



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

ANTONIO ERNANDO CARLOS FERREIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TERAPIA POR INFLIXIMABE NA
CICATRIZAÇÃO ÓSSEA DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS PÓS-EXODONTIA EM
RATOS.**

FORTALEZA

2016

ANTONIO ERNANDO CARLOS FERREIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TERAPIA POR INFLIXIMABE NA
CICATRIZAÇÃO ÓSSEA DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS PÓS-EXODONTIA EM
RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- F439a Ferreira Júnior, Antonio Ernando Carlos.
Avaliação da influência da terapia por infliximabe na cicatrização óssea de alvéolos dentários pós-exodontia em ratos / Antonio Ernando Carlos Ferreira Júnior. – Fortaleza, 2016.
81 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

1. Fator de Necrose Tumoral alfa. 2. Infliximab. 3. Remodelação Óssea. I. Título.

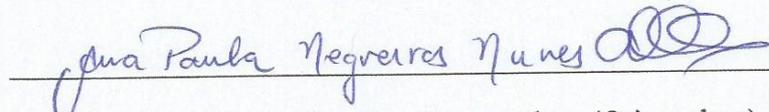
ANTONIO ERNANDO CARLOS FERREIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TERAPIA POR INFLIXIMABE NA
CICATRIZAÇÃO ÓSSEA DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS PÓS-EXODONTIA
EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Odontologia.

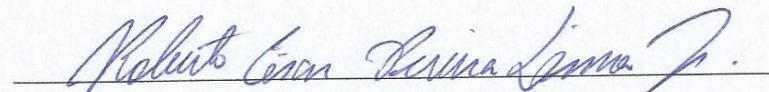
Aprovado em 19 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA



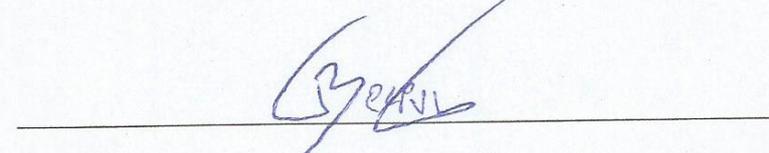
Prof. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Tácio Pinheiro Bezerra

Centro Universitário UniChristus (UniChristus)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concedidas e por todos os momentos em minha vida na qual esteve do meu lado, abençoando e guiando meus passos.

À minha família, principalmente aos meus pais, **Rita e Ernando**, pelo apoio em todos os momentos e amor incondicional, sendo meu maior exemplo de força e honestidade e responsáveis por todas as minhas vitórias.

À minha orientadora, **Professora Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, pelos grandes ensinamentos científicos, éticos, pessoais e morais transmitidos, fazendo-me ter profunda admiração profissional e pessoal. Também sou imensamente grato pela sua disponibilidade e palavras de incentivo. Agradeço a oportunidade que me foi dada desde o 4º semestre da faculdade, passando por monitorias, iniciação científica e projetos de extensão.

Ao **Professor Mário Rogério Lima Mota**, co-orientador, por toda a paciência em repassar conhecimento e apoio nos momentos mais difíceis. Sou imensamente grato por conviver ao lado de um ser humano impecavelmente inteligente, simples e acessível, e que não mede esforços em compartilhar o seu amplo conhecimento com grande empolgação.

Ao **Professor Fabrício Bitu Sousa**, co-orientador, pelos ensinamentos clínicos e científicos sempre com visão diferenciada e ponderada dos achados científicos. Obrigado pela confiança, oportunidades e carinho.

Aos meus grandes amigos de laboratório e pesquisa animal, **Paulo Goberlânio e Camila Oliveira**, por me auxiliarem em cada momento da vida acadêmica e pessoal. Nosso companheirismo e cumplicidade cresceram a cada dia e hoje posso considera-los como amigos raros que desejo levar por toda vida. Sou imensamente grato por toda a ajuda ofertada.

Aos **colegas e amigos** do Laboratório de Patologia Bucodental **Carol, Laryssa, Luan, Thinali, Isabelly, Clarissa, Artur, Mariana Araújo, Thâmara, Mariana Canuto, Breno, Ealber, Thales, Filipe, Erasmo e Malena**, pela amizade, companhia e troca de experiências.

Me sinto muito orgulhoso e grato de poder estar ao lado de profissionais tão renomados e inteligentes que fazem parte dessa equipe

Aos bolsistas de iniciação científica **Elisa, Gisele, Tasso, Lyria, Olavo, Celina, Lucas, Lara, Joyce dentre tantos outros** que passaram pelo laboratório. Sem o esforço e dedicação dessas pessoas esse trabalho e tantos outros não seriam possíveis. Sou grato por todos os momentos de trabalho, os quais foram transformados em instantes de alegria, leveza e descontração. Torço muito pelo sucesso de todos.

Aos companheiros da turma de mestrado composta por **Bruna, Luan, Jessica, Mariana Canuto, Ernanda, Vanessa, Breno, Nara, dentre outros** por compartilhar as alegrias e os anseios da vida de pós graduação e pelo auxílio nas mais diversas aulas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao técnico de laboratório **Alceu Machado** pela grande contribuição e ensinamentos nas etapas laboratoriais, cortes e montagem de lamínas histológicas.

Às alunas de pós-graduação em Ciências Médicas **Josyane e Dayse** pela imensa contribuição com reações e reagentes necessários ao desenvolvimento desse estudo.

Aos integrantes do **Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)**, bem como os monitores e alunos das disciplinas de **Patologia Bucal e Estomatologia Clínica** pelo aprendizado e confiança no meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos

RESUMO

A cicatrização óssea pós-exodontia depende de variáveis como técnica cirúrgica, fatores locais e sistêmicos e uso de substâncias farmacológicas. Os anti-inflamatórios podem alterar a reparação tecidual, interferindo na etapa inflamatória de cicatrização. O infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino, anti-Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) que tem sido amplamente utilizado em substituição aos corticosteroides na clínica reumatológica por possuir menos efeitos adversos em longo prazo. No entanto, a via TNF- α age diretamente na osteoclastogênese, podendo modificar a resposta fisiológica do *turnover* ósseo e sua inibição pode provocar imunossupressão, aumentando o risco de infecção local. Foi objetivo deste estudo avaliar a influência do infliximabe na cicatrização de alvéolos dentários pós-exodontias. Para tanto, 84 ratos Wistar (n=7) foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de estudo (infliximabe EV 5mg/kg ou salina EV 1ml/kg, pré tratados com 4 administrações semanais antes da exodontia, mantidas semanalmente até o dia do sacrifício). Os animais foram sacrificados 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. A ocorrência de fraturas radiculares, o tempo cirúrgico e o peso dos dentes extraídos foram anotados. No dia do sacrifício o peso dos animais e dos órgãos (fígado, baço, rins, estômago) foram aferidos. Após fixação em formol 10% tamponado e análise macroscópica, a mandíbula e fragmentos desses órgãos, seguiram para processamento histológico e estudo microscópico. As mandíbulas foram submetidas à avaliação radiográfica, histomorfométrica (dimensão da deposição de tecido conjuntivo cicatricial, percentual da área representada por tecido ósseo e número de polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos), histoquímica (Picrossirius Red) e imuno-histoquímica (TNF- α). Não foram vistas diferenças na aferição da área radiolúcida referente ao sítio pós-exodontia entre os grupos experimentais (p=0,646). Entretanto, na análise histomorfométrica, foi visualizado menor preenchimento por tecido ósseo bem como maior quantidade de tecido conjuntivo remanescente no grupo infliximabe, de forma significativa no 14º dia (p<0,001). Além disso, um menor número de polimorfonucleares neutrófilos no 3º (p< 0,01) e 7º dias (p<0,001), de mononucleares no 7º dia (p<0,01) e de osteoclastos no 7º e 14º dias (p<0,01 e p< 0,001, respectivamente) foi observado. Também foi verificada menor imunoexpressão de TNF- α nos sítios pós-exodontia nos dias 7,14, 21 e 28 (p<0,01; p<0,05, p<0,05 e p<0,01 respectivamente). Conclui-se que inibidores de TNF- α podem alterar a capacidade de reparo ósseo em sítios pós-exodontia. Estes achados sinalizam a necessidade de maiores precauções nos procedimentos odontológicos cruentos em pacientes sob terapia sistêmica desses fármacos.

Palavras-chave: TNF- α , infliximabe, remodelação óssea.

ABSTRACT

The bone healing after tooth extraction depends on variables such as surgical technique, local and systemic factors and use of pharmacological substances. Anti-inflammatory drugs can alter the tissue repair, interfering with the inflammatory phase of healing. Infliximab is a chimeric monoclonal antibody, human-murine anti-Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) which has been widely used in place of corticosteroids in rheumatology clinic because it has fewer side effects. However, TNF- α acts directly on osteoclastogenesis pathway, may modify the physiological response of bone turnover and its inhibition may lead to immunosuppression, increasing the risk of local infection. The objective of this study was to evaluate the influence of infliximab in extractions sockets healing. For this purpose, 84 Wistar rats (n = 7) were randomized into two study groups (infliximab EV 5mg / kg or saline EV 1ml / kg, pre-treated with 4 weekly administrations prior to extraction, weekly maintained until the day of sacrifice). The animals were sacrificed 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days after surgery. The occurrence of root fractures, surgical time and the weight of extracted teeth were noted. On the day of sacrifice, the animals and their organs weight (liver, spleen, kidney, stomach) were measured. After fixation in 10% formalin buffered and macroscopic analysis, jaw and fragments of these organs followed for histological processing and microscopic study. The jaws were subjected to radiographic, histomorphometric (size of the deposition of connective tissue, percentage of area represented by bone tissue and number of polymorphonuclear, mononuclear and osteoclasts cells), histochemistry (Picrosirius Red) and immunohistochemistry (TNF- α). No differences were seen in determining the radiolucent area related to post-extraction site between the experimental groups (p = 0.646). However, the lower histomorphometric analysis was viewed by filling bone tissue as well as increased amount of remaining tissue in the infliximab group at 14 days significantly (p <0.001). In addition, smaller scores of polymorphonuclear neutrophils were seen at the day 3 (p <0.01) and day 7 (p <0.001) lower mononuclear count on the 7th day (p <0.01) and osteoclasts in the 7th and 14th days (p <0.01 and p <0.001, respectively). It also observed lower TNF- α immunoreactivity in the post-extraction sites on days 7,14,21 and 28 days (p <0.01; p <0.05, p <0.05 and p <0.01 respectively). Thus, it is suggested that TNF- α inhibitors could also change the capacity in bone repair after tooth extraction. These findings could signal the need for further precautions in dental procedures in patients undergoing systemic therapy of these drugs.

Keywords: TNF-alfa, infliximab, bone remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos dias de experimento de acordo com os procedimentos realizados.	21
Figura 2. Processo de preparação das imagens para análise histomorfométrica.	25
Figura 3. Aspectos radiográficos dos sítios de exodontia dos animais salina (A, C, E, G, I, K) e tratados com infliximabe (B, D, F, H, J, L), em diferentes dias.	35
Figura 4. Aspectos histopatológicos dos sítios de exodontia dos animais salina (A, C, E, G, I, K) e tratados com infliximabe (B, D, F, H, J, L).	Erro! Indicador não definido.
Figura 5. Área sob a curva da marcação por colágeno total (vermelho), tipo I (amarelo) e tipo III (verde) de alvéolos pós-exodontia do 1º molar inferior de animais tratados com infliximabe ou salina.	46
Figura 6. Fotomicrografias de alvéolos dentários pós-exodontia do 1º molar inferior em animais tratados com infliximabe ou salina nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28.	47
Figura 7. Imunomarcação de TNF- α em alvéolos pós-exodontia do 1º molar inferior..	50
Figura 8. Fotomicrografia da região de cárdia do estômago dos animais tratados com infliximabe ou salina.	57
Figura 9. Fotomicrografia da mucosa do fundo/corpo do estômago.	58
Figura 10. Fotomicrografia do fígado dos animais tratados com infliximabe ou salina..	59
Figura 11. Fotomicrografia do rim dos animais tratados com infliximabe ou salina,....	60
Figura 12. Fotomicrografia do baço dos animais tratados com infliximabe ou salina,..	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da dificuldade cirúrgica (massa dos dentes, número de fraturas e tempo cirúrgico) dos animais submetidos a exodontia do 1º. molar inferior.	33
Tabela 2. Número de células positivas para expressão TNF- α nos alvéolos dentários pós-exodontia em diferentes dias.	49
Tabela 3. Análise de área sob a curva de parâmetros relacionados a cicatrização pós-exodontia.	51
Tabela 4. Frequência da presença de material basofílico consistente com colônias bacterianas nos sítios pós-exodontia.	52
Tabela 5. Índice dos órgãos fígado, estômago, baço e rins dos animais submetidos a exodontia do 1º molar inferior tratados com infliximabe ou salina.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Artrite reumatoide
BMP	Proteína óssea morfogenética
CTM	Célula tronco mesenquimal
DAB	Diamino benzidina
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
EV	Endovenosa
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GDF	Fator de crescimento e diferenciação
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
JNK	c-Jun N-terminal protein kinases
NF-κB	Fator nuclear kappa B
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato-salino
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
RANKL	Ligante de Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
tmTNF	Fator de necrose tumoral transmembrana
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	12
1.2 Remodelação óssea.....	13
1.3 Infiximabe	18
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais, grupos e doses	21
3.2 Protocolo experimental e Análise da Dificuldade Cirúrgica.....	22
3.3 Eutanásia e coleta das amostras.....	22
3.4 Confeção de lâminas histológicas.....	22
3.5 Análise microscópica descritiva e histomorfométrica.....	23
3.5.1 Análise descritiva dos sítios pós-exodontia.....	23
3.5.2 Contagem do número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos.....	23
3.5.3 Análise do percentual da área representada por tecido ósseo.....	24
3.5.4 Análise da dimensão de deposição de tecido conjuntivo cicatricial.....	24
3.6 Análise histoquímica	26
3.6.1 Coloração de Picrosirius Red	26
3.7 Ensaio e análise da dosagem de Mioleperoxidase (MPO)	27
3.8 Análise Radiográfica	27
3.9 Processamento e avaliação imunohistoquímica	28
3.10 Análise da variação de massa corpórea	28
3.11 Análise dos parâmetros de toxicidade relacionados à administração de infliximabe... 28	
3.11.1 Índice hepático, renal, esplênico e gástrico	28
3.11.2 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço	29
3.12 Análise estatística	31
3.13 Aspectos Éticos	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Análise da Dificuldade Cirúrgica da exodontia do 1º molar inferior	32
4.2 Análise Radiográfica Digital das mandíbulas	34
4.3 Análise histológica descritiva dos sítios pós-exodontia	36
4.4. Contagem do número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos.....	38
4.5 Análise do percentual de preenchimento por tecido ósseo e conjuntivo.....	41
4.6 Análise da coloração de Picrosirius Red.....	43

4.7 Ensaio e dosagem de Mieloperoxidase (MPO)	48
4.8 Avaliação Imunohistoquímica	49
4.9 Avaliação da área sob a curva dos parâmetros relacionados a cicatrização dos alvéolos pós-exodontia	51
4.10 Avaliação da presença de colônias bacterianas	52
4.11.1 Análise da variação de massa corpórea	53
4.11.2 Análise dos índices dos órgãos	54
4.11.3 Análise histopatológica dos órgãos	54
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	71
ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

A cicatrização tecidual óssea pós-exodontia depende de variáveis como técnica cirúrgica, fatores locais e sistêmicos, condições gerais do paciente e uso de agentes farmacológicos. Drogas anti-inflamatórias podem alterar a reparação tecidual, interferindo na etapa inflamatória de cicatrização (FREITAS et al., 2007; JOSEPH PIECUCH, 2012).

O TNF- α é definido como uma proteína trimérica, secretada por diversos grupos celulares, incluindo monócitos e macrófagos e desempenha um papel fundamental em doenças ósseas degenerativas como mediador da destruição tecidual (SANDROS et al., 2000; LIN et al., 2007). Nos macrófagos, está relacionada com a resposta imunológica à outras citocinas, bactérias, vírus e parasitas, e, ao estímulo de outros mediadores. Auxilia os leucócitos em sua capacidade de adesão às células endoteliais, aumentando a capacidade de fagocitose e a quimiotaxia (LIN et al., 2007).

Foi descoberto em 1975 por CARSWEL et al. e assim denominada devido a sua atividade em provocar necrose tumoral *in vivo*, quando injetado em ratos portadores de tumores.

O papel deste mediador na cicatrização tecidual é amplo, estando presente desde a fase inicial inflamatória da cicatrização. Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , demonstram respostas sinérgicas ou antagônicas em relação à cicatrização (interferindo no processo inflamatório e na fase de deposição do colágeno), dependendo da sua concentração (BAKER et al., 2006). Além disso, esta citocina está também relacionada com a hiperalgesia dos estados inflamatórios, agindo por dois mecanismos: o primeiro seria pela indução de ciclo-oxigenase 2 e a síntese subsequente de eicosanoides através da liberação de interleucina (IL)-1 β ; o segundo, através de indução da produção de aminas simpaticomiméticas via interleucina-8. Dependendo da intensidade e da natureza dos estímulos, a liberação de TNF- α é precedida pela formação de bradicinina (RIBEIRO et al., 2000).

Acrescentam-se, ainda, o papel na atividade antitumoral, imunomodulação, caquexia, choque séptico, hematopoiese, replicação viral e inflamação. (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; ISHIMURA et al., 2002; BAKER et al., 2006).

1.2 Remodelação óssea

A remodelação óssea é um fenômeno que ocorre fisiologicamente, sendo fundamental para a renovação do esqueleto e manutenção de sua qualidade. Nele, a reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes orquestrados pelas células do tecido ósseo (osteoclastos, osteoblastos e osteócitos). Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (HANLEY et al., 2000).

Entretanto, na presença de traumas do tecido ósseo, o processo de remodelação é requerido de maneira especial, com o objetivo de restabelecimento da estrutura defeituosa e suporte as cargas mecânicas (AL-AQL et al., 2008).

O processo de remodelação óssea com objetivo de reparo decorre em três etapas principais: 1) resposta inflamatória imediata, a qual leva a um recrutamento de células tronco mesenquimais e posterior diferenciação em osteoblastos, com produção de matriz orgânica extracelular ou osteoide, 2) a mineralização da matriz com formação de osso e 3) a remodelação óssea com reabsorção do osso neoformado para restauração da estrutura anatômica e suporte adequado às cargas mecânicas. (CANHÃO et al., 2005).

Imediatamente após um trauma ósseo, como em exodontias, ocorre a formação de um hematoma que é constituído por células do sangue periférico e intramedulares, bem como células da medula óssea. A lesão inicia uma resposta inflamatória, necessária para o processo de cicatrização. A resposta inflamatória, conjuntamente com o hematoma coagulado entre e ao redor das extremidades do defeito ósseo e dentro da medula, formam um modelo para a formação do calo ósseo, um tecido fibroso reparador onde será depositada a matriz óssea. (GERSTENFELD et al., 2003).

Embora se tenha conhecimento de que uma expressão prolongada e crônica de citocinas inflamatórias tem um efeito negativo no osso, nas articulações e em presença de materiais implantados, uma secreção rápida e bem regulada de moléculas pró-inflamatórias após uma lesão aguda é fundamental para a reparação do tecido (GERSTENFELD et al., 2003).

A resposta pró-inflamatória inicial envolve a secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e de interleucinas como IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18, por macrófagos, células inflamatórias e células de origem mesenquimais (GERSTENFELD et al., 2003). Esses fatores recrutam células inflamatórias, aumentam a síntese da matriz extracelular e estimulam a angiogênese (SFEIR et al. 2005). O pico de concentração dessas citocinas pode ser observado

com 24 horas e essas retornam aos valores normais dentro de 72 horas após o trauma (CHO et al., 2002; GERSTENFELD et al., 2003). Durante esse período de tempo, o TNF- α é expresso por macrófagos e outras células inflamatórias, e acredita-se que esse efeito seja mediado pela indução de sinais inflamatórios secundários, atuando como um agente quimiotático (KON et al., 2001).

Além de estimular a função dos osteoclastos, o TNF- α promove o recrutamento de células-tronco mesenquimais (CTMs) e induz a apoptose de condrócitos hipertróficos durante a formação óssea endocondral. Atrasos ou ausência da reabsorção da cartilagem mineralizada ou do tecido fibroso reparador, consequentemente, impedem a formação óssea. Em situações em que o TNF- α está expresso de forma abundante, como na cicatrização de diabéticos, ocorre uma formação tardia do calo ósseo, que está associada com deficiência na cicatrização e deposição óssea (KAYAL et al., 2007).

O TNF- α , também, *in vitro*, induz diferenciação osteogênica de CTMs (CHO et al., 2006). Esses efeitos são mediados pela ativação de dois receptores, TNFR1 e TNFR2, ambos presentes em osteoblastos e osteoclastos. No entanto, o TNFR1 sempre é expresso no osso enquanto que o TNFR2 é visualizado somente após uma lesão, sugerindo um papel mais específico na regeneração óssea (KON et al., 2001; BALGA, 2006).

Entre as diferentes interleucinas, acredita-se que a IL-1 e IL-6 sejam as mais importantes na cicatrização óssea. A IL-1 é produzida por macrófagos na fase aguda da inflamação e induz a síntese de IL-6 nos osteoblastos, promovendo a produção do calo cartilaginoso primário nos modelos endocondrais, bem como a angiogênese no local da injúria, através da ativação de um dos seus dois receptores, IL-1RI ou IL-1RII (KON et al., 2001; SFEIR et al., 2005; LEE & LORENZO, 2006). A IL-6 também é produzida durante a fase aguda, estimulando a angiogênese, a produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos (YANG et al., 2007).

Também são citadas como citocinas importantes no processo de cicatrização óssea as derivadas da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) tais como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento e diferenciação (GDFs) (CHO et al., 2002). As BMPs são produzidas por células mesenquimais, osteoblastos e condrócitos, estando envolvidas em processos celulares como quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células mesenquimais, angiogênese e síntese da matriz extracelular (REDDI, 2001). Tem sido proposto que as BMPs -2, -6 e -9 podem ser os indutores mais potentes da diferenciação de células mesenquimais

para osteoblastos, enquanto as BMPs -4, -6, -7 e -9 parecem promover a estimulação da osteogênese em osteoblastos maduros (CHENG et al., 2003).

A formação do calo ósseo é dependente do recrutamento de CTMs dos tecidos moles adjacentes, córtex, periósteo e medula óssea, bem como da mobilização sistêmica de células-tronco hematopoiéticas. Uma vez recrutadas, uma cascata molecular produz matriz de colágeno tipo I e de colágeno tipo II e sinaliza a participação de várias moléculas de peptídeos. Neste processo os integrantes da família do TGF- β têm se mostrado de grande importância. O TGF- β 2, TGF- β 3 e GDF-5 estão envolvidos na fibrogênese e condrogênese na ossificação endocondral, enquanto que as BMP-5 e BMP-6 podem induzir proliferação celular do periósteo local na ossificação intramembranosa (CHO et al., 2002; MARSELL & EINHORN, 2009). Além disso, a BMP-2 tem se mostrado crucial no início do processo de cicatrização, como observado em camundongos com mutações inativadoras de BMP-2 que não são capazes de formar calos, impedindo a cicatrização das fraturas (TSUJI et al., 2006).

Em modelos animais (ratos, coelhos e camundongos) o início de formação de calos ósseos ocorre em 7-9 dias após o trauma, com um aumento de procolágeno tipo II e de marcadores nucleares de proteoglicanos de proteínas extracelulares (EINHORN, 1998). A resposta subperiosteal de ossificação intramembranosa ocorre diretamente adjacente às extremidades distais do trauma, formando um calo ósseo resistente. A transição dessa formação da periferia para o centro da fratura, fornece uma estrutura semi-rígida que permite a sustentação do peso (GERSTENFELD et al., 2006).

O pico de formação do calo ósseo é atingido geralmente em 14 dias em modelos animais, conforme definido pela histomorfometria de tecido mineralizado, mas também pela mensuração de marcadores de matriz extracelular, como o colágeno tipo I, osteocalcina, fosfatase alcalina e osteonectina (EINHORN, 1998). Gradualmente, esse tecido é substituído por osso esponjoso e se torna mais sólido e mecanicamente rígido (GERSTENFELD et al., 2006).

Embora o calo ósseo seja uma estrutura que proporcione certa estabilidade biomecânica, ele não restaura completamente as propriedades biomecânicas do osso normal. Para alcançar isso, o processo de cicatrização inicia uma nova fase de reabsorção, desta vez para remodelar o tecido neorformado e substituí-lo uma estrutura de osso lamelar com uma cavidade central medular (GERSTENFELD et al., 2003). Esta fase é bioquimicamente ativada principalmente por IL-1 e TNF- α , que mostram altos níveis de expressão. Em contrapartida, os integrantes da família TGF- β parecem diminuir sua expressão nesse período (AI-AQL et al., 2008).

O processo de remodelação é realizado por um difícil equilíbrio de reabsorção do calo pelos osteoclastos, e deposição de osso lamelar pelos osteoblastos. Embora o processo tenha início em torno de três a quatro semanas em modelos animais e humanos, a remodelação pode levar anos para ser completada e alcançar uma estrutura óssea totalmente regenerada. O processo pode ocorrer mais rapidamente em animais e pacientes jovens (EINHORN, 1998; GERSTENFELD et al., 2003).

O processo de diferenciação das células da linhagem osteoclástica é controlado pelas células osteoblásticas, através de um eixo de regulação comum, conhecido por RANKL (Ligante do Receptor de Ativação do Fator Nuclear Kappa B) /RANK (Receptor de Ativação do Fator Nuclear Kappa B) /OPG (Osteoprotegerina). O equilíbrio entre formação e reabsorção óssea está na dependência das flutuações locais do equilíbrio entre RANKL/OPG. (ROBLING et al., 2006).

A identificação do sistema RANK-L/RANK/OPG como o principal efetor da osteoclastogênese representa um dos maiores avanços no estudo da biologia do tecido ósseo (KHOSLA, 2001). O entendimento deste sistema de transdução de sinais têm liderado os avanços para uma maior compreensão sobre como a remodelação óssea é regulada (BOYCE et al., 2008).

O RANKL é uma citocina da família do TNF essencial para a indução da osteoclastogênese. Ela pode ser expressa por células T ativadas, o que vem sendo muito estudado na osteoimunologia. No entanto, este ligante está descrito amplamente por sua expressão nos osteoblastos, onde se unem ao RANK, ativando-os (ANDIA et al., 2006, BOYCE et al., 2008).

A RANK é uma proteína transmembranar, expressa nos progenitores de osteoclastos, osteoclastos maduros, células T, células B e células dendríticas. Também é um membro da superfamília dos receptores do TNF (TNFR's), sendo um receptor de ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (ANDIA et al., 2006).

A Osteoprotegerina (OPG) é um membro da mesma superfamília (TNFR's) e regula negativamente a formação e ativação dos osteoclastos, interrompendo a ligação RANK-RANKL por ligar-se ao RANKL. Secretada pelos osteoblastos, ao competir com esta ligação é tida como a chave do mecanismo regulatório da diferenciação e atividade osteoclástica. É produzida primariamente pelos osteoblastos e seus precursores, mas também pode ser expresso pelas células B e células dendríticas (SODEK et al., 2000).

Dessa forma, as células da linhagem osteoblástica podem controlar o desenvolvimento e a atividade osteoclástica (em resposta a diferentes estímulos mecânicos,

hormonais e inflamatórios), ajustando os níveis de expressão do RANKL e de OPG. A presença de altos níveis de RANKL promove a osteoclastogênese, enquanto que uma maior expressão de OPG resulta numa diminuição da osteoclastogênese, ou mesmo no apoptose dos osteoclastos. Assim, as células osteoblásticas podem funcionar como reguladoras do processo de reabsorção óssea (ROBLING et al., 2006).

Em experimentos realizados em animais transgênicos, foi demonstrado que a deleção dos genes para RANK ou RANKL ou superexpressão de OPG (receptor inibitório solúvel para RANKL), causa falha na formação de osteoclastos levando, em última instância, à osteopetrose, caracterizada pela deficiência na reabsorção óssea (FULLER et al., 2002).

A ação da via RANK/ RANKL e do TNF- α na remodelação óssea são sinérgicas e parecem ter uma íntima relação entre si. KIMACHI et al. (2011) demonstraram que o número de osteoclastos maduros é consideravelmente maior quando induzidos por TNF e RANKL, simultaneamente, do que quando induzidos somente por RANKL. Além disso, ZHANG et al., 2001 observaram que a ação osteoclastogênica do TNF é potencializada em células pré-tratadas com RANKL, e que células *knockout* para o receptor de TNF (TNFR-1) possuem menor expressão de RANK, demonstrando assim a interdependência e ação cooperativa dessas duas vias reguladoras da remodelação óssea.

Ainda sobre diferenciação e atividade celular, o TNF- α age na ativação de NF- κ B, sendo envolvido na sinalização de mecanismos intracelulares como MEK, ERK e JNK (ZHANG et al., 2001). Dessa forma, exerce importante papel na ativação dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. Além disso, esse fator estimula a produção local de prostaglandinas e induz a secreção de metaloproteinases de matriz, as quais realizam a dissolução da matriz orgânica secretada pelo osteoblasto, resultando em perda óssea local. (SANDROS et al., 2000).

Estudos anteriores mostraram que o excesso do TNF- α é essencial no aumento da atividade osteoclastogênica em alguns processos, como a periodontite e artrite reumatoide, sendo a sua inibição um fator crucial para diminuição da perda óssea. Entretanto, ao inibir a osteoclastogênese, presume-se que este fator também diminua a deposição óssea, já que a atividade osteoblástica é dependente da ativação de osteoclastos (GRAVES et al., 2011; DONG-JUN KIM et al., 2012).

Dessa forma, estipula-se que os inibidores de TNF podem reduzir a cicatrização óssea por inibir etapas inflamatórias proliferativas e remodeladoras deste processo, além de alterar a diferenciação osteoblástica e o eixo RANK/RANKL/OPG em detrimento de suas

atividades antirreabsortivas, participando de etapas iniciais e finais do processo de reparo ósseo.

1.3 Infiximabe

O infiximabe é um anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino, da classe IgG1, que se liga com alta afinidade a formas solúveis e transmembranais de TNF- α , mas não à linfotoxina (TNF- β). Ele age através da ligação com receptores de TNF (TNFRs), produzindo uma sinalização reversa através do ligante ancorado na membrana, que pode induzir a supressão da citocina, e até apoptose da célula produtora ou pelo bloqueio das interações entre TNF-alfa transmembrana (tmTNF) com TNFRs (EISSNER et al., 2000).

O uso do infiximabe tem sido indicado para o tratamento da artrite reumatóide (AR), artrite psoriásica, espondilite anquilosante, doença de Crohn moderada a grave ou formas clínicas fistulizantes e colite ulcerativa. Infusões com infiximabe podem ser administradas em dose única, regime mensal, ou, em sequência com intervalo de 8 semanas. Sua meia-vida é de 10 dias e seus efeitos biológicos persistem por até 2 meses (GONÇALVES, 2012).

Os efeitos adversos da terapia com esse tipo de fármaco descritos na literatura são variados, sendo mais comuns reações relacionadas à hipersensibilidade como náuseas e vômitos, dispneia, choque anafilático, angioedema, rubor facial além de urticária, hipertensão, hipotensão, tosse, dor torácica, sensação de morte e taquicardia (BARBOSA et al., 2008). Essa classe de drogas também está relacionada com risco de até 4 vezes maior no acometimento por tuberculose (BRATS, 2012). Além disso, também são descritos estudos de fase II e III onde o infiximabe está associado com dislipidemia, aumento dos níveis de triglicéridos, do colesterol total e do risco aumentado para doenças cardíacas congestivas (VIS et al., 2005; SPANAKIS et al. 2006; BRATS, 2012).

Inibidores de TNF- α alteram a resposta imune, podendo levar a quadros de imunossupressão e aumentar o risco de infecção local. São descritos frequências aumentadas de infecções graves, principalmente em trato respiratório, em pacientes submetidos a terapias com essa classe de medicamentos (BRATS, 2012). O uso do infiximabe no tratamento da doença de Crohn aumenta em quatro vezes o risco de infecções disseminadas por microrganismos oportunistas (ABREU, 2006) e tem uma taxa de mortalidade de 1% a 18%, na maioria das vezes, devido essas infecções (BRATS, 2012). São inconspícuos na literatura dados sobre alterações na microbiota bucal de indivíduos tratados com essa medicação, bem

como sobre o maior risco de infecção local em sítios orais, apesar de que tais alterações podem ser sugeridas tendo em vista o reflexo das modificações em nível sistêmico.

CIANTAR e ADLAM (2006) descreveram caso clínico de paciente com artrite reumatoide juvenil, em uso de infliximabe na dose de 5 mg/kg, que desenvolveu extensa osteomielite após exodontia de terceiro molar inferior, mesmo após profilaxia antibiótica, devido à dificuldade de cicatrização tecidual.

No entanto, observa-se escassez de estudos experimentais sobre o possível impacto do uso de infliximabe, e sua consequente inibição do TNF- α , na remodelação óssea dos maxilares. Dessa forma, o presente estudo objetiva investigar a influência desse fármaco na remodelação e reparo ósseo de alvéolos dentários após exodontias em ratos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da terapia com infliximabe na cicatrização óssea em alvéolos pós-exodontia em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cicatrização dos alvéolos dentários pós-exodontia nos 1º, 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dias após o procedimento cirúrgico nos grupos tratados e não tratados com infliximabe
- Analisar histomorfometricamente (dimensão da deposição de tecido conjuntivo cicatricial, percentual de área representada por tecido ósseo e número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos) nos alvéolos dentários pós-exodontia dos animais tratados e não tratados com infliximabe.
- Avaliar a presença de colônias bacterianas nos alvéolos dentários pós-exodontia nos animais tratados e não tratados com infliximabe
- Analisar os aspectos radiográficos dos alvéolos dentários pós-exodontia dos animais tratados e não tratados com infliximabe.
- Analisar a expressão de mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival associado aos alvéolos dentários pós-exodontia dos animais tratados e não tratados com infliximabe.
- Analisar a imunexpressão de TNF- α em diferentes dias do processo cicatricial de alvéolos dentários pós-exodontia dos animais tratados e não tratados com infliximabe.
- Verificar a variação de massa corpórea dos animais submetidos à exodontia em grupos tratados e não tratados com infliximabe.
- Avaliar a toxicidade órgão específica em fígado, rins, baço e estômago dos animais tratados com infliximabe.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais, grupos e doses

Foram utilizados 84 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com peso entre 180-220g. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura de 20-25°C. Os animais foram aleatoriamente divididos (com utilização de comando aleatorização, Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation®) em dois grupos: um no qual os animais foram tratados com infliximabe na dose de 5 mg/kg (endovenoso [EV] - acesso pela veia intrapeniana); e outro tratado com solução salina de NaCl a 0,9% (EV - acesso pela veia intrapeniana) em volume equivalente. Os grupos foram subdivididos em outros 6 subgrupos de 7 animais cada, de acordo com o sacrifício de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a exodontia.

As administrações de infliximabe e salina ocorreram semanalmente, tendo início quatro semanas prévio ao procedimento de exodontia, no intuito de simular tratamento crônico com a droga. As aplicações semanais foram mantidas após o procedimento cirúrgico de exodontia, tendo em vista a meia-vida do infliximabe (GONÇALVES et al., 2012) (Figura 1).

Figura 1. Distribuição dos dias de experimento de acordo com os procedimentos realizados.

Dias	Procedimento
Dia -21	Administração Infliximabe e Salina
Dia -14	Administração Infliximabe e Salina
Dia -7	Administração Infliximabe e Salina
Dia -1	Administração Infliximabe e Salina
Dia 0	Exodontia
Dia 1	Sacrifício Grupos (1 dia)
Dia 3	Sacrifício Grupos (3 dias)
Dia 7	Sacrifício Grupos (7 dias) e Administração de infliximabe ou Salina
Dia 14	Sacrifício Grupos (14 dias) e Administração de infliximabe ou Salina
Dia 21	Sacrifício Grupos (21 dias) e Administração de infliximabe ou Salina
Dia 28	Sacrifício Grupos (28 dias)

3.2 Protocolo experimental e Análise da Dificuldade Cirúrgica

A exodontia de todos os grupos foi realizada 24 horas após a quarta administração de infliximabe ou solução salina. A anestesia foi realizada com quetamina 100 mg/kg e xilazina 100 mg/kg, por via intraperitoneal e executada a sindesmotomia do 1º molar inferior esquerdo com auxílio de sonda exploradora, a luxação com uso de espátula Hollemback 3S e a extração com espátula Lecron-Zalle em movimento de alavanca (Técnica adaptada de MAAHS et al., 2011 e ALVES et al., 2007).

Os procedimentos de exodontia foram realizados por um mesmo operador previamente treinado, que desconhecia os grupos experimentais, e os animais foram randomizados quanto à ordem que seriam submetidos ao procedimento cirúrgico (comando aleatorização, Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation®), no intuito de dissipar o erro de força do operador. Foi cronometrado o tempo de cada procedimento cirúrgico e os dentes foram secos em papel absorvente e pesados em balança de 10⁻⁵g de precisão. Adicionalmente, o operador contou também o número de fraturas radiculares.

3.3 Eutanásia e coleta das amostras

Após eutanásia por barbitúricos (Pentobarbital sódico, 150mg/kg, EV) as hemimandíbulas foram removidas cirurgicamente e armazenadas em formol neutro a 10% durante 24h para análise radiográfica e posterior confecção de lâminas histológicas (hematoxilina-eosina). Previamente a fixação, foram removidos fragmentos do tecido gengival dos rebordos alveolares do lado em que foi realizado a exodontia e mantidos em freezer -80°C. O fígado, o baço, os rins e o estômago também foram retirados e armazenados em formol neutro a 10% durante 24 h para análise microscópica.

3.4 Confecção de lâminas histológicas

As hemimandíbulas foram descalcificadas em solução 10% EDTA (pH 7.3; NaOH, PA) (BEHARI & BEHARI, 2007; KEKLIKOGU, 2004), durante 30 dias, sendo mantidas em suspensão. Após descalcificação, o material foi incluído em parafina por processamento automatizado PT05 LupTec®, cortado em espessura de 3 µm e corado pela Hematoxilina-eosina em lâminas montadas com bálsamo do Canadá (JUNQUEIRA,

JUNQUEIRA, 1983; TIMM, 2005) para posterior análise qualitativa e quantitativa por microscopia de luz convencional.

Após pesagem, o fígado, o baço, os rins (BARBIEIRI et al., 2010; GRAVES, 2007; VASCONCELOS et al., 2007) e o estômago (GRAVES, 2007) foram fixados em formol neutro 10% e submetidos a análise macroscópica para verificação de tamanho, alterações de cor e consistência. Fragmentos de cada órgão foram retirados, colocados em cassetes e seguidos para processamento histotécnico automatizado. Os blocos parafinados foram submetidos a cortes de 4 µm de espessura para confecção de lâminas coradas por Hematoxilina-eosina e montadas com bálsamo do Canadá (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983; TIMM, 2005). Ressalta-se que, para o estômago foram realizados dois cortes correspondentes às regiões de cárdia e fúndica. A análise histológica, realizada em microscópio de luz, foi baseada na presença e extensão de lesões nesses órgãos (SOUSA et al., 2007).

3.5 Análise microscópica descritiva e histomorfométrica

3.5.1 Análise descritiva dos sítios pós-exodontia

A cicatrização dos alvéolos dentários foi analisada por um patologista experiente, de maneira cega, seguindo os seguintes parâmetros: presença ou ausência de infiltrado inflamatório agudo, misto e crônico, tecido de granulação, hemorragia recente ou tardia, áreas sugestivas de sequestros ósseos, tecido ósseo neoformado, osteoclastos e colônias bacterianas.

3.5.2 Contagem do número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos

Após análise descritiva, as lâminas histológicas foram fotografadas em 05 (cinco) campos microscópicos de grande aumento (400x) no sítio referente à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (dois campos da região mais superior, dois campos da região intermediária e um campo da região apical) e contou-se o número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e de osteoclastos na área em cicatrização com auxílio do *software* ImageJ® (JILKA et al., 2013). Foi utilizada a soma do número de polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos presentes nos cinco campos analisados para avaliação quantitativa e análise de correlação.

3.5.3 Análise do percentual da área representada por tecido ósseo

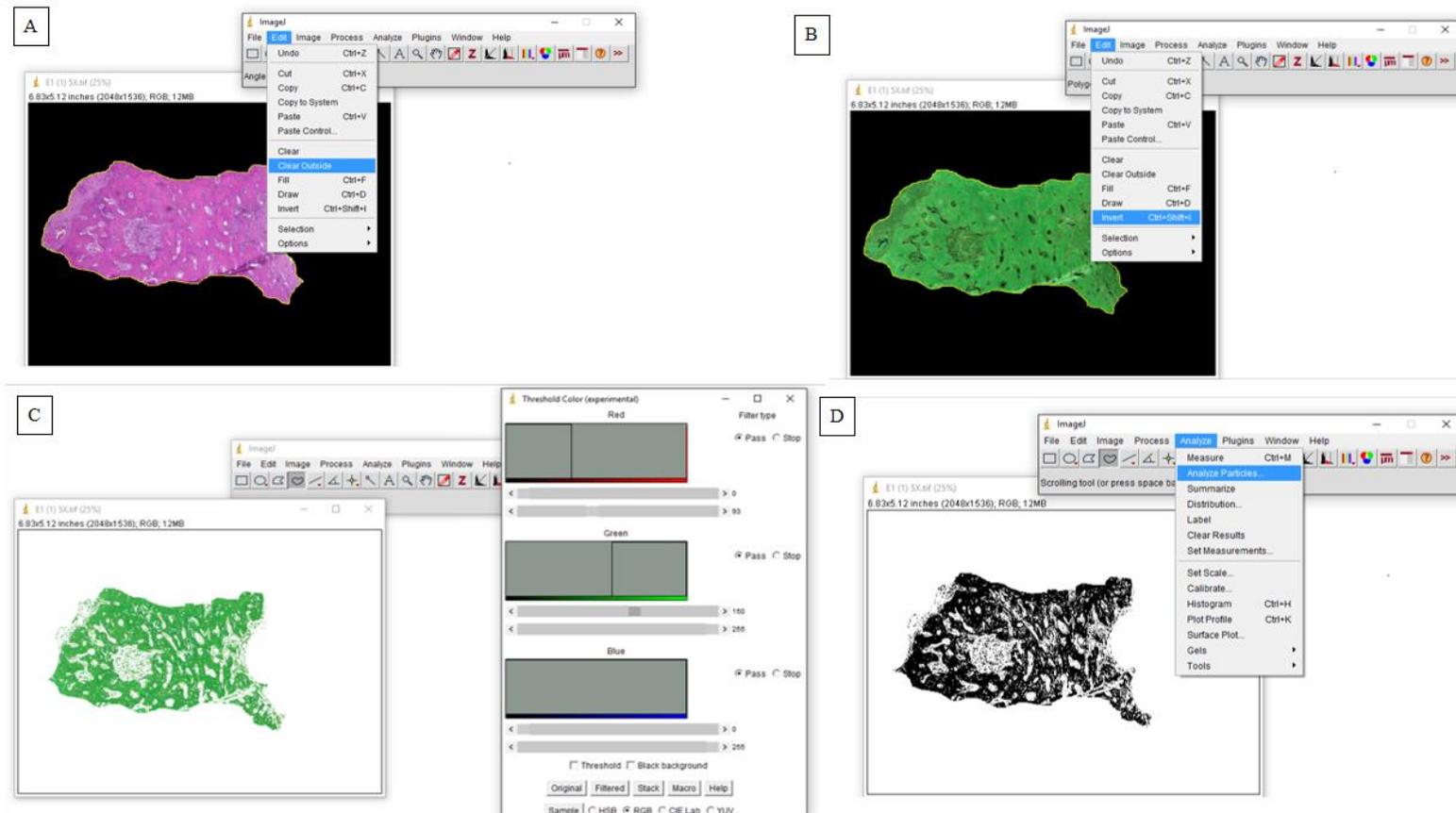
Foi mensurado o percentual da área dos alvéolos preenchido por osso neoformado. Para tanto foram utilizadas fotos da região de cicatrização no aumento de 100x. A área do alvéolo foi delimitada e recortada com auxílio do Software ImageJ®, utilizando o comando de seleção de área livre (*Freehand selections > Clear Outside*). Após essa etapa, foi mensurada a área total de cada alvéolo, ainda com o mesmo software, utilizando o comando *Measure* (*Analyze > Measure*). Posteriormente, a imagem teve suas cores invertidas a partir do comando *Invert* (*Edit > Invert*) e foi feita calibração das imagens pelo comando *Color Thershold* (*Image > Adjust > Color Thershold*) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 35 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255). Depois da calibração com destaque para tecido ósseo, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (*Image > Type > 8-bit*), binarizadas (*Process > Binary > Make Binary*) para então ser mensurada a porcentagem da área marcada referente ao tecido ósseo (*Analyze > Analyze Particles*).

3.5.4 Análise da dimensão de deposição de tecido conjuntivo cicatricial

A área ocupada por tecido conjuntivo cicatricial foi obtida por subtração da área total do alvéolo pela área preenchida por osso neoformado, ambas calculadas como descrito previamente.

Além disso, a quantidade de áreas representadas por tecido conjuntivo cicatricial no interior dos alvéolos também foi aferida com auxílio do recurso de seleção de pontos (*Point Selection*). Foi considerada a soma do número de áreas para as avaliações quantitativas.

Figura 2. Processo de preparação das imagens para análise histomorfométrica



As fotos foram recortadas evidenciando o alvéolo pós exodontia do 1º molar inferior a partir do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*> *Clear Outside*) (A), posteriormente foram invertidas (*Invert*) (B) seus canais de cores RGB ajustados para destaque do tecido ósseo (*Threshold Color*), (C) binarizadas e a área mensurada (*Particles*).

.....

3.6 Análise histoquímica

3.6.1 Coloração de Picrosirius Red

As áreas de exodontia foram analisadas com coloração de Picrosirius Red para verificação da quantidade e tipificação de deposição do colágeno nos alvéolos dentários. Essa técnica confere coloração avermelhada para áreas colagenizadas e permite através de polarização de luz a distinção entres os tipos de colágeno I (o qual assume coloração amarelo-avermelhada) e III (coloração verde-esbranquiçada).

Cortes de 3 µm foram dispostos em lâminas de vidro e desparafinados em estufa a 60°C por 3h e três banhos de xilol (5 minutos). Após reidratação em série decrescente de álcool as lâminas foram incubadas em solução de picrosirius (ScyTek®) por 30 minutos e então lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan®.

Para avaliação digital do colágeno foram fotografados seis campos em um aumento de 200x (Microscópio Leica). As fotomicrografias foram avaliadas pelo software de análise de imagem ImageJ®, após calibração das imagens pelo comando Color Thershold (Image > Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92). Depois da calibração as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em vermelho (Analyse > Analyse Particles). Após polarização de luz, o mesmo protocolo foi realizado ajustando-se as cores na função RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32). Após ajuste, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo avermelhado relativa à área marcada em vermelho. Foi obtida a área verde-esbranquiçada através de processo semelhante ao descrito para a área amarelo avermelhada alterando-se os canais de cores RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 65), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255) (adaptado de ANDRADE et al., 2011).

3.7 Ensaio e análise da dosagem de Mioleperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima abundante nos grânulos azurófilos de neutrófilos e foi utilizada como parâmetro indireto de quantificação de inflamação tecidual (BRADLEY et al., 1982). As hemimandíbulas foram excisadas cirurgicamente e todo o tecido mole dissecado com auxílio de lâmina de bisturi 15C MedBlade (Med Goldman®) e espátula número 7 (Golgran®). As amostras de tecido gengival respectivas ao local da exodontia foram imediatamente acondicionadas em 400 µl de PBS (Phosphate Buffered Saline) e congeladas em freezer -80°C.

As amostras foram maceradas e homogeneizadas em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) (50 mg de tecido/ml). O homogenato foi centrifugado utilizando em centrífuga refrigerada a 2.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A atividade de MPO do sobrenadante foi avaliada por mensuração das modificações de absorbância a 450 nm usando uma solução de leitura (5 mg de O-dianizidina, 15 µl de 1% H₂O₂; 3 ml de tampão fosfato, 27 ml H₂O) analisada em leitor de ELISA LT-450 (LabTech®). As alterações de absorbância foram plotadas em uma curva padrão para estandarização da densidade de neutrófilos e expressos em forma de MPO/mg de tecido (GONÇALVES et al., 2014).

3.8 Análise Radiográfica

As hemimandíbulas de todos os grupos foram radiografadas em aparelho de raio-X convencional (DabiAtlante®; 63Kvp, 8mA) acoplado ao sistema de captura digital de imagem Digora®. A técnica radiográfica empregada foi a do paralelismo (cone longo) utilizando-se posicionador com localizador. As hemimandíbulas foram posicionadas paralelamente ao filme radiográfico e a distância foco-filme constituiu em 10 cm. O tempo de exposição foi estabelecido em 0,18 segundos fixando-se a função para radiografia digital periapical de bateria dentária anterior superior (13-23).

As radiografias foram exportadas para o formato de imagem .jpeg para análise quantitativa por meio do *software* de análise de imagem ImageJ®. Após aleatorização, um operador, que desconhecia os grupos experimentais, mediu em triplicata a área radiolúcida nos sítios pós-exodontia através do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*), sendo considerada como unidade amostral a média aritmética das três mensurações.

3.9 Processamento e avaliação imunohistoquímica

Foram realizados cortes de 3µm dispostos sobre lâminas silanizadas para realização de imuno-histoquímica através da técnica da estreptavidina-biotinilada (adaptado de HSU et al. 1981) para TNF-α. Após desparafinização e reidratação foi realizada recuperação antigênica pela técnica de aquecimento em micro-ondas, onde as lâminas foram acondicionadas em recipientes de polipropileno contendo solução tampão de citrato 10 mM (pH = 6,0) e submetidas a três aquecimentos sequenciais de 5 minutos em potência máxima. Posteriormente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, lavagem com solução tampão de fosfato (PBS) e incubação com anticorpo primário anti-TNF-α (1:500 [SHAKER et al.,2013]) durante 12 horas.

Após lavagem com PBS, foi realizada incubação com anticorpo secundário biotinilado (Histofine®) durante 60 minutos e a revelação com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) por 5 minutos (Dako®). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos e montadas com Enthellan®.

Como controle positivo utilizou-se úlcera intensamente inflamada em mucosa jugal de rato. O controle negativo foi realizado suprimindo-se o anticorpo secundário da reação em um dos cortes.

Para avaliação microscópica foram fotografados 05 campos em um aumento de 400x (área 7381.11 µm) (SHAKER et al., 2013) no sítio referente à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e contadas as células que exibirem positividade citoplasmática e membranas para o marcador. Foi considerada a soma dos campos marcados de cada lâmina como unidade amostral, sendo submetida à análise quantitativa.

3.10 Análise da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas no dia 0 e, após este, semanalmente, durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (em porcentagem), em relação à massa inicial.

3.11 Análise dos parâmetros de toxicidade relacionados à administração de infliximabe

3.11.1 Índice hepático, renal, esplênico e gástrico

No dia do sacrifício, os animais tiveram fígado, os rins esquerdo e direito, baço e estômago removidos e pesados em balança analítica de valor aproximado 10^{-5} g. Os valores foram expressos como o índice do respectivo órgão (peso úmido de cada órgão dividido pela massa corpórea do animal no dia do sacrifício).

3.11.2 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço

3.11.2.1 Estômago

Para analisar a toxicidade do infliximabe neste órgão foram observadas duas regiões: cárdia e fúndica/corpo.

Na região de cárdia foram analisados os seguintes parâmetros (GRAVES, 2007):

- a) Integridade do epitélio escamoso de revestimento;
- b) Presença de vasos ectásicos na submucosa e mucosa;
- c) Presença de hemorragia na submucosa;
- d) Presença de células inflamatórias;
- e) Presença de ulceração.

Na região de fúndica/corpo, foram considerados para análise:

- a) Integridade do revestimento de mucosa;
- b) Presença de células parietais;
- c) Presença de células principais;
- d) Presença de vasos congestos na submucosa e mucosa;
- e) Presença de hemorragia na submucosa e mucosa;
- f) Presença de ulceração.

3.11.2.2 Fígado

As lâminas referentes ao tecido hepático foram avaliadas por meio de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIEIRI et al., 2010):

- a) Infiltração de células inflamatórias;
- b) Tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos;
- c) Hiperplasia de células de Kupffer;

- d) Degeneração balonizante dos hepatócitos;
- e) Congestão vascular portal e da veia centrolobular;
- f) Hemorragia sinusoidal;
- g) Fibrose;
- h) Necrose de hepatócitos;
- i) Esteatose micro vesicular (>5%) em hepatócitos;
- j) Esteatose macro vesicular (>5%) em hepatócitos.

3.11.2.3 Rim

Para as lâminas referentes ao tecido renal, também foram utilizadas os mesmos parâmetros de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIEIRI et al., 2010):

- a) Tumefação do epitélio tubular;
- b) Congestão glomerular e intersticial;
- c) Vacuolização isomérica do epitélio tubular;
- d) Células inflamatórias intersticiais;
- e) Presença de cilindro-hialino;
- f) Presença de fibrose.

3.11.2.4. Baço

Para análise de toxicidade do baço, foram consideradas presença e/ou ausência dos seguintes parâmetros (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007):

- a) Congestão e hemorragia da polpa vermelha;
- b) Presença de pigmentos de hemossiderina;
- c) Hematopoiese extra-medular;
- d) Atrofia esplênica
- e) Hiperplasia da polpa branca;
- f) Presença de fibrose.

Nos casos indicativos de atrofia de polpa branca, foram fotografadas de cada animal, dez regiões em aumento de 100 vezes, constituídas pela bainha de linfócitos

periarterial e pelos nódulos esplênicos com ou sem centros germinativos. As fotografias foram importadas para o software ImageJ®, para ser mensurada a área correspondente de cada polpa branca a partir do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*), sendo considerada como unidade amostral a média aritmética das mensurações. Foi selecionada a região constituída essencialmente pela polpa branca, retirando-se a área ocupada pela arteríola central.

3.12 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e analisados por meio do ANOVA, unifatorial ou multifatorial, pareado ou não pareado, associado ao pós-teste de Bonferroni (Média±EPM) ou teste t de Student.

Os dados dicotômicos (ausência ou presença) foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste Exato de Fisher. Calculou-se a área sob a curva do ensaio de Mieloperoxidase.

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism 5.0®, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

3.13 Aspectos Éticos

O presente estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 97/2014 (Anexo 1). Os pesquisadores envolvidos se comprometeram em envidar todos os esforços para reduzir ao mínimo o número de animais a serem utilizados, bem como o sofrimento dos mesmos, de acordo com os princípios éticos para se trabalhar com animais de laboratório.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da Dificuldade Cirúrgica da exodontia do 1º molar inferior

A dificuldade cirúrgica foi composta pela análise de três parâmetros: massa do primeiro molar inferior, número de fraturas radiculares ocorridas no momento da exodontia e tempo cirúrgico necessário para remoção do dente.

Em relação à massa do primeiro molar inferior removido (mg), as médias encontradas foram $18,788 \pm 0,435$ mg para o grupo salina e de $18,718 \pm 0,310$ mg para o grupo infliximabe, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os animais que receberam solução salina e os grupos tratados com infliximabe quando analisados todos os dias de forma conjunta ($p=0,8955$ / teste t de Student) nem quando vistos em diferentes dias ($p=0,4109$ / 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Tabela 1).

Quanto ao número de fraturas, não houve diferença estatística entre os grupos em cada dia analisado ($p=0,9985$ /2-way-ANOVA/Bonferroni) nem entre os valores totais de cada grupo. A média do número de fraturas do salina foi $0,349 \pm 0,105$ versus $0,391 \pm 0,114$ do grupo tratado com infliximabe ($p=0,9077$ / teste t de Student) (Tabela 1).

O tempo decorrido para realização da exodontia do primeiro molar inferior (em segundos) foi de $106,250 \pm 4,982$ s para o salina e de $105,400 \pm 5,158$ s para o grupo infliximabe, não diferindo estatisticamente entre os mesmos ($p=0,8389$ / teste t de Student). Também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando se compararam os grupos salina e infliximabe em cada um dos dias analisados ($p=0,8467$, 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Tabela 1).

Tabela 1. Análise da dificuldade cirúrgica (massa dos dentes, número de fraturas e tempo cirúrgico) dos animais submetidos a exodontia do 1º. molar inferior.

	Tempo (dias)						P-Valor ^a	Total	P-Valor ^b
	01	03	07	14	21	28			
Massa do dente (mg)									
Salina	18,286±1,423	17,333±1,838	19,971±0,637	19,013±0,952	19,500±0,492	18,317±0,712	0,4109	18,788±0,435	0,8955
Infliximabe	18,229±1,137	19,337±0,716	19,700±0,424	17,029±0,748	19,729±0,350	17,900±0,624		18,718±0,310	
Número de fraturas									
Salina	0,333±0,211	0,714±0,286	0,125±0,125	0,375±0,183	0,000±0,000	0,500±0,342	0,9985	0,349±0,105	0,9077
Infliximabe	0,333±0,211	0,625±0,375	0,111±0,111	0,300±0,267	0,000±0,000	0,500±0,342		0,391±0,114	
Tempo cirúrgico (s)									
Salina	110,429±6,622	99,000±11,557	85,875±8,397	129,375±6,047	90,571±13,631	125,667±13,777	0,8467	106,250±4,982	0,8389
Infliximabe	100,000±12,075	93,714±16,905	81,889±6,717	123,750±6,606	110,000±11,023	126,375±16,967		105,400±5,158	

A massa do 1º molar inferior (p=0,8955) bem como o número de fraturas radiculares (p= 0,9077) e o tempo cirúrgico necessário para exodontia(p=8389) não diferiram de maneira significativa entre os grupos tratados com infliximabe e solução salina. Da mesma forma, não foram visualizadas diferenças quando a análise considerou os diferentes dias em relação massa do dente (p=0,4109), número de fraturas (p=0,9985) e tempo cirúrgico (p=0,8467),

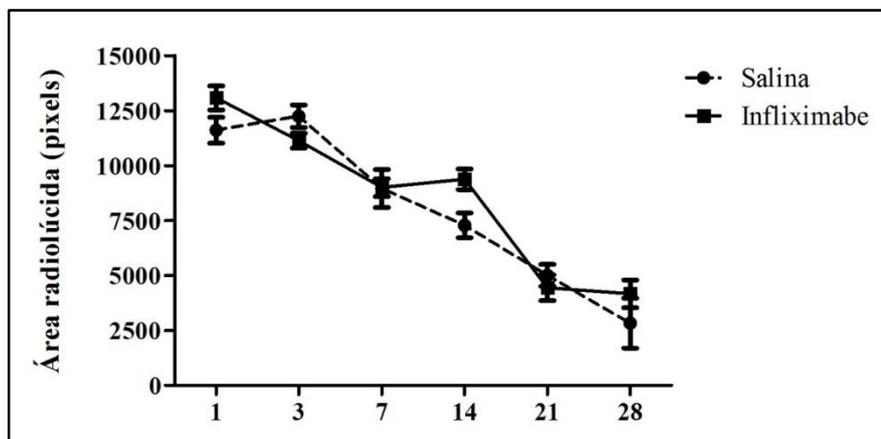
a- ANOVA-2-way/Bonferroni; b - Teste t de Student, Dados expressos em forma de média ± erro-padrão (p<0,05)

4.2 Análise Radiográfica Digital das mandíbulas

A área radiolúcida, sugestiva de alvéolo em processo de cicatrização, aferida a partir de radiografias digitais das mandíbulas, em pixels, reduziu progressivamente com o passar do tempo, entre o dia 1 (salina: $11.607,520 \pm 586,604$ pixels; infliximabe: $13.077,670 \pm 542,713$ pixels) e o dia 28 (salina: $3.494,333 \pm 996,822$ pixels; infliximabe: $4.166,524 \pm 629,551$) de maneira semelhante para ambos os grupos, sendo observadas diferenças significativas a partir do dia 7 ($p < 0,0001$ para ambos os grupos /1 way ANOVA/Bonferroni).

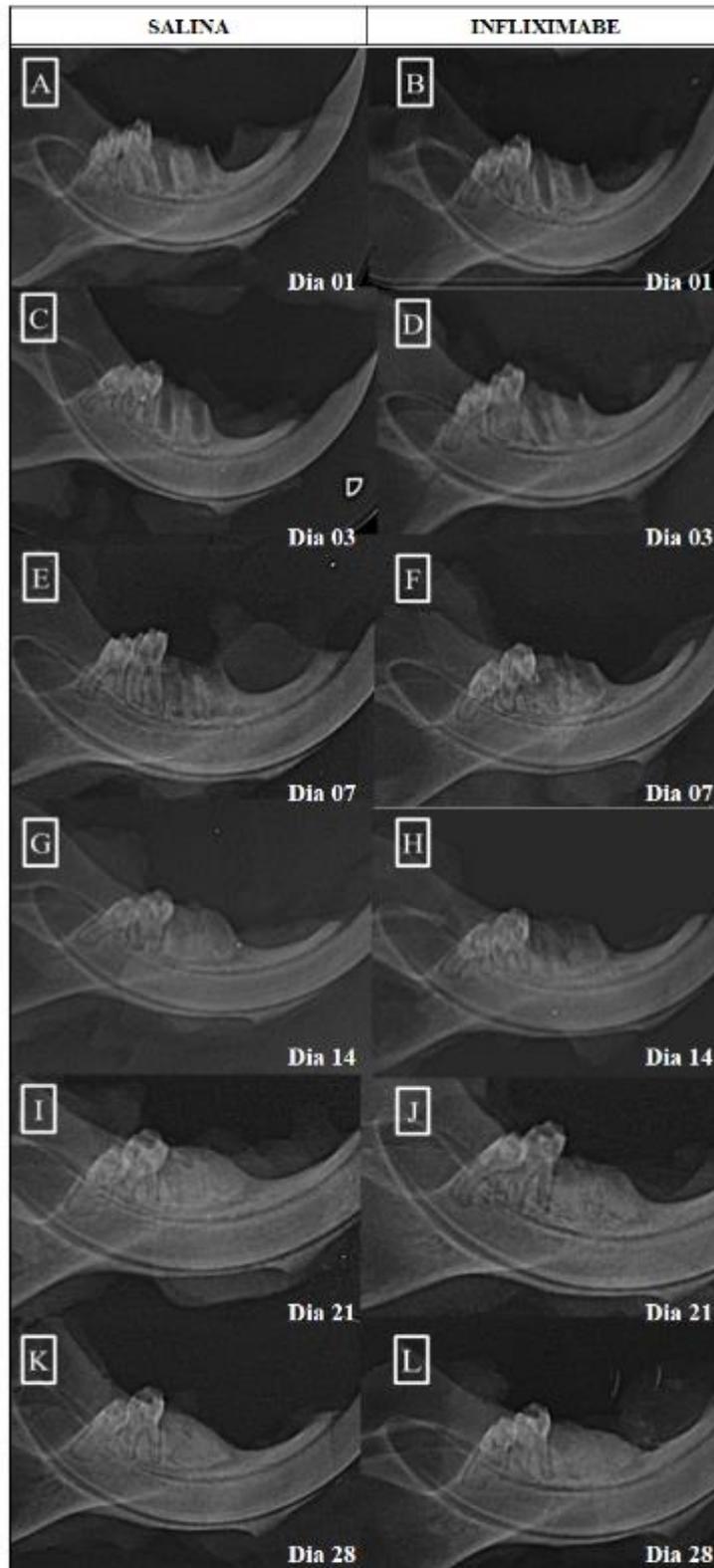
Entretanto, entre os grupos salina e infliximabe, não houve diferenças significantes nas áreas radiolúcidas no sítio pós-extração em nenhum dos dias avaliados (Dia 1 - salina: $11.607,520 \pm 586,604$ pixels, infliximabe: $13.077,670 \pm 542,713$ pixels; Dia 3 - salina $12.187,080 \pm 656,7452$ pixels, infliximabe: $11.125,240 \pm 337,476$ pixels; Dia 7 - salina: $8.960,944 \pm 864,0161$ pixels, infliximabe: $9.004,041 \pm 407,202$ pixels; Dia 14 - salina: $7.285,222 \pm 564,037$ pixels, infliximabe: $9.378,239 \pm 470,686$ pixels; Dia 21 - salina: $5.009,500 \pm 497,438$ pixels, infliximabe: $4.442,733 \pm 586,683$ pixels e Dia 28 - salina: $3.494,333 \pm 996,822$ pixels; infliximabe: $4.166,524 \pm 629,551$) ($p = 0,0646$ / 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Gráfico 1/ Figura 1).

Gráfico 1: Área radiolúcida em pixels dos alvéolos dentários avaliados nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28.



Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos dias analisados entre os grupos salina e infliximabe ($p = 0,2392$ / 2-way ANOVA/ Bonferroni)

Figura 3. Aspectos radiográficos dos sítios de exodontia dos animais salina (A, C, E, G, I, K) e tratados com infliximabe (B, D, F, H, J, L), em diferentes dias.



4.3 Análise histológica descritiva dos sítios pós-exodontia

A análise histológica revelou nos alvéolos de ambos os grupos sacrificados no 1º dia após o procedimento cirúrgico, preenchimento do sítio pós-exodontia por denso coágulo sanguíneo em meio a numerosos eritrócitos e leucócitos concentrados principalmente na porção mais superior (Figura 3, A e B).

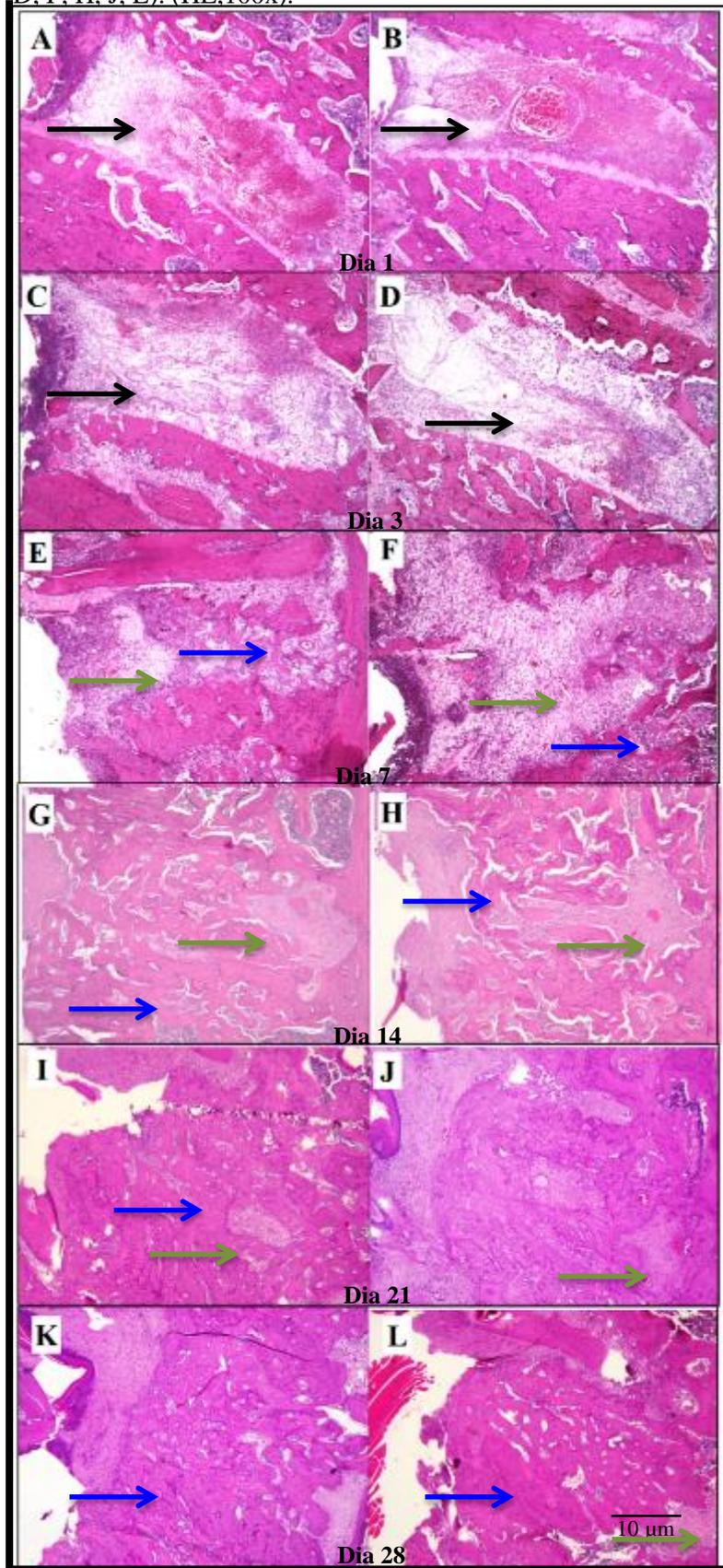
No terceiro dia, visualizou-se, em ambos os grupos, presença de escasso coágulo sanguíneo, fibrina, tecido de granulação e de infiltrado inflamatório misto localizado principalmente na porção superior. No entanto, no grupo infliximabe, observou-se um infiltrado inflamatório menos proeminente que o grupo salina (Figura 3, C e D).

No sétimo dia após a exodontia, em ambos os grupos foram visualizados tecido de granulação, deposição de tecido ósseo neoformado na profundidade e osteoclastos de permeio. Os alvéolos referentes aos animais tratados com infliximabe apresentaram o tecido de granulação ainda entremeado por moderado infiltrado inflamatório leucocitário misto além de discreta deposição de tecido ósseo neoformado (Figura 3, E e F).

No 14º dia foram observadas características semelhantes às descritas para o 7º dia, com presença de tecido de granulação e infiltrado inflamatório misto. Entretanto, extensa quantidade de tecido ósseo neoformado foi visualizada no interior dos alvéolos. Subjetivamente, o grupo infliximabe apresentava menor quantidade de formação de tecido ósseo do que o grupo salina. (Figura 3, G e H)

Nos vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia de cicatrização, observou-se extensa deposição de tecido ósseo neoformado, intercalado por pequenas áreas remanescentes de tecido fibroso em ambos os grupos. Escassos osteoclastos foram visualizados na periferia do osso neoformado, assim como raras células inflamatórias mononucleares. Os animais tratados com infliximabe mostraram maior quantidade de tecido fibroso remanescente assim como osteoclastos quando comparados com os do grupo salina (Figura 3, I, J, K e L).

Figura 4. Aspectos histopatológicos dos sítios de exodontia dos animais salina (A, C, E, G, I, K) e tratados com infliximabe (B, D, F, H, J, L). (HE, 100x).



Seta preta: coágulo sanguíneo; Seta azul: tecido ósseo neoformado; Seta verde: tecido fibroso.

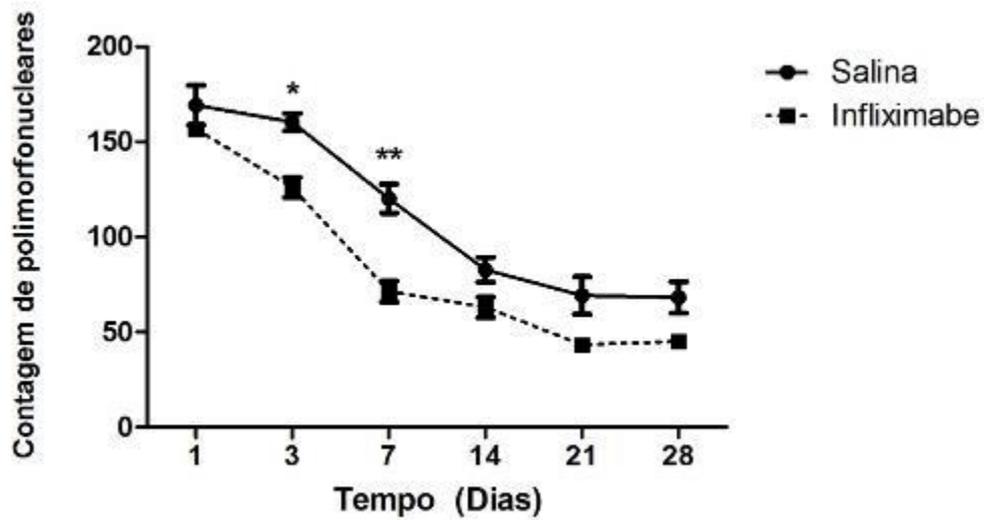
4.4. Contagem do número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos

A contagem de células polimorfonucleares neutrófilos revelou menores valores no grupo infliximabe em comparação ao salina (dia 01- salina: $169,200 \pm 10,413$; infliximabe: $156,800 \pm 3,200$; dia 03 - salina: $160,400 \pm 4,567$, infliximabe: $126,000 \pm 5,233$; dia 07 - salina: $120,167 \pm 7,639$, infliximabe: $71,333 \pm 5,649$, dia 14 - salina: $82,750 \pm 6,421$, infliximabe: $63,000 \pm 5,339$, dia 21- salina: $69,250 \pm 9,903$, infliximabe: $43,250 \pm 1,797$ e dia 28 - salina: $69,250 \pm 9,360$, infliximabe: $45,000 \pm 2,415$). No entanto, foram observadas diferenças estatisticamente significantes somente nos dias 03 e 07 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente/2-way-ANOVA/Bonferroni) (Gráfico 2)

Notou-se também menor número de células mononucleares no grupo infliximabe em relação ao salina (dia 01- salina: $5,833 \pm 0,307$; infliximabe: $3,667 \pm 0,422$; dia 03 - salina: $7,200 \pm 0,583$, infliximabe: $5,000 \pm 0,456$; dia 07 - salina: $25,500 \pm 2,446$; infliximabe: $19,500 \pm 1,176$; dia 14 - salina: $16,667 \pm 1,333$, infliximabe: $19,500 \pm 0,872$, dia 21- salina: $12,400 \pm 0,980$, infliximabe: $9,833 \pm 1,195$ e dia 28 - salina: $5,400 \pm 0,600$, infliximabe: $4,200 \pm 0,490$). Somente no dia 07, o número de células mononucleares do grupo infliximabe estava menor que o salina, de forma significativa ($p < 0,01$ /2-way-ANOVA/Bonferroni) (Gráfico 3)

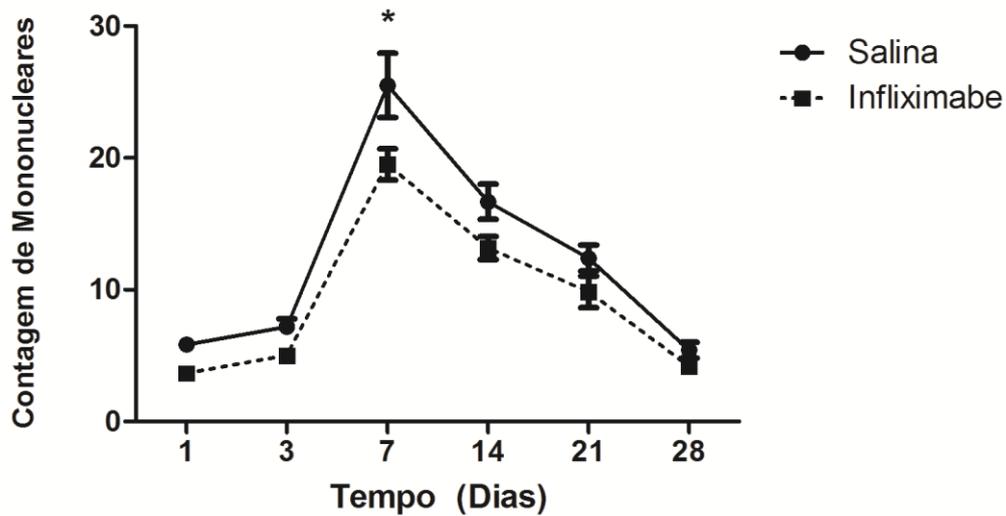
O número de osteoclastos foi menor no grupo infliximabe quando comparado ao salina (dia 01- salina: $0,200 \pm 0,200$; infliximabe: $0,000 \pm 0,000$; dia 03 - salina: $2,750 \pm 0,479$, infliximabe: $1,286 \pm 0,421$; dia 07 - salina: $8,000 \pm 1,291$; infliximabe: $4,000 \pm 0,365$; dia 14 - salina: $17,500 \pm 0,992$, infliximabe: $11,500 \pm 0,922$, dia 21- salina: $14,000 \pm 1,414$, infliximabe: $10,800 \pm 1,158$ e dia 28 - salina: $12,600 \pm 1,208$, infliximabe: $9,833 \pm 0,703$), apresentando diferenças estatisticamente significantes nos dias 07 e 14 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente/2-way-ANOVA/Bonferroni) (Gráfico 4).

Gráfico 02: Contagem celular de polimorfonucleares neutrófilos em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



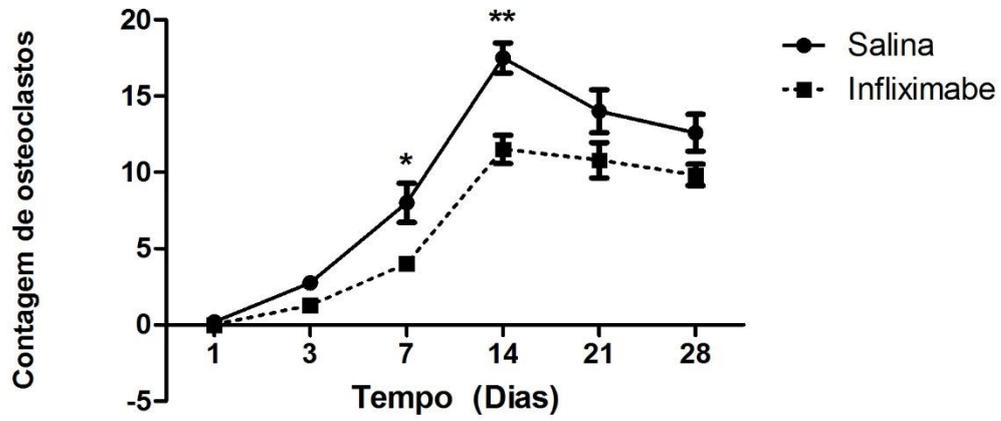
Foram observadas diferenças estatisticamente significativas do 3º e 7º dia de observação, representando menor número de células no grupo infiximabe em relação ao grupo salina. ($p < 0,01$ e $p < 0,001$; respectivamente /2-way ANOVA/ Bonferroni)

Gráfico 03: Contagem celular de mononucleares em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



No 7º dia de observação, encontrou-se menor número de células no grupo infiximabe em relação ao grupo salina, de forma significativa. ($p < 0,01$ /2-way ANOVA/ Bonferroni)

Gráfico 4: Contagem de osteoclastos em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



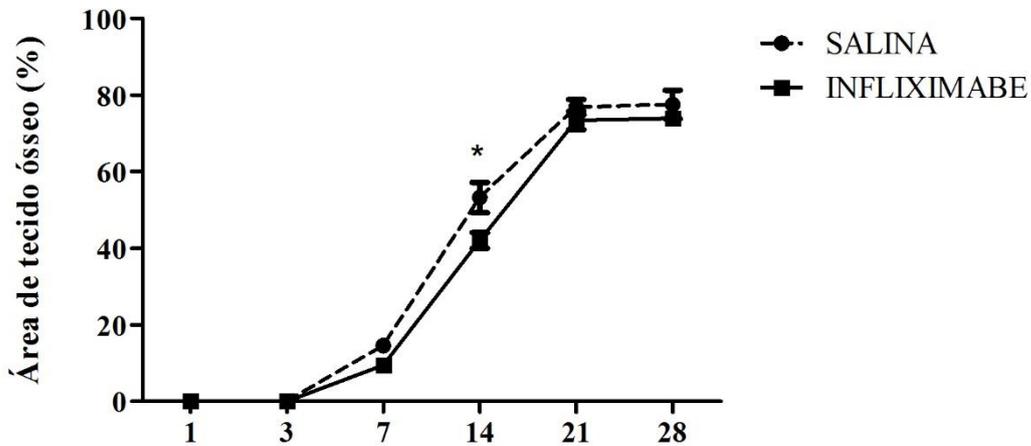
Nos 3º e 7º dias de estudo, verificou-se menor número de osteoclastos no grupo infiximabe em relação ao grupo salina. ($p < 0,01$ e $p < 0,001$; respectivamente /2-way ANOVA/ Bonferroni)

4.5 Análise do percentual de preenchimento por tecido ósseo e conjuntivo

Na análise do percentual de área do alvéolo preenchida por tecido ósseo foi visualizado preenchimento significativo gradual do sítio pós-exodonta a partir do dia 07 em ambos os grupos (dia 7- salina: $14,580 \pm 1,124$; infliximabe: $9,460 \pm 1,134$; dia 14-salina: $53,217 \pm 3,957$, infliximabe: $42,033 \pm 2,025$; dia 21 - salina: $76,817 \pm 1,969$, infliximabe: $73,375 \pm 2,307$ e dia 28 – salina: $78,517 \pm 3,692$, infliximabe: $73,933 \pm 0,993$). Somente no dia 14, o grupo infliximabe apresentou, de forma significativa, menor quantidade de tecido ósseo ($p < 0,001$ /2-way-ANOVA/Bonferroni) (Gráfico 5).

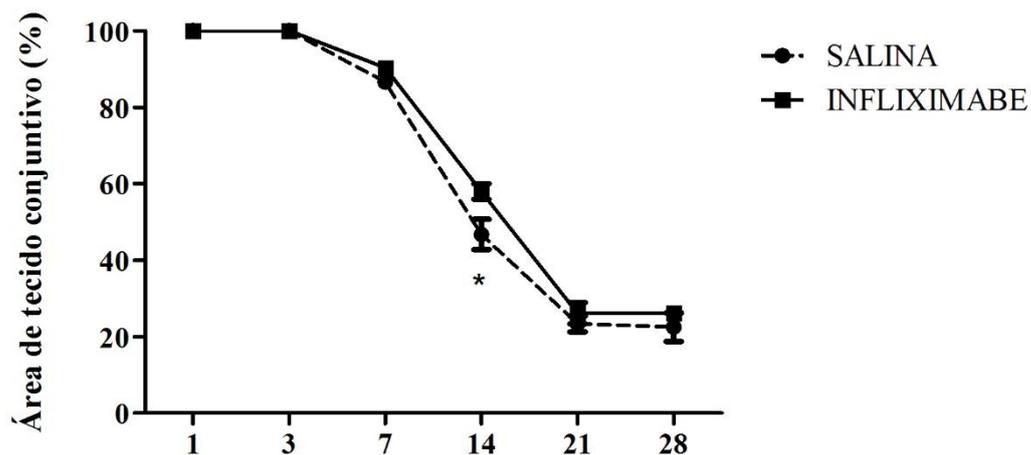
Quanto à análise do tecido conjuntivo, foi visualizada diminuição em ambos os grupos a partir do dia 07, com maior persistência desse tecido no grupo infliximabe (dia 7- salina: $86,520 \pm 1,556$; infliximabe: $90,390 \pm 1,327$; dia 14 - salina: $46,783 \pm 3,957$, infliximabe: $57,967 \pm 2,025$; dia 21 - salina: $26,350 \pm 2,077$, infliximabe: $26,125 \pm 2,793$ e dia 28 – salina: $22,483 \pm 3,692$, infliximabe: $26,067 \pm 0,993$). Entretanto, somente no dia 14 essa diferença foi estatisticamente significante ($p < 0,001$ /2-way-ANOVA/Bonferroni). (Gráfico 6)

Gráfico 05: Análise do percentual de área de tecido ósseo em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior



. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas no 14º dia, com menor deposição óssea no grupo infliximabe em relação ao salina. ($p < 0,001$ /2-way ANOVA/ Bonferroni)

Gráfico 06: Análise do percentual de área de tecido conjuntivo em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



No 14º dia foi encontrada, maior área de tecido conjuntivo no grupo infliximabe em relação ao salina, com significância estatística. ($p < 0,001$ /2-way ANOVA/ Bonferroni)

4.6 Análise da coloração de Picrossirius Red

Na análise da área total representada por colágeno, corada por rosa avermelhado, foi visualizado preenchimento gradual do sítio pós-exodontia com maior quantidade nos dias 7 e 14 (dia 01- salina: $13,633 \pm 0,775$; infliximabe: $12,300 \pm 0,643$; dia 03 - salina: $18,500 \pm 1,879$, infliximabe: $17,667 \pm 1,091$; dia 07 - salina: $38,900 \pm 2,902$; infliximabe: $28,200 \pm 2,595$; dia 14 – salina: $41,725 \pm 3,881$, infliximabe: $33,667 \pm 2,922$, dia 21- salina: $37,750 \pm 4,534$, infliximabe: $26,525 \pm 3,664$ e dia 28 – salina: $34,267 \pm 3,208$, infliximabe: $29,833 \pm 5,302$),. Não foram vistas diferenças significativas entre o grupo infliximabe e salina ($p = 0,8682$ / 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Gráfico 7).

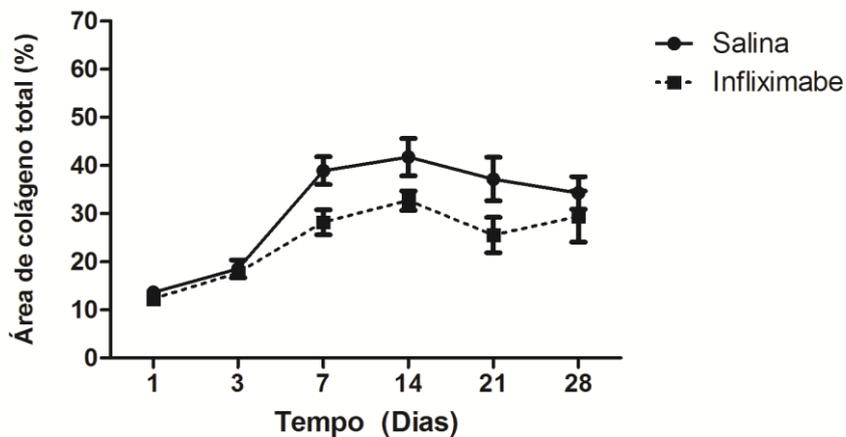
Após polarização de luz, a área representada por colágeno tipo I mostrou-se mais intensa a partir dos dias 7 e 14 em ambos os grupos. Entretanto, nesses mesmos dias, o grupo infliximabe apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao salina, com menor quantidade de colágeno tipo I (dia 01- salina: $6,700 \pm 0,896$; infliximabe: $6,667 \pm 1,643$; dia 03 - salina: $8,733 \pm 1,279$, infliximabe: $6,667 \pm 0,745$; dia 07 - salina: $22,300 \pm 2,299$; infliximabe: $14,200 \pm 2,595$; dia 14 – salina: $21,000 \pm 1,812$, infliximabe: $12,575 \pm 1,377$, dia 21- salina: $18,750 \pm 2,633$, infliximabe: $13,000 \pm 1,864$ e dia 28 – salina: $15,933 \pm 2,208$, infliximabe: $12,433 \pm 2,073$) ($p < 0,05$ / 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Gráfico 8) (Figura 5).

No que diz respeito a área representada por colágeno tipo III, esta foi menor do que a área representado por colágeno do tipo I em ambos os grupos. Não houve diferenças significativas na quantificação desse tipo de colágeno entre os grupos infliximabe e salina ($p = 0,6986$ 2-way-ANOVA/Bonferroni) (dia 01- salina: $9,800 \pm 1,674$; infliximabe: $10,067 \pm 1,725$; dia 03 - salina: $10,433 \pm 1,855$, infliximabe: $11,667 \pm 2,745$; dia 07 - salina: $12,300 \pm 1,587$; infliximabe: $13,200 \pm 2,595$; dia 14 – salina: $8,500 \pm 0,812$, infliximabe: $10,575 \pm 1,377$, dia 21- salina: $8,925 \pm 0,832$, infliximabe: $10,275 \pm 1,864$ e dia 28 – salina: $9,467 \pm 0,884$, infliximabe: $8,700 \pm 0,757$) (Gráfico 9) (Figura 5).

Adicionalmente, nos dia 7 (salina = $1,901 \pm 0,243$; infliximabe = $1,061 \pm 0,258$), 14 (salina = $2,365 \pm 0,204$; infliximabe = $0,942 \pm 0,173$) e 21 (salina = $1,992 \pm 0,201$; infliximabe = $1,274 \pm 0,042$) a proporção colágeno tipo I:III mostrou-se significativamente menor no grupo infliximabe que no grupo salina ($p=0,003$ / 2-way-ANOVA/ Bonferroni)). Não houve diferença significativa nos dias 1 (salina = $0,765 \pm 0,153$; infliximabe = $0,655 \pm 0,116$), 3 (salina = $0,714 \pm 0,035$; infliximabe = $0,531 \pm 0,032$) e 28 (salina = $1,574 \pm 0,104$; infliximabe = $1,375 \pm 0,088$) (Gráfico 10).

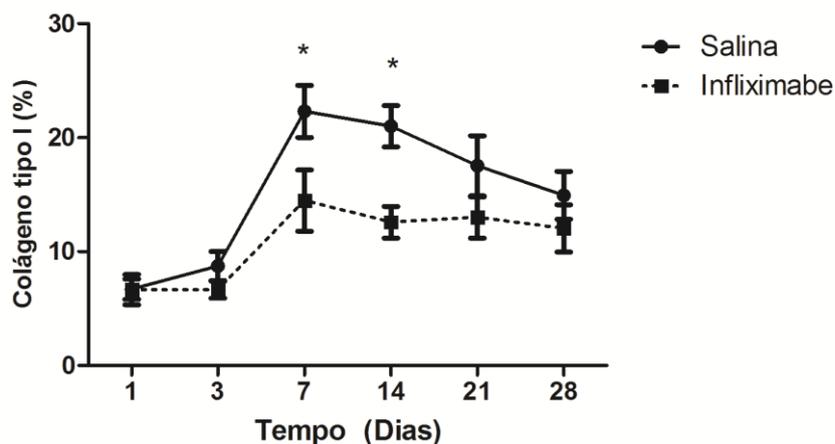
Na análise de área sob a curva de deposição de colágeno, o grupo tratado com solução salina apresentou dois picos de deposição de colágeno nos dias 7 e 14 enquanto o grupo tratado com infliximabe apenas no dia 7. O momento de inversão da proporção de colágeno tipo III para I ocorreu entre os dias 3 e 7 no grupo tratado com salina e entre os dias 14 e 21 no grupo tratado com infliximabe (Figura 4)

Gráfico 7: Mensuração da área total de preenchimento por colágeno em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



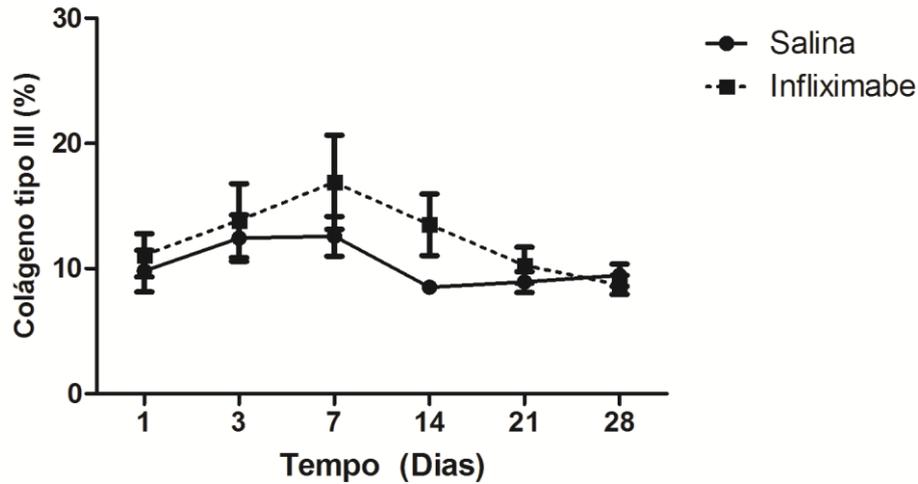
Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos dias avaliados, entre os animais tratados com infliximabe e salina ($p= 0,8682$ /2-way ANOVA/ Bonferroni). Coloração de Picosirius Red.

Gráfico 8: Mensuração da área de preenchimento por colágeno do tipo I em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



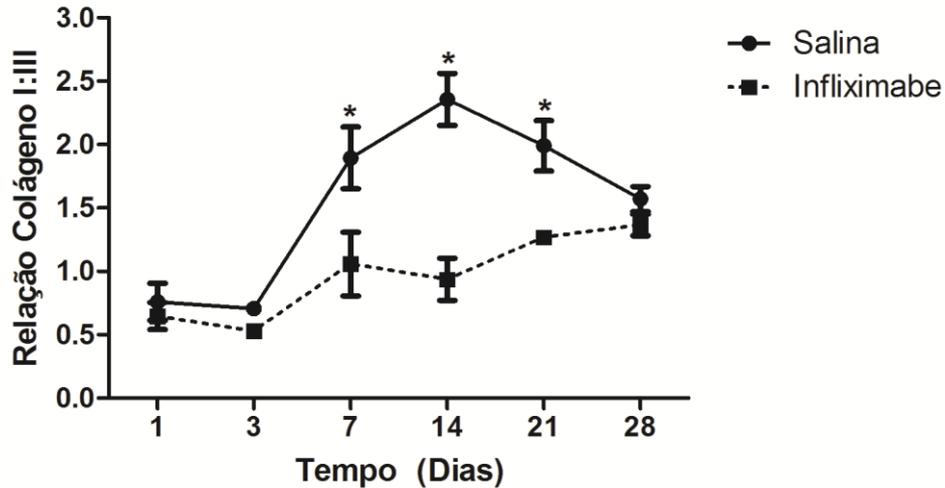
Nos dias 7 e 14 foi observada menor composição de colágeno tipo I nos alvéolos do grupo infliximabe em relação ao grupo salina, de forma significativa ($p < 0,05$ /2-way ANOVA/ Bonferroni). Coloração Picosirius Red após polarização de luz.

Gráfico 9: Mensuração da área de preenchimento por colágeno do tipo III em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



Não foram vistas diferenças significativas em nenhum dos dias avaliados, na composição de colágeno III, entre os animais tratados com infiximabe e salina ($p= 0,6986$ /2-way ANOVA/ Bonferroni) Coloração Picrosirius Red após polarização de luz.

Gráfico 10: Relação entre as áreas de preenchimento por colágeno do tipo I: III em alvéolos dentários pós-exodontia de 1º molar inferior.



Foi visualizada menor proporção entre colágeno tipo I:III nos dias 7, 14 e 21 dos animais tratados com infiximabe quando comparados ao salina ($p= 0,003$ /2-way ANOVA/ Bonferroni) Coloração Picrosirius Red após polarização de luz.

Figura 5. Área sob a curva da marcação por colágeno total (vermelho), tipo I (amarelo) e tipo III (verde) de alvéolos pós-exodontia do 1º molar inferior de animais tratados com infliximabe ou salina.

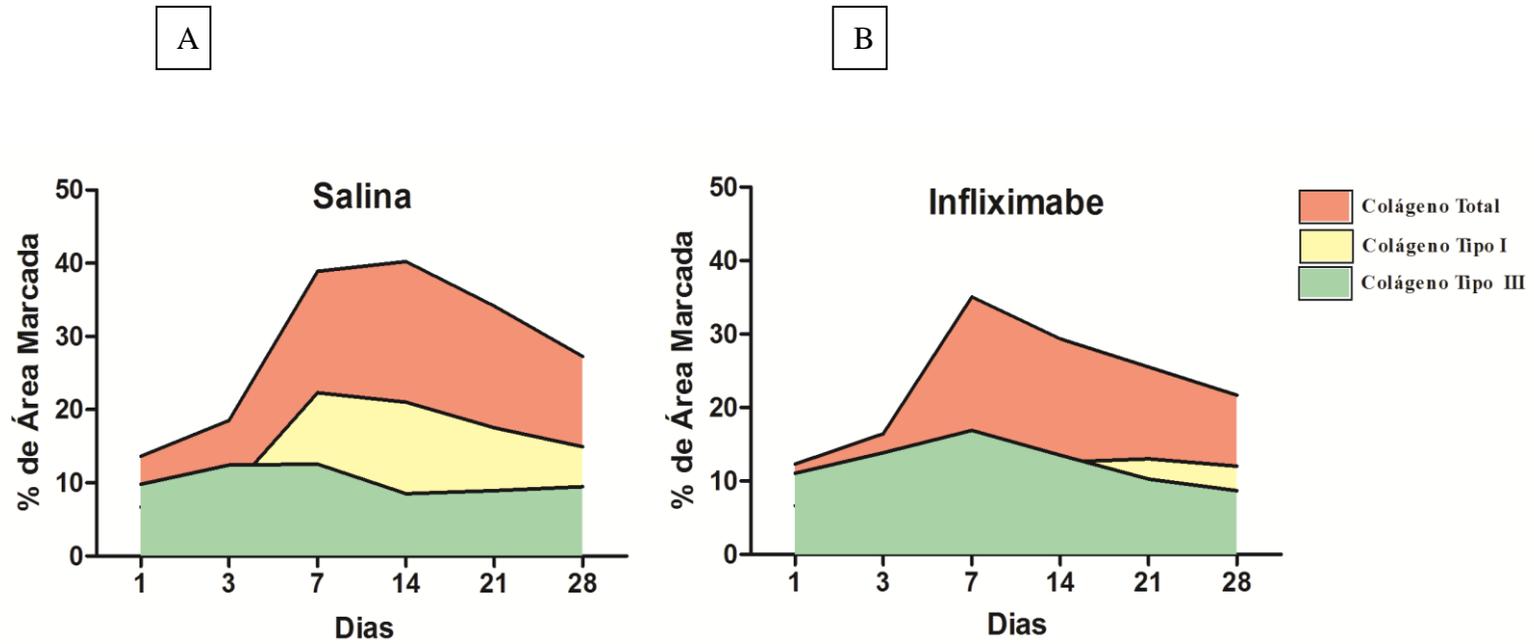
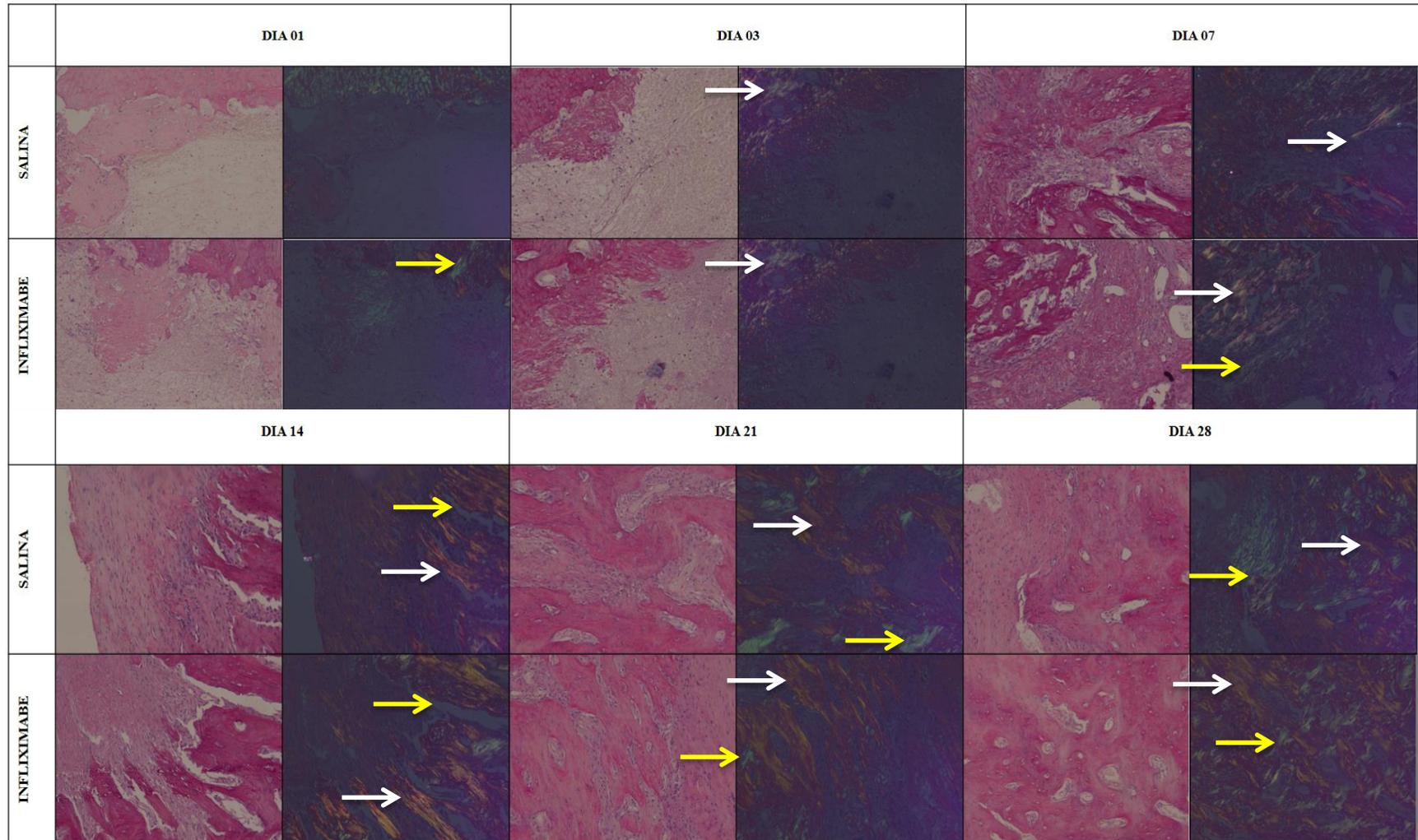


Figura 6. Fotomicrografias de alvéolos dentários pós-exodontia do 1º molar inferior em animais tratados com infliximabe ou salina nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28.



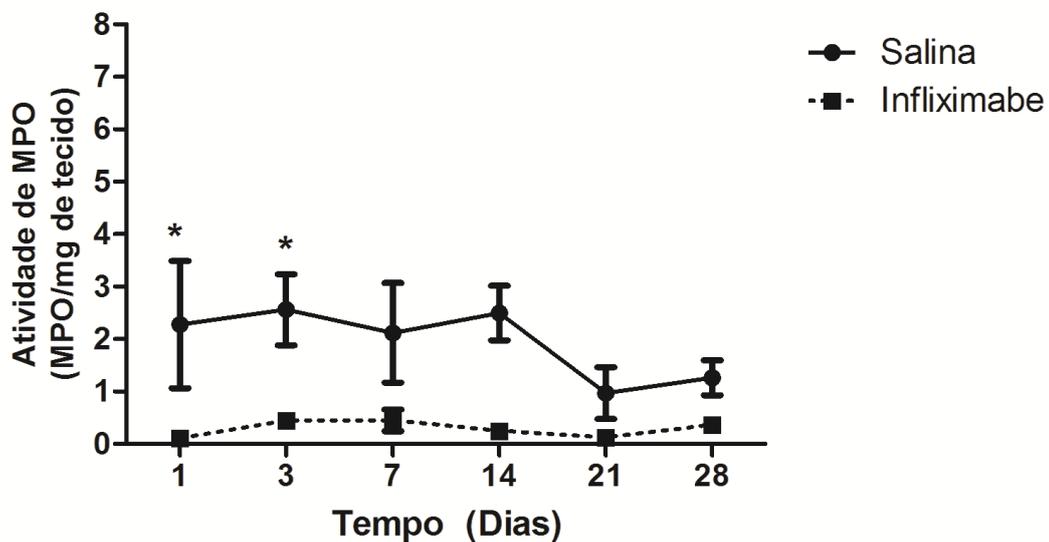
Coloração Picrossirius Red sem (imagens à esquerda) e após polarização de luz (à direita). 200x. Seta branca: colágeno tipo I; seta amarela: colágeno tipo III.

4.7 Ensaio e dosagem de Mieloperoxidase (MPO)

Este ensaio revelou menor quantidade de MPO no tecido gengival dos animais do grupo infliximabe em todos os dias analisados em comparação aos animais salina (dia 01 – salina: $1,871 \pm 1,493$, infliximabe: $0,169 \pm 0,169$; dia 03 – salina: $1,981 \pm 0,819$, dia 7- salina: $1,433 \pm 1,015$; infliximabe: $0,548 \pm 0,288$; dia 14 – salina: $2,124 \pm 0,718$, infliximabe: $0,253 \pm 0,146$; dia 21 - salina: $1,011 \pm 0,759$, infliximabe: $1,180 \pm 0,451$ e dia 28 – salina: $1,180 \pm 0,451$, infliximabe: $0,405 \pm 0,0,171$) ($p = 0,051$ /2-way ANOVA/ Bonferroni).

A área sobre a curva calculada para o grupo salina foi de 9,014 enquanto que para o grupo infliximabe foi de 1,719, ou seja, a área sobre a curva do grupo infliximabe foi cerca de 5 vezes menor do que a do grupo salina. Entretanto, diferenças estatisticamente significantes foram observadas somente nos dias 01 e 03 ($p < 0,05$) (Gráfico 7).

Gráfico 10: Dosagem de Mieloperoxidase (MPO) do tecido gengival relacionado aos sítio pós-exodontia do 1º molar inferior em diferentes dias



Foi observada menor expressão de MPO no grupo infliximabe em relação ao grupo salina, nos dias 1 e 3, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$ /2-way ANOVA/ Bonferroni)

4.8 Avaliação Imunohistoquímica

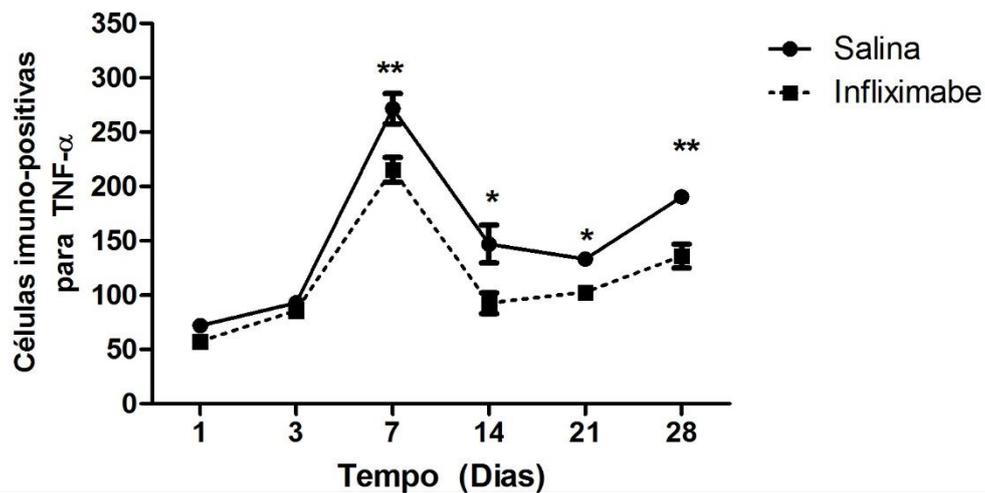
A imunoposição de TNF- α nos alvéolos pós-exodontia foi menor no grupo infliximabe em relação ao salina, sendo encontrada diferença estatisticamente significativa nos dias 07, 14, 21 e 28 ($p < 0,01$; $p < 0,05$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente/ 2-way ANOVA – Bonferroni) (Tabela 2)(Figura 6)

Tabela 2. Número de células positivas para expressão TNF- α nos alvéolos dentários pós-exodontia em diferentes dias.

	Salina	Infliximabe	p-valor ^a
Dia 01	70,500 \pm 7,500	63,500 \pm 15,500	$p > 0,05$
Dia 03	92,333 \pm 7,535	86,666 \pm 8,685	$p > 0,05$
Dia 07	282,666 \pm 10,105	217,000 \pm 14,679*	$p < 0,01^{**}$
Dia 14	142,500 \pm 14,203	93,666 \pm 13,195*	$p < 0,05^*$
Dia 21	133,250 \pm 5,621	102,500 \pm 3,756*	$p < 0,05^*$
Dia 28	186,333 \pm 10,477	122,333 \pm 12,862*	$p < 0,01^{**}$

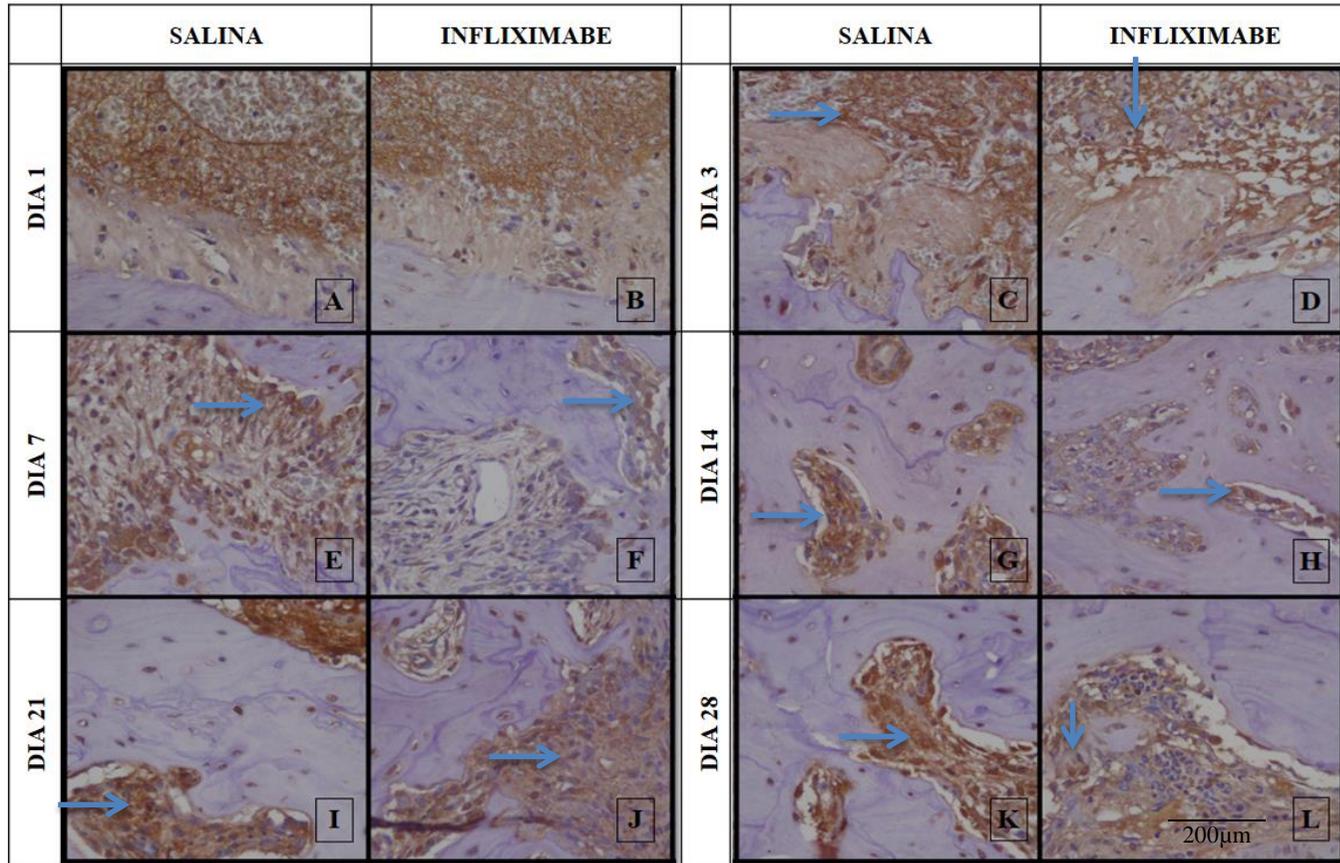
a- ANOVA-2-way/Bonferroni Dados expressos em forma de média \pm erro-padrão ($p < 0,05$)

Gráfico 11- Contagem de células positivas para imunomarcção por TNF- α em alvéolos pós-exodontia do 1º molar inferior.



Foram visualizadas diferenças estatisticamente significantes nos dias 07, 14, 21 e 28 entre o grupo infliximabe e o salina. ($p < 0,01$; $p < 0,05$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente/ 2-way ANOVA – Bonferroni)

Figura 7. Imunomarcção de TNF- α em alvéolos pós-exodontia do 1º molar inferior.



Foi observada menor marcação de células no grupo infiximabe do que no grupo salina, com significância estatística nos dias 07, 14, 21 e 28. ($p < 0,01$; $p < 0,05$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente/ 2-way ANOVA – Bonferroni)

4.9 Avaliação da área sob a curva dos parâmetros relacionados a cicatrização dos alvéolos pós-exodontia

Foi realizado cálculo de área sob a curva dos gráficos dos parâmetros: radiográfico, área tecido conjuntivo, área tecido ósseo, contagem de macrófagos, neutrófilos, osteoclastos, contagem de células TNF- α positivas, MPO de gengiva, colágeno total, colágeno tipo I, colágeno tipo III, relação colágeno I:III.

Com exceção da análise radiográfica (relação salina: infliximabe = 1,0), área de tecido conjuntivo (relação salina: infliximabe = 0,9) e área de colágeno tipo III (relação salina: infliximabe = 0,8) todas as avaliações de área sob a curva temporal do grupo salina foram de 1,1 a 6,6 vezes maiores no grupo salina que no grupo infliximabe (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de área sob a curva de parâmetros relacionados a cicatrização pós-exodontia.

	Salina	Infliximabe	Relação Salina / Infliximabe
Área sob a curva			
Radiográfico	40664	42572	1,0
Área tecido conjuntivo	318,0	337,5	0,9
Área tecido ósseo	183,4	161,8	1,1
Contagem de macrófagos	67,4	51,4	1,3
Contagem de neutrófilos	434,1	319,6	1,4
Contagem de Osteoclastos	48,7	32,5	1,5
Contagem de células TNF- α positivas	776,1	592,4	1,3
MPO de gengiva	9,9	1,5	6,6
Colágeno total	152,2	123,3	1,2
Colágeno tipo I	80,4	56,1	1,4
Colágeno tipo III	52,1	64,4	0,8
Relação Colágeno I:III	8,1	4,8	1,7

4.10 Avaliação da presença de colônias bacterianas

A avaliação microscópica dos sítios pós-exodontia revelou que quase a totalidade dos animais nos dias 1 e 3 apresentaram áreas basofílicas sugestivas de colônias bacterianas de *Actinomyces*. A partir do 7º dia, verificou-se diminuição gradual da identificação dessa áreas, contudo, sem diferença estatística entre os grupos infliximabe e salina ($p=1,000$ em todos os dias/ Teste do qui-quadrado) (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência da presença de material basófilo consistente com colônias bacterianas nos sítios pós-exodontia.

Dia	Salina		Infliximabe		p-Valor
	+/-	%	+/-	%	
1	6/1	85.7	6/0	100.0	1.000
3	6/0	100.0	6/0	100.0	1.000
7	4/2	66.7	4/2	66.7	1.000
14	3/3	50.0	3/3	50.0	1.000
21	2/3	40.0	2/4	33.3	1.000
28	2/4	33.3	2/4	33.3	1.000

* $p<0.05$, teste do qui-quadrado. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual (+ = material basofílico sugestivo de colônias de *Actinomyces* presente; (- = material basofílico sugestivo de colônias de *Actinomyces* ausente)

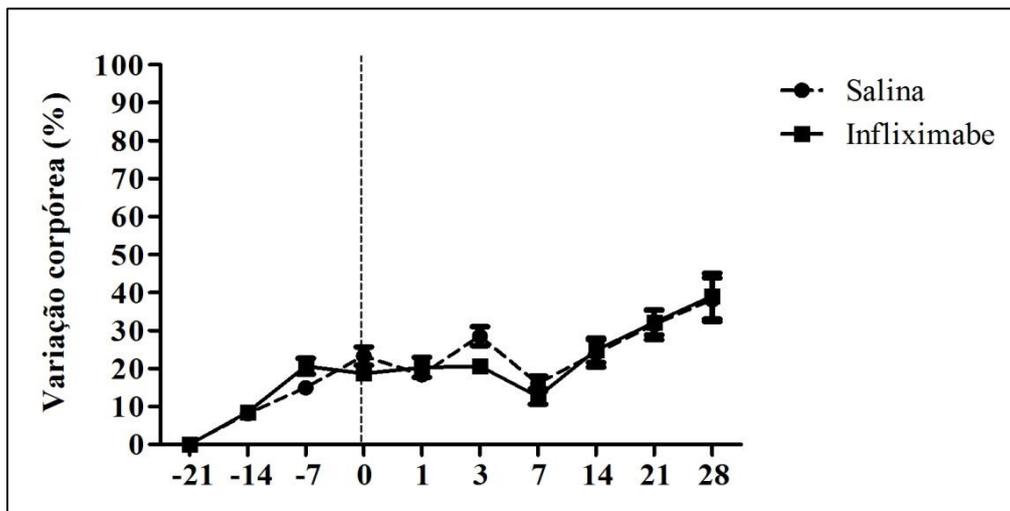
4.11 Análise dos parâmetros de toxicidade associados à administração de Infiximabe

4.11.1 Análise da variação de massa corpórea

Os animais de ambos os grupos experimentais ganharam peso (em percentual) com o decorrer do experimento desde o seu início, com a primeira administração da droga, (dia-21) ao último dia de observação (dia 28), com variações finais positivas de $38,10 \pm 5,76\%$ para o grupo salina e de $39,08 \pm 6,04\%$ para o grupo infiximabe ($p < 0,001$ /1 way ANOVA/ Bonferroni).

Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos no que diz respeito à variação de massa corpórea dos animais em nenhum dos dias avaliados ($p = 0,0660$ /2-way ANOVA/ Bonferroni) (Gráfico 8).

Gráfico 11: Variação de massa corpórea dos animais submetidos à exodontia e tratados com infiximabe e salina.



Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos dias avaliados ($p = 0,0660$ /2-way ANOVA/ Bonferroni).

4.11.2 Análise dos índices dos órgãos

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina e infliximabe no que diz respeito aos índices dos órgãos fígado, estômago e rins em nenhum dos dias avaliados ($p= 0,5743$; $0,7665$ e $0,4062$, respectivamente/2-way ANOVA/ Bonferroni) (Tabela 5).

Entretanto, foram observadas alterações do índice esplênico, no 28º dia do experimento, onde foi percebida diminuição do peso do baço dos animais do grupo infliximabe em relação ao salina ($p= 0,0091$ / 2-way ANOVA/ Bonferroni) (Tabela 5).

4.11.3 Análise histopatológica dos órgãos

4.11.3.1 Estômago

A análise histológica do estômago foi realizada em duas partes: cárdia e região de fundo/corpo. Em todos os grupos experimentais, o estômago exibiu a região de cárdia revestida por epitélio pavimentoso estratificado ortoceratinizado, sob o qual havia córion fibroso denso com vasos sanguíneos ectásicos de diferentes calibres (Figura 7).

Na região fúndica/corpo, os animais, independente do tratamento recebido, apresentaram preservação da mucosa gástrica, sendo visualizadas as células principais e parietais, porém com hemorragia e vasos ectásicos nas camadas submucosa e mucosa (Figura 8).

4.11.3.2 Fígado

Os animais de ambos os grupos apresentaram arquitetura hepática preservada, com leve tumefação de hepatócitos, discretas áreas de hemorragia sinusoidal e tumefação de células de Kupffer. Também foram visualizadas áreas com dilatação e/ou congestão dos vasos portais. Alguns animais apresentaram leve a moderada vacuolização de hepatócitos e raros focos inflamatórios, porém tal alteração foi visualizada igualmente em ambos os grupos experimentais (Figura 9).

4.11.3.3 Rim

A análise do rim dos animais revelou que em ambos os grupos a estrutura glomerular estava preservada, no entanto, hemorragia tubular e intersticial, presença de

cilindro-hialino, tumefação de células epiteliais, além de células inflamatórias dispersas pela amostra foram encontradas (Figura 10).

Dezenove (onze do grupo salina e oito do infliximabe) animais exibiram vacuolização do epitélio tubular, sem diferenças entre os grupos experimentais.

4.11.3.4 Baço

Todos os baços dos animais analisados mostraram preservação da arquitetura lobular, com visualização de polpa branca e vermelha, e megacariócitos de permeio.

Em 13 animais do grupo salina e 15 do infliximabe houve congestão de polpa vermelha, e em 21 animais do grupo salina e 22 do grupo infliximabe houve deposição de pigmento alaranjado sugestivo de lipofucsina. Essas alterações, portanto, pareceram não diferir entre os grupos experimentais (Figura 11).

Na análise histomorfométrica da polpa branca dos animais, foi visualizada menor área total (salina: 456.200 ± 85.290 pixels, infliximabe: 182.000 ± 14.460 pixels) nos animais do grupo infliximabe em relação ao salina ($p=0,0194$ /teste t de Student).(Gráfico 12). Ressalta-se a diminuição da extensão da bainha de linfócitos periarterial contribuindo para o achado de atrofia da polpa branca.

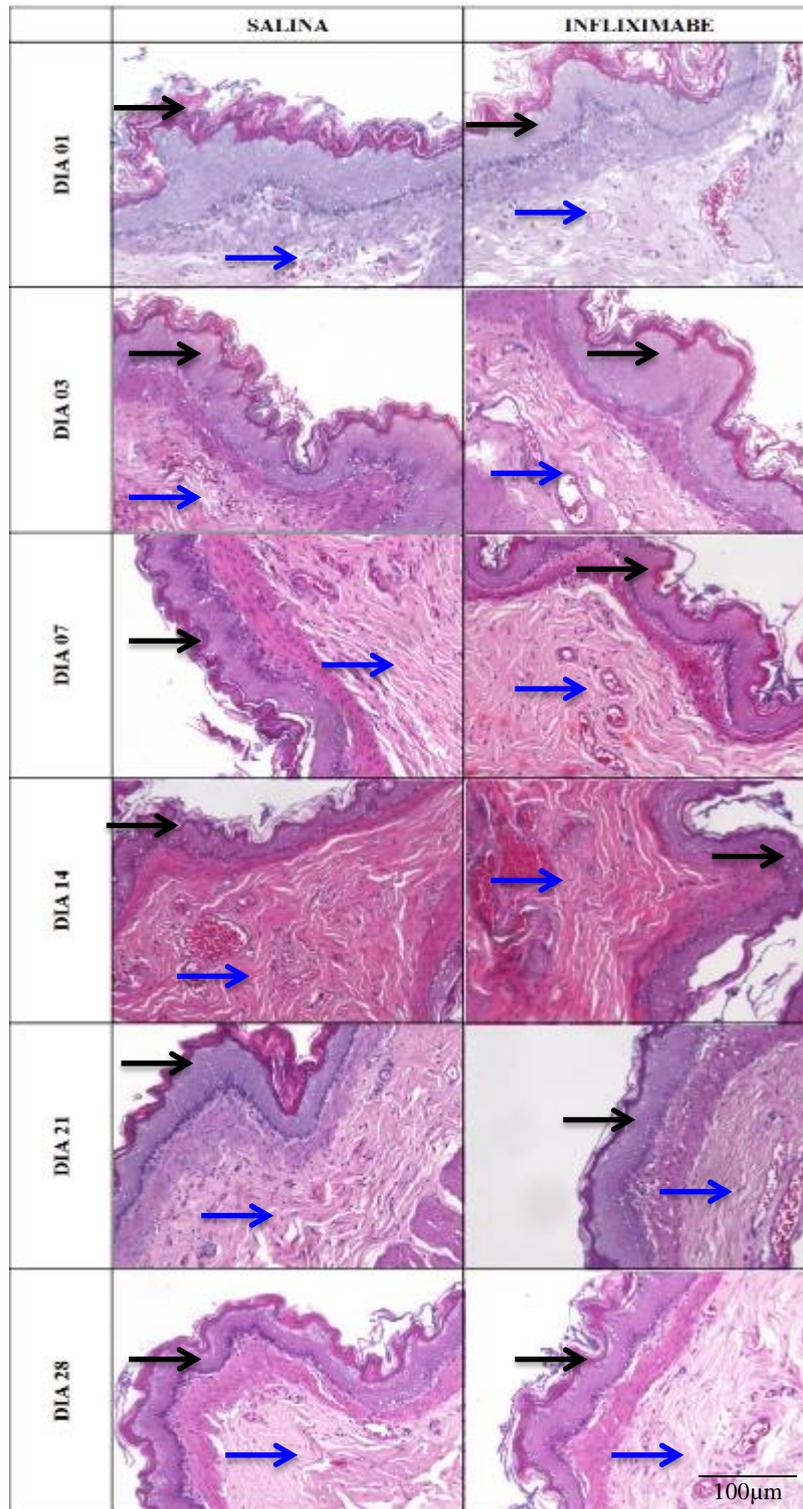
Tabela 5. Índice dos órgãos fígado, estômago, baço e rins dos animais submetidos a exodontia do 1º molar inferior tratados com infliximabe ou salina.

	Tempo (dias)						p-Valor ^a
	01	03	07	14	21	28	
Índice hepático							
Salina	4,062±0,164	3,424±0,101	3,808±0,167	4,603±0,109	4,032±0,163	3,993±0,363	0,5743
Infliximabe	4,036±0,151	3,218±0,093	3,645±0,199	4,570±0,105	4,264±0,165	3,498±0,256	
Índice gástrico							
Salina	0,547±0,019	0,477±0,019	0,497±0,019	0,492±0,019	0,463±0,021	0,540±0,054	0,7665
Infliximabe	0,577±0,029	0,454±0,016	0,514±0,031	0,519±0,016	0,482±0,012	0,495±0,038	
Índice esplênico							
Salina	0,205±0,013	0,202±0,006	0,204±0,011	0,222±0,011	0,238±0,009	0,217±0,017	0,0091*
Infliximabe	0,189±0,007	0,167±0,005	0,243±0,011	0,217±0,017	0,243±0,014	0,178±0,009*	
Índice renal							
Salina	0,441±0,007	0,386±0,009	0,376±0,014	0,429±0,020	0,377±0,030	0,418±0,032	0,4062
Infliximabe	0,420±0,014	0,334±0,007	0,364±0,016	0,397±0,014	0,392±0,006	0,365±0,022	

O índice dos órgãos fígado, estomago e rins não diferiram de maneira significativa entre os grupos tratados com solução salina e com infliximabe (0,0937; 0,9894 e 0,4062 respectivamente). Entretanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para o índice esplênico no dia 28(p=0,091).

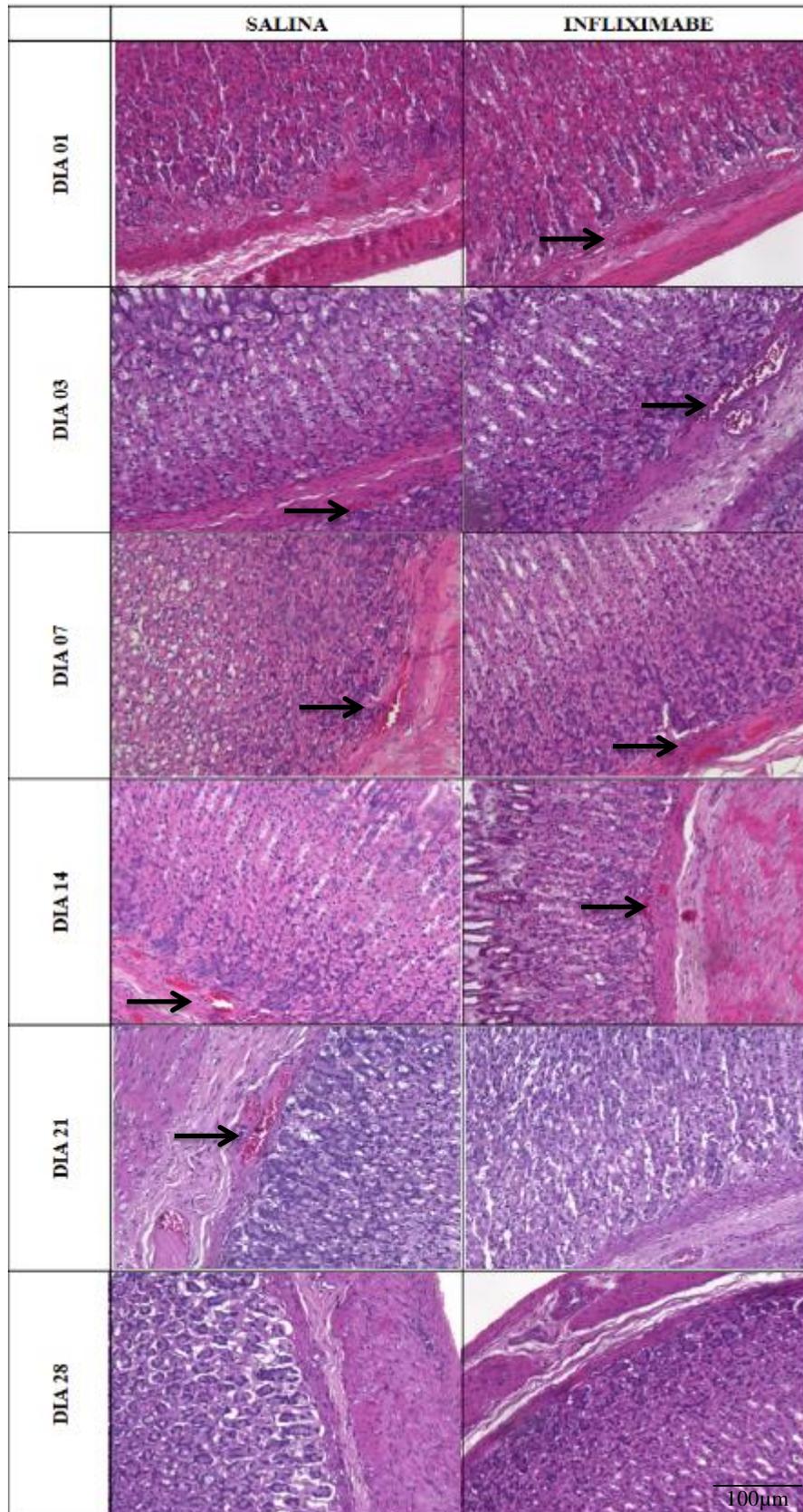
a- ANOVA-2-way/Bonferroni; Dados expressos em forma de média ± erro-padrão (p<0,05)

Figura 8. Fotomicrografia da região de cárdia do estômago dos animais tratados com infliximabe ou salina.



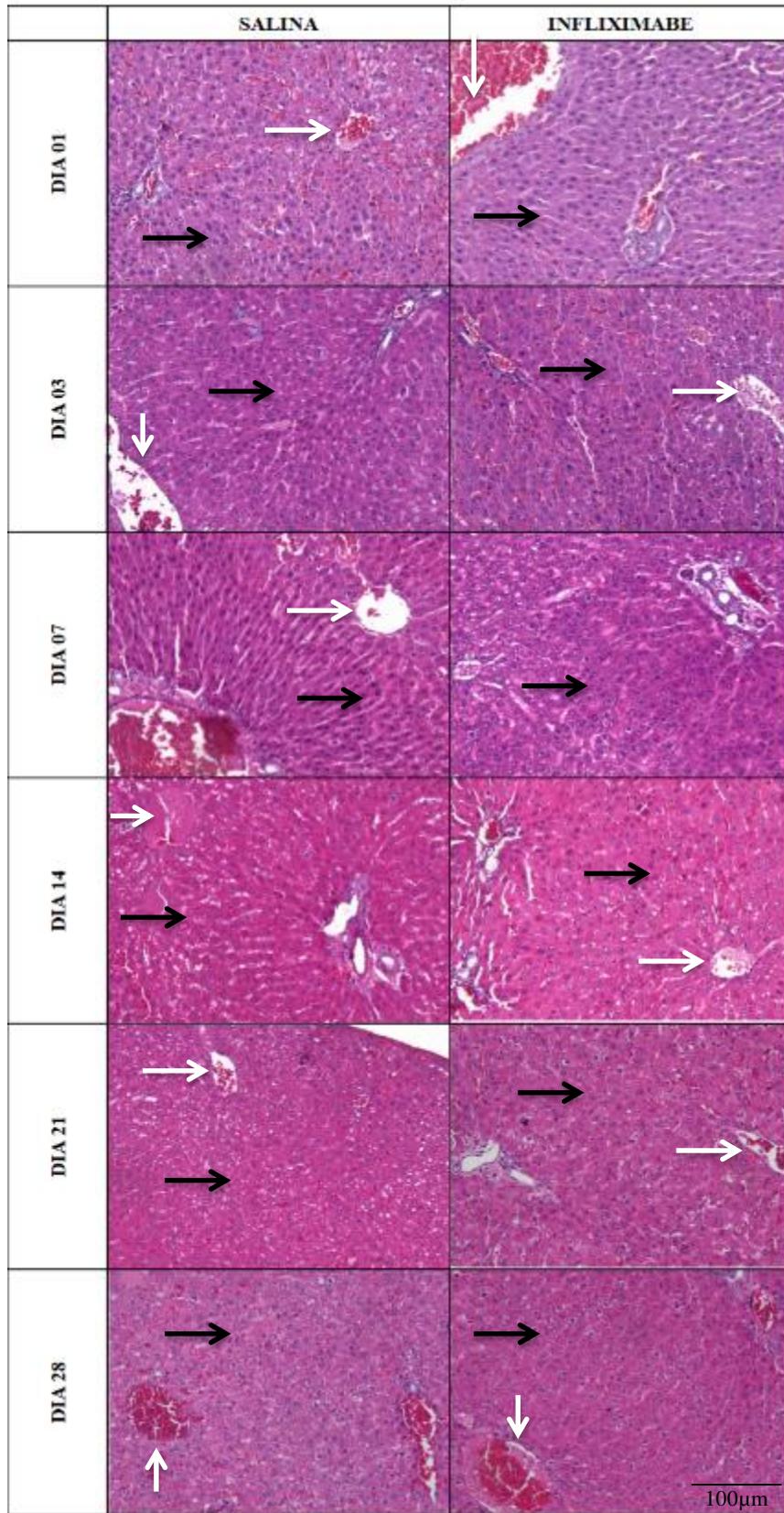
A mucosa gástrica da cárdia exibiu revestimento por epitélio estratificado pavimentoso ortoceratinizado, sob o qual há córion fibroso com vasos sanguíneos ectásicos (HE, 200x). Seta preta: epitélio de revestimento; seta azul: córion fibroso.

Figura 9. Fotomicrografia da mucosa do fundo/corpo do estômago



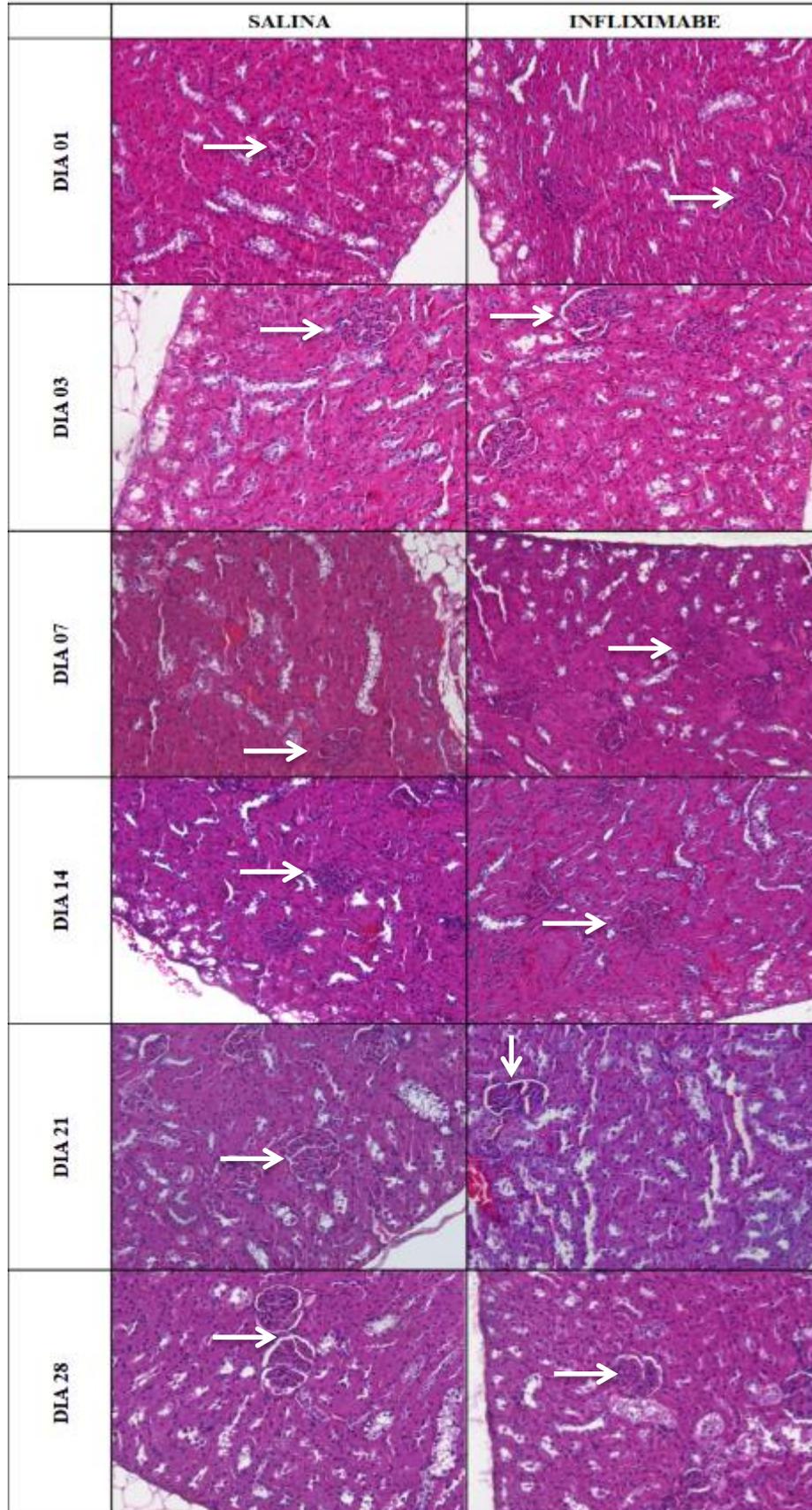
Foram visualizadas glândulas gástricas com células principais e parietais, seguida de túnica muscular e submucosa com vasos sanguíneos ectásicos (seta) (HE, 200x).

Figura 10. Fotomicrografia do fígado dos animais tratados com infliximabe ou salina



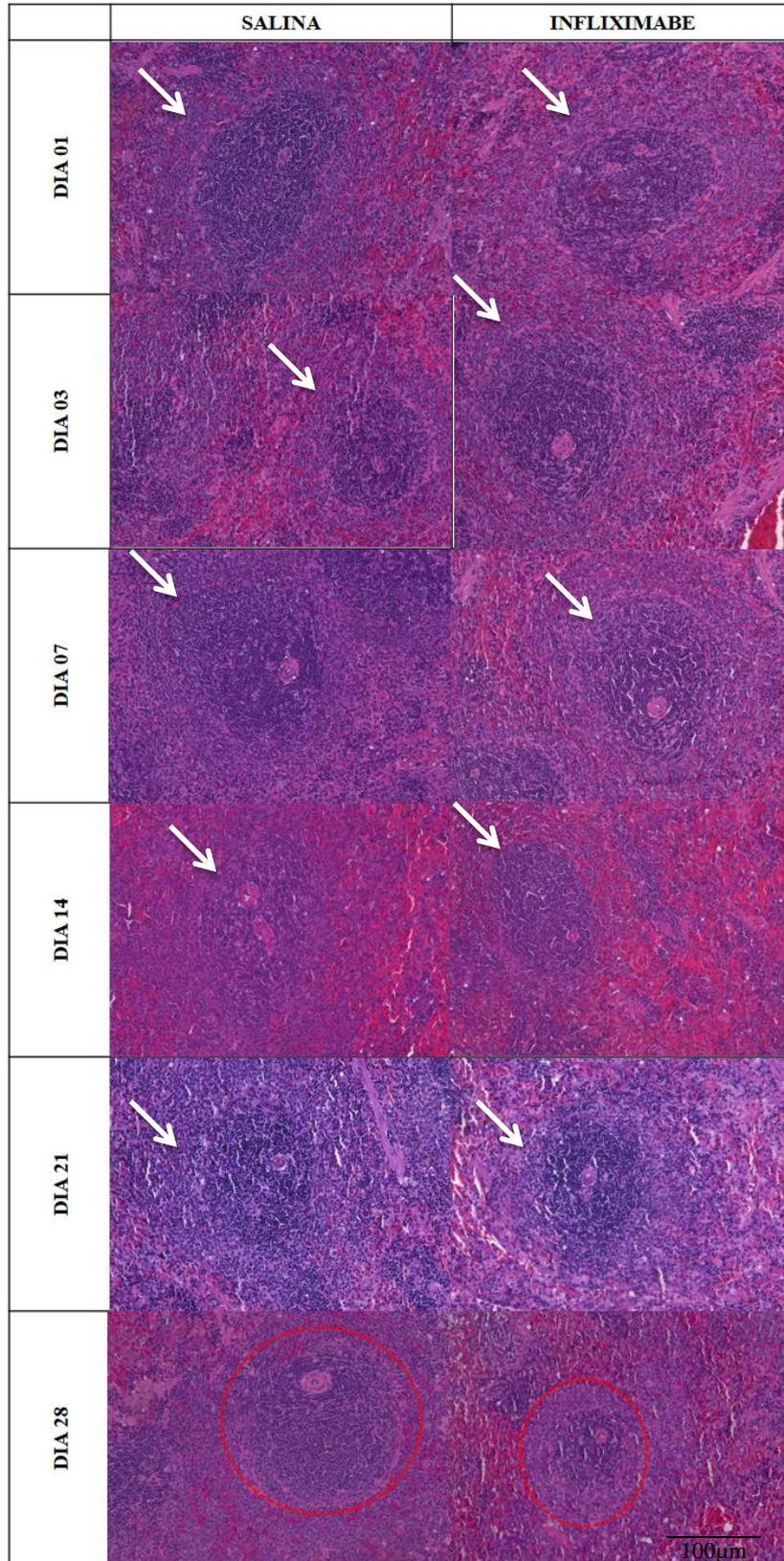
. Arquitetura lobular representada por cordões de hepatócitos e congestão veia centrolobular e portal foram observados (HE, 200x). Seta preta: hepatócitos; seta branca: veia centrolobular.

Figura 11. Fotomicrografia do rim dos animais tratados com infliximabe ou salina



Visualiza-se preservação da estrutura glomerular e dos túbulos proximais e distais (HE 200x). Seta branca: glomérulos.

Figura 12. Fotomicrografia do baço dos animais tratados com infliximabe ou salina,



Foi identificado atrofia de polpa branca (círculo) somente no 28º dia após a exodontia. (HE, 200x). Seta branca/círculo vermelho: polpa branca.

Gráfico 12: Análise histomorfométrica da área correspondente à polpa branca no baço dos animais salina e tratados com infliximabe,



Foi observada diminuição da área total dos nódulos linfoides nos animais tratados com infliximabe em relação ao salina ($p=0,0194$ / teste t de Student).

5 DISCUSSÃO

O infliximabe caracteriza-se por ser um potente inibidor de TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, o qual, por essa capacidade, tem sido amplamente utilizado no tratamento de doenças de cunho inflamatório. O presente trabalho buscou investigar se a inibição de TNF- α causada por essa droga seria capaz de interferir na cicatrização de alvéolos dentários após procedimento de exodontia.

O modelo experimental não revelou diferenças entre os grupos de animais que receberam infliximabe ou salina em relação ao tempo de exodontia, à massa dos dentes e número de fraturas radiculares. Esses parâmetros são reportados na literatura como relacionados à dificuldade cirúrgica e conseqüentemente proporcionais ao aumento da dor e inflamação pós-operatórias (BELLO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2000). Dessa forma, pode-se inferir que o procedimento cirúrgico, o qual foi realizado de forma aleatorizada e por operador previamente treinado que desconhecia os grupos experimentais, minimizou a influência de fatores traumáticos (advindos da dificuldade cirúrgica) que pudessem gerar dano tecidual e inflamação adicionais capazes de interferir nos resultados obtidos.

Quanto aos achados radiográficos, não foram visualizadas diferenças significantes entre as áreas radiolúcidas pós-exodontia dos grupos infliximabe e salina. Tais achados corroboram com os descritos por Nakachi et al. (2012) os quais também não observaram alterações radiográficas significantes em exame de micro tomografias computadorizadas (μ CT) em modelo de cicatrização alveolar entre animais do grupo controle e animais tratados com composto indutor de modificação alostérica por cavidade (CIAM), um outro tipo de bloqueador da ação do TNF- α . Esses dados sugerem que a inibição de TNF- α parece não alterar o reparo ósseo sob ponto de vista da avaliação radiográfica.

Na descrição histopatológica dos sítios pós-exodontia, em relação aos grupos de 1, 3 e 7 dias, os achados são coerentes com os previamente descritos na literatura (KIM et al., 2012) onde foram visualizados alvéolos preenchidos por coágulo sanguíneo no primeiro dia, com posterior substituição por fibrina e tecido de granulação no terceiro dia e início de formação de tecido ósseo a partir do sétimo dia de observação.

No que diz respeito a menor quantidade de células inflamatórias nos alvéolos dentários no grupo infliximabe encontrada no presente trabalho, foi descrito previamente na literatura que o TNF- α configura-se como um potente agente quimiotático e ativador de células leucocitárias, como macrófagos e neutrófilos, sendo capaz de aumentar inclusive a

atividade fagocitária dessas células *in vitro* (LIN et al., 2007; NIU et al., 2015). Assim, a inibição dessa citocina pode ter interferido negativamente na quimiotaxia celular, representada por menor influxo de células inflamatórias nos alvéolos dentários.

Além disso, os achados histológicos representados por menor deposição de tecido ósseo e maior quantidade de tecido conjuntivo, corroboram com os resultados de Gerstenfield et al. (2003) os quais descreveram a cicatrização de fraturas de fêmur em modelos de reparo endocondral e intramembranoso em ratos *knockout* para o receptor de TNF (TNFR-) avaliados nos dias 7, 14, 21 e 28. Tal estudo concluiu que os ratos com ausência do receptor de TNF apresentaram déficit de cicatrização nos dias avaliados, com menor formação de tecido ósseo e persistência de tecido fibroso cicatricial quando comparados aos animais do grupo controle.

Modelos de extração dentária e alveolite demonstram que os níveis de TNF- α apresentam correlação positiva com a quantidade de infiltrado inflamatório presente no interior dos alvéolos, bem como correlação negativa com a quantidade de tecido ósseo depositado (CARDOSO et al., 2011). Apesar das diferenças entre os modelos experimentais, os achados com relação aos níveis de TNF- α e a cicatrização óssea se assemelham ao presente estudo, no qual essa citocina foi inibida por infliximabe e foi observada menor deposição de tecido ósseo e menor contagem de células inflamatórias em dias específicos.

Alguns estudos tem demonstrado a importância do TNF- α na atividade e recrutamento de diversas células inflamatórias, bem como o efeito de sua inibição por agentes bloqueadores, como o infliximabe, nas suas atividades.

Sobre os neutrófilos, estudos prévios *in vitro* demonstram que esse fármaco possui capacidade de reduzir a quimiotaxia e produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente devido ao bloqueio da ação de células mononucleares sobre os polimorfonucleares (PAY et al, 2005). Tal ação foi atribuída por causa da diminuição dos níveis e da ação de agentes quimiotáticos como a IL-8 e o Peptídeo epitelial ativador de neutrófilos -78 (ou CXCL5) (DOMINICAL et al., 2011), sugerindo diminuição do número dessas células, bem como de sua ação.

Também é discutido na literatura o efeito desse fármaco sobre células mononucleares, principalmente, macrófagos. Supõe-se que o tratamento com infliximabe é capaz de provocar apoptose de monócitos e macrófagos no sangue periférico e em sítios específicos como líquido sinovial (CATRINA et al., 2005), entretanto os mecanismos pelos quais ocorrem essa apoptose não estão bem elucidados.

Por ser um anticorpo monoclonal que se ancora à membrana de macrófagos e linfócitos, autores sugerem que o fármaco poderia causar apoptose dessas células, a partir da ativação do sistema complemento ou por citotoxicidade celular dependente de anticorpos a partir de seu fragmento Fc, entretanto ainda não foi possível demonstrar a lise de macrófagos por infliximabe através desse mecanismo *in vivo* (SCALLON et al., 1995).

Foi reportado, também que o infliximabe causou aumento de apoptose de monócitos em pacientes com doença de Crohn através de um mecanismo dependente de caspase-3 (LUGERING et al., 2001). Estudo ex-vivo com amostras de pacientes tratados com infliximabe demonstrou aumento no número de linfócitos CD3+ apoptóticos (VAN DER BRANDE et al., 2003). Assim, sugere-se que a eliminação de linfócitos T efetores também seja um possível mecanismo de ação associado à diminuição de células de defesa, notadamente mononucleares, como macrófagos.

Gunnlaugsdottir et al. (2008) descreveram que a utilização *in vitro* do infliximabe torna os linfócitos T naive não responsivos quando co-estimulados por CD28. Os autores sugeriram que o infliximabe parece prevenir a divisão de linfócitos T CD4+ e CD8+ naive e consequentemente ativar a morte celular induzida pela não-sensibilização dessas células.

O TNF- α consiste em uma importante citocina para a produção de sinalizadores como CCL -2, -3, -4, -5 e -8 em macrófagos e em células T, bem como expressão de moléculas de adesão como CD54, importantes para a promoção de acúmulo focal de células inflamatórias nos sítios de infecção (ROACH et al., 2002). Nos macrófagos, o TNF aumenta o seu poder de fagocitose e a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, em sinergismo com o IFN- γ (BEKKER et al., 2001). O bloqueio do TNF e seus receptores em ratos tem demonstrado desorganização na formação de infecções granulomatosas, bem como maior susceptibilidade a infecções por *M. tuberculosis* e *Histoplasma capsulatum*, por exemplo (EHRLES et al., 2004). Tal efeito na susceptibilidade a infecções também é sugerido para os pacientes que fazem uso do infliximabe, ocasionando provavelmente defeitos na formação de infiltrados inflamatórios, principalmente naqueles em que há grande participação de macrófagos (WOLFE et al. 2004).

Já foi descrito que o infliximabe possa atuar reduzindo o número de células precursoras de osteoclastos, provavelmente por efeitos desse fármaco na produção de precursores da medula óssea (GENGEBACHER et al, 2008). Estudos também apontam que o infliximabe age negativamente sobre formação de osteoclastos a partir de células precursoras mononucleares do sangue periférico, inibindo seu crescimento e agrupamento, etapas cruciais para sua diferenciação (DE VRIES et al., 2015). Além disso, foi visto que pacientes em uso

de inibidores de TNF podem apresentar supressão de RANK e RANK-L em detrimento de maiores níveis de OPG, fatores que regulam a diferenciação da linhagem osteoblástica, culminando em menor formação de osteoclastos (LEE et al., 2004).

Gengenbacher et al., 2008, também demonstraram *in vitro*, que a terapia com infliximabe diminui a resposta de osteoclastos maduros ao RANKL, confirmando que a via do TNF- α atua de maneira sinérgica ao eixo RANK-RANK-L- OPG no processo de controle da ativação das linhagens celulares relacionadas ao metabolismo ósseo.

Musacchio et al., 2009 também identificaram que o administração de infliximabe inibe a expressão gênica de IL-1 β e IL-6 em células osteoclásticas, citocinas extremamente importantes para a diferenciação, atividade e recrutamento desse grupo celular.

Todos esses fatores apontados na literatura podem justificar a diminuição do número de polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos e osteoclastos visualizada no presente estudo em dias específicos.

Na análise histomorfométrica do sítio pós-exodontia, foi visto menor percentual de tecido ósseo, bem como maior percentual representado por tecido conjuntivo nos animais que receberam infliximabe, sendo essa diferença significativa no 14º dia de observação. Esses achados são corroborados, parcialmente, pelo estudo de GERTENSFIELD et al. (2003) os quais utilizaram ratos *knockout* para receptor de TNF- α e observaram menor deposição óssea associada a persistência de tecido conjuntivo nos ratos que não expressavam essa citocina nos dias 14 e 21 da cicatrização de fraturas de fêmur.

Entretanto, estes resultados contrapõem os de TIMMEN et al. (2014) os quais descreveram não haver diferenças na quantidade de tecido ósseo dos dias 14 e 28, por análise histomorfométrica, entre ratos tratados e não tratados com infliximabe em modelo de artrite reumatoide. Por outro lado, este artigo também mostra que o grupo infliximabe apresentou maior quantidade de tecido mole bem como demonstrou maior quantidade de tecido cartilaginoso na região de fratura, fatores que podem atrasar a cicatrização em modelos endocondrais.

A comparação com outros estudos é dificultada pelo fato de que não existem trabalhos semelhantes com inibidores de TNF na reparação de sítios pós-exodontia, nem tampouco estudos histomorfométricos, estando disponíveis apenas pesquisas da ação desse agente no reparo de fraturas de ossos longos. Esse tipo de processo biológico difere em alguns pontos do processo de cicatrização alveolar, pois se trata de um modelo de reparo frente a um processo traumático que envolve tanto o modelo endoperiosteal quanto endocondral de reparo ósseo. Tal consideração pode explicar as disparidades entre os resultados encontrados.

Sobre a deposição de colágeno, no presente estudo foram visualizados menores percentuais de preenchimento por colágeno do tipo I no grupo infliximabe em relação ao salina. Tais achados corroboram com os descritos na literatura por GERSTENFELD et al. (2001) os quais descrevem que em modelo de fratura de fêmur de ratos *knouck-out* para TNF- α houve menor quantificação de colágeno do tipo I.

O colágeno I é o mais comum dos tipos de colágeno, estando presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens, enquanto o tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos (BARASCUK et al., 2011; COUDROY et al., 2015). O primeiro tipo de colágeno (I) configura-se como um importante componente da matriz óssea, auxiliando na formação dos cristais de apatita e conferindo suporte estrutural, flexibilidade e resistência a tração para o osso neorformado (LINDER et al., 2015).

Estudos de Vieira et al. (2015) com a utilização de coloração de Picrossirius durante o processo de cicatrização em alvéolos de camundongos (sem alterações sistêmicas ou uso de medicamentos) descrevem resultados semelhantes ao descritos para o grupo salina do presente estudo. Também é descrita maior deposição de colágeno a partir dos dias 7 e 14, onde aparentemente o colágeno do tipo III é progressivamente substituído por colágeno do tipo I no decorrer do processo de cicatrização e aumento da deposição óssea.

Também se destacam sobre TNF- α e deposição de colágeno, os estudos de Turgut et al. (2014), os quais descreveram que a administração de infliximabe em modelo experimental poderia retardar a cicatrização tecidual por diminuir a atividade e quantidade de fibroblastos, bem como a expressão de TGF- β , FGF- β e PDGF, citocinas também importantes para a produção de colágeno.

A MPO configura-se como uma enzima encontrada abundantemente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e outras células inflamatórias a qual é utilizada para aferição indireta da atividade celular nos estágios iniciais do processo inflamatório. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do hospedeiro contra lesões teciduais. Estas células fagocíticas são capazes de produzir e liberar mediadores inflamatórios que amplificam e sustentam a resposta inflamatória, ativando e recrutando mais células polimorfonucleares (VAN DYKE; SERHAN, 2003).

Estudos anteriores demonstraram que o infliximabe é capaz de reduzir níveis séricos e locais de MPO em diversos modelos experimentais, como na doença inflamatória articular crônica (FEIJÓO et al., 2009), na isquemia intestinal (AKDOGAN et al., 2014) e na doença periodontal (GONÇALVES et al., 2014)

Foi descrita, também, a importância do TNF- α no recrutamento de neutrófilos e seu envolvimento com agentes quimiotáticos para este grupo celular (DOMINICAL et al., 2011). Sugere-se que a diminuição do número de neutrófilos observada na contagem celular do presente estudo, associada à diminuição dos níveis de MPO nos tecidos gengivais, apontem para a supressão de TNF- α pelo infliximabe, culminando em menor quimiotaxia e atividade dessas células.

A análise da expressão do TNF- α no grupo tratado com infliximabe mostrou menor quantidade de células marcadas quando comparada com o grupo salina, sendo encontradas diferenças significativas entre os grupos nos dias 07, 14, 21 e 28. Além disso, o pico da expressão dessa citocina, em ambos os grupos, foi o 7º dia. De maneira semelhante, outros estudos em modelos experimentais de exodontia tem demonstrado que maior quantidade de TNF- α é detectada em reações de imunohistoquímica nos intervalos entre 3 e 7 dias (KIM et al., 2012) com pico, geralmente, no 6º dia de reparo alveolar (CARDOSO et al., 2011). Ambos os estudos também afirmam que no dia primeiro dia de observação há fraca expressão de TNF- α , assim como verificado no presente trabalho.

Ao se considerar os resultados encontrados com a dosagem de MPO e a imunexpressão de TNF- α , pode-se afirmar que a administração de infliximabe (5 mg/kg, 1x/semana) foi eficaz na diminuição da expressão de TNF- α nos tecidos relacionados aos sítios pós-exodontia. Tais achados corroboram os descritos na literatura, onde o infliximabe administrado de forma endovenosa está presente em diversos tecidos com ação inibitória em ossos longos (TIMMEN et al.2014) e tecidos orais como periodonto (GONÇALVES et al., 2014), podendo interferir nos processos de deposição e remodelamento ósseo.

A utilização de inibidores de TNF- α , como o infliximabe, é descrita na literatura como fortemente associada a maior susceptibilidade de infecções (SINGH et al.,2015). Isso ocorreria devido a uma ação direta desses medicamentos na resposta imune dos indivíduos, agindo, assim, na sua capacidade de defesa; além disso, as doenças nas quais esses agentes são utilizados já tornariam esses indivíduos mais propensos a infecções se comparados à população em geral (FURST et al., 2010). As ocorrências mais comuns associadas a essa terapia são infecções no trato respiratório e de pele (LISTING et al., 2005). Dentre elas destacam-se: tuberculose, aspergilose, histoplasmose, coccidiodomicose, listeriose, pneumonias, criptococose e citomegalovirose (SAKAI et al., 2012; AALTONEN et al, 2015).

Existe uma controvérsia na literatura com relação à necessidade de interrupção da terapia anti-TNF- α antes de procedimentos cirúrgicos ortopédicos de grande porte como medida de prevenção de infecções pós-cirúrgicas (TIMMEN et al., 2014; GOH et al., 2012).

Entretanto, em alguns ensaios clínicos em pacientes com artrite reumatoide (AR) sob tratamento com anti-TNF- α apenas ou em associação com metotrexato, consideraram que esses indivíduos não apresentaram um risco maior de infecção ou déficit cicatricial se comparados aos do grupo controle (pacientes com AR que não utilizavam anti-TNF- α e metotrexato, respectivamente) (HIRANO et al., 2010; MURATA et al., 2006)

Sobre infecções orais, não existem estudos conclusivos sobre risco aumentado de infecções. No presente estudo, entretanto, não foram notadas diferenças entre o percentual de presença de material basofílico sugestivo de colonização bacteriana entre os grupos infliximabe e salina. Esses achados ocorreram em detrimento da diminuição de algumas células inflamatórias em dias específicos visualizadas na análise histomorfométrica, parecendo, portanto, que essas alterações imunológicas causadas pela inibição de TNF- α não estão relacionadas com maior ou menor presença de colônias bacterianas em sítios de exodontia.

Em relação às análises dos índices dos órgãos e respectivas avaliações histológicas para fígado, estômago e rins não foram vistas diferenças significativas entre os grupos infliximabe e salina, na presente pesquisa. Na literatura, são inconspícuos os relatos de toxicidade deste inibidor de TNF- α , havendo algumas complicações pós-infusão do fármaco a qual incluem: rubor, prurido, febre e mialgia (LICHTENSTEIN et al., 2015).

Parekh e Kaur (2014) mostraram alterações hepáticas tidas como idiossincráticas associadas a terapia com infliximabe.

Destaca-se que esse fármaco tem sido utilizado no tratamento de doenças como sarcoidose e amiloidose renal (BLACKMUR et al., 2014, AHMED et al., 2007), além de prevenir efeitos hepatotóxicos de drogas como paracetamol (FERAH et al., 2013). Contudo, além de não possuir aparente toxicidade sobre os órgãos, o efeito inibidor de etapas inflamatórias desse fármaco parece ser benéfico na prevenção de algumas alterações órgão-específicas.

O baço é um importante órgão linfóide composto por uma polpa vermelha, responsável pelo processamento de hemácias e plaquetas, e uma polpa branca constituída por acúmulos linfóides. Estes folículos apresentam uma região interna rica em linfócitos T (bainha linfocitária periarteriolar) e uma zona marginal constituída por células diversas como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (nódulo esplênico). Neste estudo foram identificadas alterações no índice deste órgão bem como atrofia de polpa branca no 28º dia de observação. A atrofia foi verificada por análise histomorfométrica a qual indicou menor área total dos nódulos linfóides, com redução da bainha de linfócitos periarterial. Estes dados

corroboram com outros já descritos na literatura, os quais relatam efeito do infliximabe principalmente relacionado com apoptose de monócitos e linfócitos T (SHEN et al., 2005).

Portanto, a administração de infliximabe (5 mg/kg, 1x por semana) foi capaz de interferir no processo de cicatrização óssea de alvéolos pós-exodontia em ratos. Este é o primeiro estudo sobre a influência de anticorpos monoclonais inibidores de TNF- α no reparo de alvéolos dentários.

Salienta-se a necessidade de condução de novos estudos experimentais e ensaios clínicos que suportem a indicação de cuidados adicionais em procedimentos cirúrgicos de exodontia, em pacientes sob terapia com inibidores de TNF- α .

6 CONCLUSÃO

Os inibidores de TNF- α (infiximabe) podem alterar a capacidade de reparo ósseo em sítios pós-exodontia.

A imunoexpressão de TNF- α , nos alvéolos dentários pós-exodontia, nos dias 7, 14, 21 e 28 foi menor no grupo infiximabe em relação ao controle.

Alterações negativas na deposição de colágeno tipo I e de tecido ósseo, no número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos, e dosagem de MPO foram observadas em diferentes dias do processo cicatricial de alvéolos dentários de animais tratados com o inibidor de TNF- α .

A terapia com infiximabe foi associada com atrofia esplênica no 28º dia após exodontia do 1º molar inferior.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, K.J.; JOENSUU, J.T.; VIRKKI, L.; SOKKA, T.; ARONEM, P.; RELAS, H. et al. Rates of Serious Infections and Malignancies Among Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Either Tumor Necrosis Factor Inhibitor or Rituximab Therapy. **The Journal of rheumatology**. v.42, n.3, p.372-379, 2015.
- AHMED M.M., MUBASHIR E., DOSSABHOY N.R. Isolated renal sarcoidosis: a rare presentation of a rare disease treated with infliximab. **Clinical Rheumatology**. v. 26, n.8, p-1346-1349. 2007.
- AKDOGAN, R. A.; KALKAN, Y.; TUMKAYA, L. Influence of infliximab pretreatment on ischemia / reperfusion injury in rat intestine i. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 52, n. 1, p. 36–41, 2014.
- AL-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. **Journal of Dental Research**, Washington, v.87, n.2, p.107-118, 2008.
- ALVES, A. P.; PESSOA, C. DO O.; COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES FILHO, M. O. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 6, p. 457-464, 2007.
- ANDRADE TA, IYER A, DAS PK et al.. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res**. v. 44, p.1036-1047, 2011.
- BAKER, E. A.; EL-GADDAL, S.; WILLIAMS, L.; LEAPER, D. J. Profiles of inflammatory cytokines following colorectal surgery: Relationship with wound healing and outcome. **Wound Rep Reg** v.14: p.566-572. 2006;
- BALGA, R.; WETTERWALD, A.; PORTENIER, J.; DOLDER, S.; MUELLER, C.; HOSFSTETTER, W. Tumor necrosis factor-alpha: alternative role as an inhibitor of osteoclast formation in vitro, **Bone**, Elmsford, v.39, n.2, p.325-335, 2006.
- BARASCUK, N. et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen — A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 10-11, p. 900–906, 2011.
- BARBIEIRI, D., WISNIEWSKI, E., SALETE, M., WISNIEWSKI, W., ROMAN, S. S., CHICOTA, L. C., CEREZER, S. M., DALLAGO, R. G. Animal toxicity caused by formaldehyde and complucad® in wistar rats: acute exposure. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 4, p. 114 - 119, 2010.
- BARBOSA et al., Efeitos Adversos durante a Infusão de Infliximabe em Crianças e Adolescentes – Estudo Multicêntrico. **Rev bras reumatol**, v. 48, n.5, p. 278-282, set/out, 2008

BEHARI, J.; BEHARI, J. Changes in bone histology due to capacitive electric field stimulation of ovariectomized rat. **The Indian journal of medical research**, v. 130, n. 6, p. 720-725, 2009.

BEKKER LG, FREEMAN S, MURRAY PJ, RYFFEL B, KAPLAN G. TNF- α controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J Immunol* ; v. 166, p.6728–34, 2001.

BELLO, S. A.; ADEYEMO, W. L.; BAMGBOSE, B. O.; OBI, E. V.; ADEYINKA, A. A. Effect of age, impaction types and operative time on inflammatory tissue reactions following lower third molar surgery. **Head & Face Medicine**, v. 7, n. 8, 2011

BLACKMUR J.P., CHAPMAN F.A., BELLAMY C.O., SAVE V., PLEVRIS J.N., SHAND A.G., WHITWORTH C., DHAUN N. Anti-TNF- α therapy for renal amyloid as a complication of Crohn's disease. **QJM**; v. 107, n.1, p-57-59, 2014.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 473, p. 139-146, 2008.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

CANHÃO H, FONSECA JE, QUEIROZ MV. Epidemiologia da osteoporose, mecanismos de remodelação óssea e fatores protectores do osso. **Acta Reuma Port**; v. 30, p. 225-240, 2005.

CARDOSO, C. L. et al. Experimental dry socket . Microscopic and molecular evaluation of two treatment Alveolite experimental . Análise microscópica e molecular de duas modalidades de tratamento. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 26, n. 5, p. 365–372, 2011

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 72, p. 366-376, 1975.

CATRINA, A.I.; TROLLMO, C.; AF KLINT, E.; ENGSTROM, M.; LAMPA, J.; HERMANSSON, Y.; KLARESKOG, I.; ULFGREN, A.K. Evidence that anti- tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report, **Arthritis Rheum.** v. 52, p.61–72, 2005.

CHENG, H.; JIANG, W.; PHILIPS, F. M.; HAYDON, R. C.; PENG, Y.; ZHOU, L.; LUU, H. H.; AN, N.; BREYER, B.; VANICHAKAM, P.; SZATKOWSKI, J. P.; PARK, J. Y.; HE, T. C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **The Journal of Bone and Joint Surgery**. American volume. Boston, v.85-A, n.8, p.1544-1552, 2003.

CHO, T. J.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.17, n.3, p.513-520, 2002.

CHO, H. H.; KYOUNG, K. M.; SEO, M. J.; KIM, Y. J.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S. Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue cells, **Stem Cells Development**, Larchmont, v.15, n.6, p.853-864, 2006.

CIANTAR, M.; ADLAM, D.M. Treatment with infliximabe: Implications in oral surgery? A case report. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 45, p.507–510. 2007.

COUDROY, R. et al. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibroproliferative therapy? **Intensive care medicine**, v. 41, n. 6, p. 1159–60, jun. 2015.

DE VRIES, T. J. et al. Tumor necrosis factor- α antagonist infliximab inhibits osteoclast formation of peripheral blood mononuclear cells but does not affect periodontal ligament fibroblast-mediated osteoclast formation. *Journal of Periodontal Research*, p. n/a–n/a, 2015.

DOMINICAL, V. M. et al. Neutrophils of Rheumatoid Arthritis Patients on Anti-TNF- α Therapy and in Disease Remission Present Reduced Adhesive Functions in Association with Decreased Circulating Neutrophil-Attractant Chemokine Levels. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 73, n. 4, p. 309–318, 2011.

EHLERS, S. Tumor Necrosis Factor and Its Blockade in Granulomatous Infections: Differential Modes of Action of Infliximab and Etanercept? **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. Suppl 3, p. 199–203, 2005.

EINHORN, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, v.355, p.S7-S21, 1998.

EISSNER, G.; KIRCHNER, S.; LINDNER, H.; KOLCH, W.; JANOSCH, P.; GRELL, M.; SCHEURICH, P.; ANDREESSEN, R.; HOLLER, E. Reverse signaling through osteoclasts TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6193-6198, 2000.

FEIJÓO, M. et al. Infliximab reduces myeloperoxidase concentration in chronic inflammatory joint diseases. **Pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 211–6, jan. 2009.

FERAH I., HALICI Z., BAYIR Y., DEMIRCI E., UNAL B., CADIRCI E. The role of infliximab on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 35, n.3, p. 373-381, 2013.

FREITAS, L.A.M. Avaliação Dos Efeitos Do Anticorpo Monoclonal, Infliximabe, Na Cicatrização De Anastomoses Colônicas. Estudo Experimental Em Ratos. [Dissertação-Mestrado]. Disponível em: < <http://repositorio.unb.br/handle/10482/5310>>. 2007

FULLER, K.; MURPHY, C.; KIRSTEIN, B.; FOX, S.W.; CHAMBERS, T. J. TNF α potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. **Endocrinology**, v. 143, p. 1108-1118, 2002.

FURST, D. E. The Risk of Infections with Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 5, p. 327–346, 2010.

GENGENBACHER, M. et al. Infliximab inhibits bone resorption by circulating osteoclast precursor cells in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 67, n. 5, p. 620–4, 2008.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.88, n.5, p.873-884, 2003.

GERSTENFELD, L. C.; ALKHIARY, Y. M.; KRALL, E. A.; NICHOLLS, F. H.; STAPLETON, S. N.; FITCH, J. L. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v.54, p.1215-1228, 2006.

GOH, L.; JEWELL, T.; LAVERSUCH, C.; SAMANTA, A. Análise sistemática da influência do antifator de necrose tumoral [anti-TNF] sobre as taxas de infecção em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 53, n.6, p.501-515, 2013.

GONÇALVES, D.C. (Dissertação-Mestrado) Efeito antiinflamatório e antirreabsortivo ósseo do infliximabe na periodontite induzida em ratos Wistar/ Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/5382>> 2012.

GONÇALVES, D. C. et al. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 239, n. 4, p. 442–53, 2014.

GRAVES, P. **Histopatology of preclinical toxicity studies**. Elsevier, 3th edição, 2007.

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D.L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **J. Dent. Res.**, v. 90, p. 143-153, 2011.

GUNNLAUGSDOTTIR, B.; SKAFTADOTTIR, I.; LUDVIKSSON, B. R. Naive human T-cells become non-responsive towards anti-TNF?? (infliximab) treatment in vitro if co-stimulated through CD28. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, p. 624–634, 2008.

HANLEY DA. Biochemical markers of bone turnover. In: Henderson JE, Goltzman D, editors. The osteoporosis primer. 1st ed. **Cambridge:University Press**, p.239-252, 2000.

HIRANO, Y. et al. Influences of anti-tumour necrosis factor agents on postoperative recovery in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 29, p. 495–500, 2010.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

ISHIMURA, K.; MOROGUCHI, A.; OKANO, K.; MAEBA, T.; MAETA, H. Local expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 on wound healing of intestinal anastomosis during endotoxemia in mice. **J Surg Res.** v. 108, p. 91-97, 2002.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 264-271, 2013.

JOSEPH F. PIECUCH, What Strategies Are Helpful in the Operative Management of Third Molars? **J Oral Maxillofac Surg** v. 70,p. 25-32. 2012

JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.

KAYAL, R. A.; TSATSAS, D.; BAUER, M. A.; ALLEN, B.; AL-SEBAEI, M. O. KAKAR, S.; LEONE, C. W.; MORGAN, E. F.; GERSTENFELD, L. C.;EINHORN, T. A.; GRAVES, D. T. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. **Journal of Bone Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, New York, v.22, n.4, p.560-568, 2007.

KEKLIKOGLU, N. The localization of Fos B, a member of transcription factor AP-1 family, in rat odontoblasts and pulpal undifferentiated ectomesenchymal cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 42, n. 3, p. 191-193, 2004.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, v. 142, p. 5050-5055, 2001.

KIM, D. J.; CHA, J. K.; YANG, C.; CHO, A.; LEE, J. S.; JUNG, U. W.; KIM, C. S.; LEE, S. J.; CHOI, S. H. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 42, n. 5, p. 158-165, 2012.

KIMACHI K, KAJIYA H, NAKAYAMA S., IKEBE T., OKABE K. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.** v.383, p.297–308. 2011

KON, T.; CHO, T. J.; AIZAWA, T. YAMAZAKI, M.; NOOH, N.; GRAVES, D.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related pro inflammatory cytokines during fracture healing. **Journal of Bone Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, New York, v.16, n.6, p.1004-1014, 2001.

LACERDA, M. S.; ALESSI, A. C. Histobacteriologic evaluation of teeth with periodontal disease in dogs after periodontal sacling. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 137-149, 2002.

LEE, C. K. et al. Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor kappaB, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. **Arthritis and rheumatism**, v. 50, n. 12, p. 3831–3843, 2004.

LEE, S. K.; LORENZO, J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. **Current Opinion in Rheumatology**, Philadelphia, v.18, n.4, p.411-418, 2006.

LICHTENSTEIN L., RON Y., KIVITY S., BEN-HORIN S., ISRAELI E., FRASER G.M., DOTAN I., CHOWERS Y., CONFINO-COHEN R., WEISS B. Infliximab-Related Infusion Reactions: Systematic Review. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 9, n. 9, p. 806–815. 2015

LIMA Jr., R. C. P.; FIGUEIREDO, A. A.; FREITAS, H. C.; MELO, M. L. P.; WONG, D. V. T.; LEITE, C. A. V. G.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; VALE, M. L.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer and Chemotherapy Pharmacologic**, v. 69, n. 4, p. 931-942, 2012.

LIN P.L., PLESSNER H.L., VOITENOK N.N., FLYNN J.L. Tumor necrosis factor and tuberculosis. **J Investig Dermatol Symp Proc**. May; v.12(1):p. 22-25, 2007.

LISTING, J. et al. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3403–3412, 2005.

LUGERING A, SCHMIDT M, LUGERING N, PAUELS HG, DOMSCHKE W, KUCHARZIK T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent path- way. **Gastroenterology**; v.121, p. 1145–1157, 2001.

MAAHS, M. P.; AZAMBUJA, A. A.; CAMPOS, M. M.; SALUM, F. G.; CHERUBINI, K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head & Neck**, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2011.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. **Injury**, Bristol, v.40, n.3, p.S4-S7, 2009.

MURATA, K. et al. Lack of increase in postoperative complications with low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis undergoing elective orthopedic surgery. **Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association**, v. 16, n. 1, p. 14–9, jan. 2006.

MUSACCHIO, E. et al. The Tumor Necrosis Factor- -blocking Agent Infliximab Inhibits Interleukin 1ss (IL-1ss) and IL-6 Gene Expression in Human Osteoblastic Cells. **The Journal of Rheumatology**, v. 36, n. 8, p. 1575–1579, 2009.

NAKACHI H., AOKI K., TOMOMATSU N., ALLES N, NAGANO K., YAMASHIRO M, ZHANG H, MURALI R., GREENE M.I., OHYA K, AMAGASA T. A structural modulator of tumor necrosis factor type 1 receptor promotes bone formation under lipopolysaccharide-induced inflammation in a murine tooth extraction model. **European Journal of Pharmacology**, v. 679, p. 132–138, 2012

OLICHESKI, A. T. (Dissertação-Mestrado) Comparação entre métodos de coloração panótico rápido e giemsa para diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de

Riquétsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil. **Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ 2003.**

PAREKH R. & KAUR N. Liver Injury Secondary to Anti-TNF-Alpha Therapy in Inflammatory Bowel Disease: A Case Series and Review of the Literature. **Case Reports in Gastrointestinal Medicine.** v. 2014, n. 956463. doi:10.1155/2014/956463. 2014.

PAY, S. et al. Chimerical anti-TNF-alpha, infliximab, inhibits neutrophil chemotaxis and production of reactive oxygen species by blocking the priming effect of mononuclear cells on neutrophils. **Immunopharmacology and immunotoxicology,** v. 27, n. 2, p. 187–98, jan. 2005.

REDDI, A. H.; Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. **The Journal of Bone and Joint Surgery.** American volume. Boston, v.83-A, p.S1-S6, 2001.

RIBEIRO et al. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European Journal of Pharmacology.** v.391,p.97–103. 2000.

ROACH DR, BEAN AG, DEMANGEL C, FRANCE MP, BRISCOE H, BRITTON WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **J Immunol;** v. 168, p.4620–4627, 2002.

ROBLING AG, CASTILLO AB, TURNER CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. **Annu Rev Biomed Eng;** v. 8, p.455-498. 2006.

SAKAI, R.; KOMANO, Y.; TANAKA, M.; NANKI, T.; KOIKE, R.; NAGASAWA, H. et al. Time-Dependent Increased Risk for Serious Infection From Continuous Use of Tumor Necrosis Factor Antagonists Over Three Years in Patients With Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Care & Research.** v. 64, n. 8, p. 1125–1134, 2012.

SANDROS, J., KARLSSON, C., LAPPIN, D. F., MADIANOS, P. N., KINANE, D. F. & PAPAPANOU, P. N. Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection. **J Dent Res.** v. 79, p.1808–1814, 2000.

SCALLON BJ, MOORE MA, TRINH H, KNIGHT DM, GHAYYEB J. Chimeric anti-TNF- α monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF- α and activates immune effector functions. **Cytokine;** v.7; p. 251–259, 1995.

SCHMITTGEN, T.D., B.A. ZAKRAJSEK, A.G. MILLS, V. GORN, M.J. SINGER, AND M.W. REED. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Anal. Biochem.** v. 285, p. 194-204, 2000.

SFEIR, C.; HO, L.; DOLL, B. A.; AZARI, K.; HOLLINGER, J. O. Fracture Repair. In: LIEBERMAN, J. R.; FRIEDLAENDER, G. E. **Bone Regeneration and Repair.** NJ: Humana Press, p.21-44, 2005.

SHAKER, O.; GHALLAB, N. A.; HAMDY, E.; SAYED, S. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gingival tissues of chronic periodontitis with and without diabetes:

immunohistochemistry and RT-PCR study. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 10, p. 1397-1346, 2013.

SHEN. C., MAERTEN P., GEBOES K., VAN ASSCHE G., RUTGEERTS P., CEUPENNS J.L. Infliximab induces apoptosis of monocytes and T lymphocytes in a human–mouse chimeric model. **Clinical Immunology** v. 115 p. 250–259, 2005

SINGH, J. A. et al. Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 258–265, 2015.

SIQUEIRA JR., J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Medsi – Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro - RJ. 2000.

SODEK J, MCKEE ME. Molecular and cellular biology of alveolar bone **Periodontology**; v. 24, p.99-126. 2000

SOUSA, A. P. A.; TORRES, M. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FILHO, F. D. R. ALVES, A. P. N. N.; LOTUFO, L. V. C. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 7-13, 2007.

SPANAKIS E, SIDIROPOULOS P, PAPADAKIS J, GANOTAKIS E, KATSIKAS G, KARVOUNARIS S, BIZAKI A, KRITIKOS H, BOUMPAS DT.. Modest but sustained increase of serum high density lipoprotein cholesterol levels in patients with inflammatory arthritides treated with infliximabe. **J Rheumatol**. Dec; v. 33, n.12,p. 2440-6. 2006

THEODORO, A. et al., Efeito da aPDT na osseointegração de implantes em alvéolos contaminados. **Rev Odontol UNESP**. Jan-Feb; v.41, n.1, p. 1-8. 2012

TIMM, L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231 - 239, 2005.

TIMMEN, M. et al. Influence of anti TNF-alpha antibody treatment on fracture healing under chronic inflammation. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 15, n. 184, p. 1–6, 2014.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 9 ed. – Rio de Janeiro, Elsevier. p.125. 2014

TSUJI, K.; BANDYOPADHYAY, A.; HARFE, B. D.; COX, K.; KAKAR, S.; GERSTENFELD, L.; EINHORN, T.; TABIN, C. J.; ROSEN, V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. **Nature Genetics**, New York, v.38, n.12, p.1424-1429, 2006.

TURGUT, B. et al. Topical infliximab for the suppression of wound healing following experimental glaucoma filtration surgery. **Drug design, development and therapy**, v. 8, p. 421–9, 2014.

VAN DEN BRANDE JM, BRAAT H, VAN DEN BRINK GR, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**; v.124, p. 1774–1785, 2003.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **Journal of dental research**, v. 82, p. 82–90, 2003.

VASCONCELOS, M. C., BEZERRA, D. P., FONSECA, A. M., PEREIRA, M. R. P., LEMOS, T. L. G., PESSOA, O. D. L., PESSOA, C., MORAES, M. O., ALVES, A. P. N. N., COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of Biflorin, an *o*-Naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 8, p. 1416-1421, 2007.

VIEIRA, A. E. et al. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. **PLoS one**, v. 10, n. 5, p. e0128021, 2015.

VIS M., NURMOHAMED M.T., WOLBINK G., VOSKUYL A.E., DE KONING M., VAN DE STADT R., TWISK J.W., DIJKMANS B.A., LEMS W.F. Short term effects of infliximab on the lipid profile in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** Feb;v. 32, n.2,p.252-255, 2005.

WABINGA, H. R. Comparison of immunohistochemical and modified Giemsa stains for demonstration of *Helicobacter pylori* infection in an African population. **African Health Sciences**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2002.

WOLFE F, MICHAUD K, ANDERSON J, URBANSKY K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. **Arthritis Rheum**; v. 50; p. 372–379; 2004.

YANG, X.; RICCIARDI, B. F.; HERNANDEZ-SORIA, A.; SHI, Y.; CAMACHO, N. P.; BOSTROM, M. P. G. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. **Bone**, Elmsford, v.41, n.6, p.928-936, 2007.

ZHANG YH, HEULSMANN A, TONDRAVI MM, MUKHERJEE A, ABU-AMER Y Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. **J Biol Chem** v. 276:p.563–568. 2001.

ANEXO



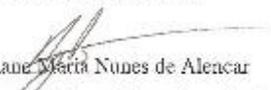
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 97/2014, sobre o projeto intitulado: "AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA DOS ALVÉOLOS DENTÁRIOS PÓS-EXODONTIAS EM RATOS ASSOCIADA À TERAPIA COM INFLIXIMABE: ASPECTOS RADIOGRÁFICOS, HISTOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS", de responsabilidade da Pro^{fa}. Dr^a. Ana Paula Negreiro Nunes Alves e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 24 de setembro de 2014.

Fortaleza, 16 de outubro de 2014.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA