appl Oral Sci* **24**:278-90.
- Östör AJK (2008). Abatacept: A T-cell co-stimulation modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* **27**: 1343–1353.
- Park JE, Barbul A (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* **187**: 2–7.

- Pawlak E, Kochanowska IE, Frydecka I, Kielbiński M, Potoczek S, Bilińska M (2005). The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**: 336–41.
- Pellegrini P, Berghella AM, Contasta I, Adorno D (2003). CD30 antigen: Not a physiological marker for TH2 cells but an important costimulator molecule in the regulation of the balance between TH1/TH2 response. *Transpl Immunol* **12**: 49–61.
- Pober JS, Sessa WC (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**:803-15.
- Razmara M, Hilliard B, Ziarani AK, Chen YH, Tykocinski ML (2008). CTLA-4 x Ig converts naive CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ regulatory T cells. *Int Immunol* **20**: 471–83.
- Romo-Tena J, Gómez-Martín D, Alcocer-Varela J (2013). CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmun Rev* **12**: 1171–1176.
- Ruderman EM, Pope RM (2006). Drug insight: Abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**: 654–660.
- Sziksz E, Pap D, Lippai R, *et al* (2015). Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm* **2015**.
- Wang J, Jiao H, Stewart TL, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE (2007). Increased TGF- β -producing CD4+ T lymphocytes in postburn patients and their potential interaction with dermal fibroblasts in hypertrophic scarring. *Wound Repair Regen* **15**: 530–539.
- Watanabe H, Numata K, Ito T, *et al.* (2004). Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* **22**: 460-466.

5. Conclusão Geral

O abatacept acelera a cicatrização de úlceras orais através de redução da migração de células inflamatórias, mas sobredoses desse fármaco levam ao retardo do reparo e prolongamento da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K; FAUSTO, Nelson; KUMAR, Vinay; COTRAN, Ramzi S; ASTER, Jon C; ROBBINS, Stanley L.: Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

AGAIBY, A. D. A.; DYSON, M. Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. **Journal of anatomy**, v. 195, p. 531–42, 1999.

ALI, A. *et al.* CTLA4 immunoglobulin but not anti-tumor necrosis factor therapy promotes staphylococcal septic arthritis in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 8, p. 1308–1316, 2015.

ÁLVAREZ-QUIROGA, C. *et al.* CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of treg cells in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 31, n. 4, p. 588–595, 2011.

BIGBEE, C. L. *et al.* Abatacept treatment does not exacerbate chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 8, p. 2557–2565, 2007.

BRIZENO, L.A.C. *et al.* Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of. **Life Sciences**, v. 155, p. 36–47, 2016.

BONELLI, M. *et al.* Abatacept (CTLA-4IG) treatment reduces the migratory capacity of monocytes in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 3, p. 599–607, 2013.

CAVALCANTE, G. M. *et al.* Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 227-234, June 2011

COMPILATO, D. *et al.* Long-standing oral ulcers: Proposal for a new “S-C-D classification system”. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 38, n. 3, p. 241–253, 2009.

CUTOLO, M. *et al.* CTLA4-Ig/CD86 interactions in cultured human endothelial cells: effects on VEGFR-2 and ICAM1 expression. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. March 2015, p. 250–254, 2015.

DAVIS, P. A. *et al.* Effect of CD4⁺ and CD8⁺ cell depletion on wound healing. **British Journal of Surgery**, v. 88, n. 2, p. 298–304, 2001.

DE VERA, M. E. *et al.* Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 3, p. 1054–1059, 1996.

DUTZAN, N. *et al.* Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 5, p. 1163–1172, 2016

FISHEL, R.S, BARBUL, A., BESCHORNER, W.E. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **The British journal of surgery**, v. 85, n. 4, p. 444–60, 1998.

FREEMAN, G.J. *et al.* CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. **J Immunol.** v.149; p.3795-3801. 1992.

GLIM, J. E. *et al.* Detrimental dermal wound healing: What can we learn from the oral mucosa? **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 5, p. 648–660, 2013.

HART, J. Inflammation 1: Its role in the healing of acute wounds. **Journal of wound care**, v. 11, n. 6, p. 205–209, 2002.

IWAHASHI, C. *et al.* CTLA4-Ig suppresses development of experimental autoimmune uveitis in the induction and effector phases: Comparison with blockade of interleukin-6. **Experimental Eye Research**, v. 140, p. 53–64, 2015.

KEEN, D. A review of research examining the regulatory role of lymphocytes in normal wound healing. **Journal of wound care**, v. 17, n. 5, p. 218–220, 222, 2008.

KLIWINSKI, C. *et al.* Prophylactic administration of abatacept prevents disease and bone destruction in a rat model of collagen-induced arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 3, p. 165–171, 2005.

KO, H. J. *et al.* CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 2, p. 111–120, 2010.

KREMER, J. M. *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator abatacept: Twelve-month results of a phase IIb, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 8, p. 2263–2271, 2005.

KVIETYS, P.; GRANGER, D. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 3, p. 556–592, 2012.

LEWKOWICZ, N. *et al.* Dysfunction of CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 8, p. 454–461, 2008.

LINSLEY, P. S. *et al.* CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. **J Exp Med**, v. 174, n. 3, p. 561–9., 1991.

LINSLEY, P. S.; GOLSTEIN, P. Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. **Current Biology**, v. 6, n. 4, p. 398–400, 1996.

LON, H.K. *et al.* Modeling Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics of Abatacept and Disease Progression in Collagen-Induced Arthritic Rats - A Population Approach. **J Pharmacokinetic Pharmacodyn.** N. 40, v.6, p. 701–712, 2013.

LUCKHEERAM, R. V. *et al.* CD4⁺T cells: Differentiation and functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

MAYNARD, C. L. *et al.* Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. **Nature**

Immunology, v. 8, n. 9, p. 931–941, 2007.

MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552–80, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC – 136. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC – 136. Abatacept para o tratamento da Artrite Reumatóide Moderada a Grave- primeira linha de tratamento com biológicos após falha a MMCDs sintéticos. Outubro de 2014. Disponível em <http://conitec.gov.br/images/Relatorio_Abatacepte-1LinhaBiologico_CP.pdf> Acesso em: 26 de outubro. 2016

NAIR, A.B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**. v.7. 2016.

NOSBAUM, A. *et al.* Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 5, p. 2010–2014, 2016.

Anexo A – Seguimento do Regimento Interno

Art. 46 – As dissertações e as teses apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para

11

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação e a tese em formatos tradicionais ou formatos alternativos deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no sítio <http://www.biblioteca.ufc.br>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o *Manual de Normalização para Defesa de dissertação de Mestrado e tese de Doutorado no formato Alternativo do PPGO*, disponível no sítio <http://www.ppgq.ufc.br>.

Anexo B- Aprovação do comitê de ética em pesquisa animal



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ABATACEPT NO REPARO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS EM MUCOSAS JUGAL DE RATOS.**”, protocolo 118/16, sob responsabilidade de Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 20 de dezembro de 2016.

Vigência do projeto	01/2017 à 01/2018
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico/Wistar
Nº de Animais	200
Peso	180g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 22 de dezembro de 2016

Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734