



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

KARINE CESTARO MESQUITA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ABATACEPT NA REMODELAÇÃO ÓSSEA
PÓS EXODONTIA E EM PARÂMETROS VASCULARES NA POLPA DENTÁRIA DE
RATOS**

FORTALEZA

2022

KARINE CESTARO MESQUITA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ABATACEPT NA REMODELAÇÃO ÓSSEA
PÓS EXODONTIA E EM PARÂMETROS VASCULARES NA POLPA DENTÁRIA DE
RATOS**

Tese de Doutorado a ser apresentada à banca avaliadora para obtenção parcial de título de Doutor em Odontologia pela Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Clínica Odontológica
Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M544i Mesquita, Karine Cestaro.
Influência do tratamento com abatacept na remodelação óssea pós exodontia e em parâmetros vasculares na polpa dentária de ratos / Karine Cestaro Mesquita. – 2022.
84 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.
1. abatacept. 2. Alvéolo Dental. 3. Cavidade Pulpar. I. Título.

CDD 617.6

KARINE CESTARO MESQUITA

Tese de Doutorado a ser apresentada à banca
avaliadora para obtenção parcial de título de
Doutor em Odontologia.

Aprovado em 10/11/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mário Roberto Pontes Lisboa
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Prof. Dra. Clarissa Pessoa Fernandes Forte
Centro Universitário Christus (Unichristus)

FORTALEZA

2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, que me apoiou ao longo de todos esses anos, a meus amigos, os quais me deram suporte quando mais necessitei, e a meus mestres, por serem exemplo e orientação.

AGRADECIMENTOS

O desejo de realizar uma pós graduação (mestrado e doutorado) veio de uma grande inquietação por me sentir estagnada. O caminho é árduo e o aprendizado intenso, entretanto, é possível e gratificante, principalmente quando temos pessoas importantes ao longo dessa jornada. Tenho muito orgulho de, ao longo de todos esses anos, ter convivido com pessoas especiais que me deram o suporte necessário e me inspiraram para que pudesse chegar ao fim desse processo.

Inicialmente gostaria de agradecer à Deus, pois certamente foi Ele quem orquestrou tudo e providenciou a presença de cada um dos que agradecerei a seguir em minha caminhada. Obrigada por me dar também a força e a coragem necessária para seguir.

À minha família, pais Luceli e Bosco, irmão Matheus e esposo João Paulo, todos vocês foram de suma importância para o equilíbrio nos momentos mais difíceis e apoio sempre que necessário e a meu bebê, responsável por minha força e coragem para finalizar o trabalho da melhor forma possível adiantando um pouco minhas previsões.

Aos meus irmãos de pós-graduação Isabelly, Thinali e Paulo Goberlânio em vocês encontrei companheirismo e apoio sempre que necessário. Não houve uma vez que tenha precisado e não houvesse um de vocês ao meu lado me dando suporte. Saibam que vocês fizeram completa diferença em minha trajetória, e essa finalização hoje, não seria possível sem vocês.

Aos meus amigos de pós-graduação José Vitor, Dayrine e Alceu, os quais foram imprescindíveis em diferentes etapas da pesquisa, compartilhando de minha vontade de fazer dar certo e se disponibilizando sempre que preciso para me ajudar.

Aos alunos de graduação, especialmente Alexandre, Caio, Beatriz, Jenifer e Larissa, que me auxiliaram no curso dos experimentos e sempre que necessário se disponibilizavam e eram solícitos as demandas que surgiam.

À equipe de pulsoterapia do Hospital Universitário Walter Cantídio pela colaboração ao longo do curso da pesquisa, à Instituição Unichristus por ceder o espaço sempre que necessário para realizarmos algumas etapas da pesquisa, e à Universidade Federal do Ceará, minha segunda casa desde 2006 até hoje.

Aos meus grandes mestres, professora Ana Paula, por sua extrema competência em tudo o que faz, sendo exemplo de força, pulso e imensa capacidade de agregação, professor Mário Rogério, por seu imenso conhecimento e disponibilidade, o seu conhecimento nos motiva a estudar sempre, e a meu orientador Fabrício Bitu, muito obrigada por toda a confiança e oportunidades, o senhor foi responsável por grandes transformações pessoais e profissionais em minha vida. Buscando sempre não quebrar sua confiança, fui capaz de realizar feitos que jamais imaginei. Muito obrigada! Vocês três configuram grandes exemplos de competência, trabalho em equipe e amor pela profissão. Me espelho em cada um de vocês para tentar ser sempre um pouco melhor.

A todos os membros da banca avaliadora que aceitaram contribuir com o aperfeiçoamento de nosso trabalho, cada um de vocês foi escolhido com muito zelo, pensando sempre no quanto iriam contribuir para nosso trabalho.

A todos os que não foram contemplados nos agradecimentos, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

Resumo

O Abatacept, proteína recombinante tem seu uso aprovado para o tratamento de artrite reumatoide. Esse fármaco modula seletivamente o sinal coestimulatório necessário para ativar linfócitos T, apresentando efeitos na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, achados secundários com relação ao aumento da deposição óssea, atraso na cicatrização de úlceras orais e redução da angiogênese. Devido a esses achados, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do tratamento com Abatacept na reparo ósseo pós exodontia e em parâmetros vasculares da polpa dentária de ratos Wistar. Para isso um total de 64 ratos Wistar machos foram utilizados, os quais foram divididos em grupo teste, recebendo administração subcutânea (SC) de abatacept 8mg/kg/semana, e no grupo controle (SC) solução salina equivolúmica de 0,1ml/kg/semana. A exodontia do primeiro molar inferior esquerdo foi realizada no décimo quinto dia pós administração, seguida de eutanásias nos dias 3, 7, 14 e 28 subsequentes (n=8/grupo/dia de eutanásia). As mandíbulas dos animais foram removidas e a hemimandíbula esquerda foi submetida a avaliação radiográfica, histológica e imunohistoquímica (TRAP, CD3+, FoxP3+, OPG, RANK e RANKL) com os dados analisados por meio do teste ANOVA-1-way e ANOVA-2-way/Bonferroni considerando $p < 0.05$ (GraphPad Pris 5.0). As hemimandíbulas direitas dos animais eutanasiados após 28 dias também foram analisadas, com o intuito de avaliar a polpa do primeiro molar inferior. Para isso, foi realizado processamento histológico (Hematoxilina-eosina) seguido de fotomicrografias no aumento de 400x para montagem integral das imagens das polpas dentárias para análise histomorfométrica, sendo realizada mensuração total da área das polpas, avaliação da área relativa de todos os vasos sanguíneos e a imunohistoquímica para os marcadores e-NOS, caspase 3 e FcRn. Testes t de Student ou Mann-Whitney foram utilizados ($p < 0,05$, GraphPad Pris 5.0). A avaliação da hemimandíbula esquerda não apresentou diferença significativa quanto a dificuldade cirúrgica, entretanto, radiograficamente houve atraso na deposição de osso no grupo abatacept ($p=0,012$) com alterações histológicas quanto a redução do número de polimorfonucleares ($p=0,028$) e mononucleares ($p=0,004$) e retardo na involução de MN ($p=0,003$). O número de osteoclastos ($p=0,009$) e células multinucleadas TRAP+ ($p=0,001$) reduziu e, apesar do tratamento com abatacept não interferir na quantidade de vasos no alvéolo pós exodontia, esteve associada ao aumento na imunexpressão para CD3+ ($p=0,038$), FoxP3+ ($p=0,002$), OPG ($p=0,003$) e RANK ($p=0,022$) e redução na imunexpressão para RANKL ($p=0,013$). Enquanto que na

hemimandíbula direita, em que foi avaliada as polpas dentárias dos animais tratados com abatacept, foi demonstrada redução da imunoposição para e-NOS ($p= 0,007$) nos odontoblastos, aumento para caspase 3 ($p = 0,021$) e foi observada imunoposição de FcRn nas células endoteliais e nos odontoblastos em ambos os grupos. Portanto, o tratamento com abatacept retarda a neorformação óssea pós exodontia por meio de ativação da resposta CD3+FoxP3+ e inibição da osteoclastogênese via alteração do eixo RANK/RANKL/OPG e na polpa dentária o uso desse fármaco apresentou como efeitos a redução no número e área média dos vasos, além de redução da imunomarcção para eNOS, o aumento de caspase 3 e comprovada a imunoposição de FcRn em odontoblastos e em células endoteliais pulpares.

ABSTRACT

Abatacept is a recombinant protein that has been approved for the treatment of rheumatoid arthritis. This drug selectively modulates the costimulatory signal necessary to activate T lymphocytes, reducing the expression of pro-inflammatory cytokines. However, secondary effects such as increased bone deposition, delayed healing of oral ulcers, and reduced angiogenesis and endothelial adhesion have been observed, with the latter finding being possibly related to its recycling and elimination by FcRn-type receptors. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the influence of treatment with abatacept on bone remodeling after tooth extraction and vascular parameters of the dental pulp of Wistar rats. A total of 64 male Wistar rats were equally divided into a test group, which received subcutaneous (SC) administration of abatacept 8mg/kg/week, and a control group (SC), which received equivolumetric saline injections of 0.1ml/kg /week. The extraction of the lower left first molar was performed on the 15th day after abatacept/saline administration, with surgical difficulty being assessed during the procedure, followed by euthanasia on days 3, 7, 14, and 28 after surgery ($n=8$ /group/day of euthanasia). The mandibles of the rats were removed, and the left hemimandible was submitted to radiographic, histological, and immunohistochemical evaluation (TRAP, CD3+, FoxP3+, OPG, RANK, and RANKL). Data were analyzed by one-way ANOVA and two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test considering $p<0.05$ as significant (GraphPad Prism 5.0). The right hemimandibles of animals euthanized on day 28 were also assessed to evaluate the pulp of the mandibular first molar. The specimens were histologically processed (Hematoxylin-eosin), and photomicrographs at $400\times$ magnification of the dental pulps were captured for histomorphometric analysis. Total pulp area, total and individual blood vessel area, cellularity, and immunohistochemistry for e-NOS, caspase 3 and FcRn markers were evaluated. Student's t or Mann-Whitney tests were used ($p<0.05$, GraphPad

Prism 5.0). The evaluation of the left hemimandible showed no significant difference regarding surgical difficulty; however, radiographically, there was a delay in bone deposition in the abatacept group ($p= 0.012$), with histological changes reflected by a reduction in the number of polymorphonuclear (PMN) ($p= 0.028$) and mononuclear (MN) cells ($p= 0.004$) and delay in the involution of MN cells ($p = 0.003$). The number of osteoclasts ($p= 0.009$) and TRAP+ multinucleated cells ($p= 0.001$) reduced significantly, and, although treatment with abatacept did not interfere in the number of vessels, it was associated with increased immunoexpression of CD3+ ($p= 0.038$), FoxP3+ ($p= 0.002$), OPG ($p= 0.003$), and RANK ($p = 0.022$) as well as a reduction in the immunoexpression of RANKL ($p= 0.013$). Conversely, in the right hemimandible, the dental pulps of animals treated with abatacept showed an increase in the number of vessels ($p= 0.004$), with a smaller mean vessel area ($p = 0.002$) and an increase in pulp cellularity ($p= 0.003$), in addition to a reduction in the immunoexpression of e-NOS ($p= 0.007$) in odontoblasts and an increase of caspase 3 positivity ($p= 0.021$). Therefore, treatment with abatacept delays post-extraction bone formation through Treg responses and osteoclastogenesis inhibition because of a dysregulation in the RANK/RANKL/OPG axis. Furthermore, in the dental pulp, the use of this drug induced a reduction in the diameter of blood vessels with a consequent increase in the number of vessels and cellularity, apparently associated with a reduction in e-NOS and an increase in caspase 3 expression. The immunoexpression of Fc-Rn in odontoblasts and pulp endothelial cells was also observed.

SUMÁRIO

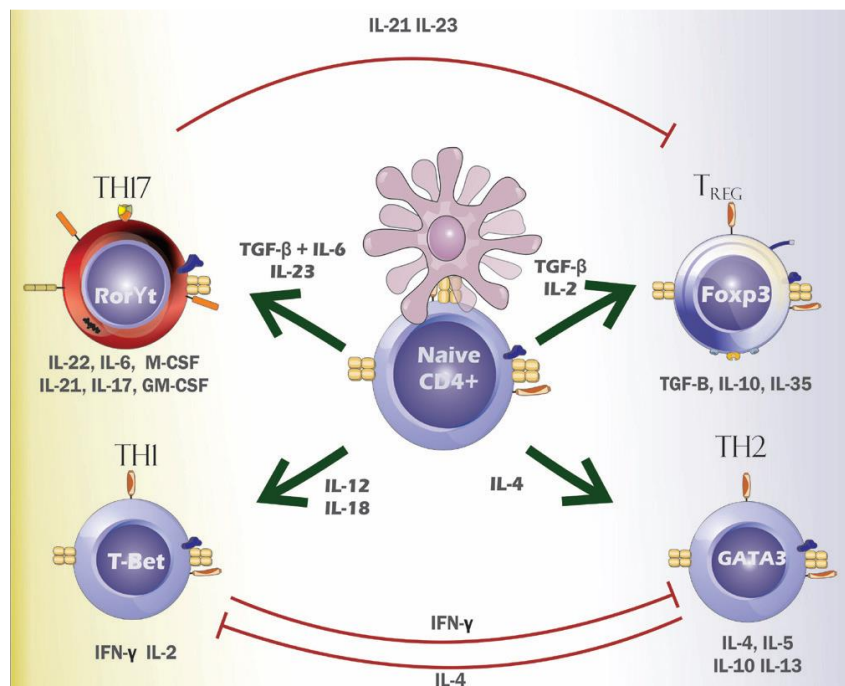
1. INTRODUÇÃO GERAL -----	13
1.1 Linfócito T -----	13
1.2 Ativação de linfócitos T e a importância do CTLA-4 -----	14
1.3 Abatacept -----	165
1.4 Remodelação óssea e saúde vascular da polpa dentária -----	18
2. JUSTIFICATIVA -----	222
3. HIPÓTESE -----	24
4. OBJETIVOS -----	25
4.1. Objetivo geral -----	25
4.2. Objetivos específicos -----	25
5. CAPÍTULOS -----	26
5.1 Capítulo 1 -----	27
5.1.1 Figuras capítulo 1-----	40
5.2 Capítulo 2 -----	41
5.2.1 figuras capítulo 2 -----	58
6. CONCLUSÃO GERAL -----	66
ANEXOS 1-----	69
ANEXO 2-----	70
ANEXO 3-----	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Linfócito T

Os linfócitos TCD4⁺ são as principais células da resposta imune adquirida, responsáveis pela produção de citocinas, com ativação mediada por apresentação de antígenos processados, que corresponde a um importante papel no sistema imunológico. Essas células coordenam a imunidade humoral, através da regulação da produção de anticorpos por linfócitos B, como também agem na imunidade celular, orquestrando a ação de linfócitos TCD8⁺ e macrófagos no combate a diversos tipos de patógenos. Sua grande variedade de ação ocorre devido a seu mecanismo de ativação, dependente de citocinas e fatores de transcrição específicos, podendo ser ativados em células efetoras como Linfócitos T helper (LTh) ou linfócitos T reguladores (LT reg) (FIGURA 1) (COSMI et al., 2014)

Figura 1- Imagem ilustrativa da diferenciação de LTCD4⁺ naive em Th 1, Th2, Th17 e Treg.



Fonte: Figura adaptada de SOUZA, 2010

A ativação de linfócitos em LTh é dependente das citocinas presentes no meio e pode ser do tipo Th1, Th2, Th17, Treg, entre outros inúmeros padrões. A diferenciação em Th1 gera elevados níveis de interferon gama (IFN- γ) e são responsáveis pela fagocitose e opsonização de microrganismos, sendo um importante mecanismo contra patógenos

intracelulares. A diferenciação em Th2, por sua vez, é importante no combate contra helmintos, e ocorre mediante a presença de grande quantidade de IL-4 no meio. A resposta Th17 apresenta papel relevante no combate de bactérias e fungos extracelulares e atua através do recrutamento de neutrófilos via IL-8. Outros tipos de linfócitos efetores como LTh22, LTh9 e LT folicular (LTfh) também podem ser diferenciados.

Os linfócitos Th1 e Th17 são descritos como relevantes no desenvolvimento de doenças autoimunes, sendo, portanto, alvos de diversas terapias para o tratamento dessas alterações (COSMI et al., 2014).

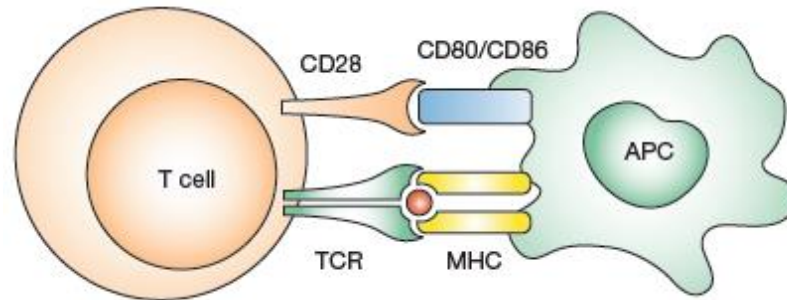
Os linfócitos T reguladores (LTreg), por sua vez, quando ativados, tem importante mecanismo de controle contra linfócitos autorreativos, agindo na prevenção das doenças autoimunes. Essas células apresentam o fator de transcrição Foxp3, além de citocinas como a IL2 e receptores de membrana como CD25, estruturas essenciais para seu desenvolvimento, função e sobrevivência, sendo Foxp3 e CD25 marcadores altamente específicos para Treg (SAKAGUCHI, 2006).

A ativação desses diferentes tipos de linfócitos T é dependente das citocinas presentes no meio, mas, antes disso, é necessário haver apresentação de antígenos peptídicos através de células apresentadoras de antígenos (ÖSTÖR, 2008).

1.2 Ativação de linfócitos T e a importância da proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T (CTLA-4).

A ativação de linfócitos T é dependente de uma dupla ligação com células apresentadoras de antígenos (APCs) (BLAIR and DEEKS, 2017). A ligação primária ocorre entre o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) com antígeno peptídico não próprio, presente nas APCs, e o receptor de células T (TCR), presente na superfície dos LTs. Ligações secundárias são realizadas através de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 e CD86), presente nas APCs, e CD28, presente nos LTs (FIGURA 2) (GEMMELL et al., 2001; LINSLEY, PETER S; BRADY, WILLIAM; URNES, M; GROSMAN, LAURA S; DAMLE, NITIN K; LEDBETTER, 1991; ÖSTÖR, 2008; PAWLAK et al., 2005).

Figura 2- Ilustração da ativação de LT CD4⁺ naive após ligação primária e secundária.

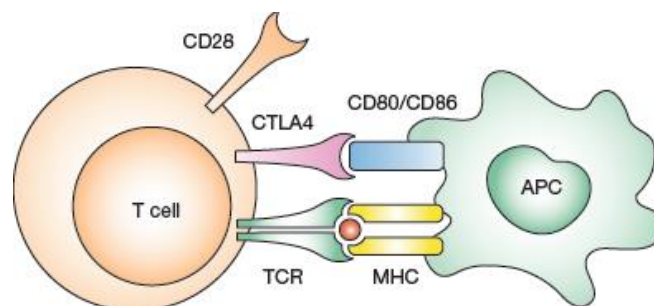


Fonte: RUDERMAN *and* POPE, 2006.

Após aproximadamente dois dias os linfócitos ativos passam a expressar em sua superfície a proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T (CTLA-4), que se liga com maior afinidade que CD28 ao B7, com função de regular negativamente os linfócitos T (BLAIR & DEEKS, 2017) (FIGURA 3).

Em linfócitos T reguladores, entretanto, essa proteína é expressa de forma constitutiva na superfície. Não se sabe ao certo o mecanismo de ação dessa proteína em LTreg, mas sabe-se que está associada a mecanismos de controle de ativação e LT efetores (SAKAGUCHI et al., 2006).

Figura 3- Imagem ilustrativa da ativação da ação da molécula de CTLA4 no controle negativo da ativação dos LTCD4⁺.



Fonte: RUDERMAN *and* POPE, 2006.

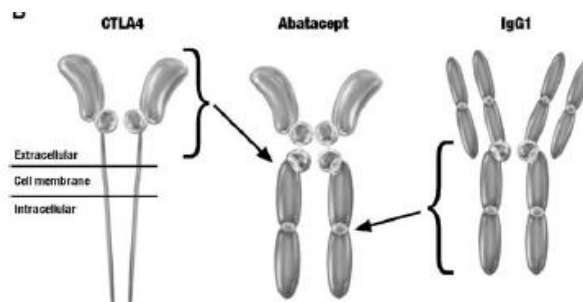
O desbalanço entre linfócitos T efetores e reguladores, portanto, está associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, sendo alvo de diversos tratamentos (SAKAGUCHI et al., 2006; BLAIR; DEEKS, 2017; COSMI et al., 2014), como a utilização do abatacept, que consiste em uma proteína recombinante com função de inibir a ativação de linfócitos T efetores (BLAIR & DEEKS, 2017).

1.3 Abatacept

O abatacept (ORENCIA®, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA) consiste em uma proteína de fusão recombinante capaz de modular seletivamente o sinal coestimulatório necessário para ativar linfócitos T (Blair & Deeks, 2017). O abatacept é um medicamento aprovado para tratamento de Artrite reumatoide, classificado como fármaco modificador da doença (DMARD) biológico, podendo ser administrado por via subcutânea (SC) semanalmente, com efeitos semelhantes à administração intravenosa (IV), que ocorre mensalmente (BLAIR ; DEEKS, 2017) e age inibindo a ativação de linfócitos T, células de grande importância para o combate a infecções, mas que também apresentam relevante papel no desenvolvimento de doenças autoimunes (COSMI et al., 2014).

Estruturalmente o abatacept é constituído através da fusão do domínio extra celular CTLA-4 com um fragmento constante (Fc) modificado da imunoglobulina G1 humana (IgG1), sendo portanto um fármaco que mimetiza, através da estrutura de um anticorpo, a função da proteína CTLA-4 (CTLA4-Ig) (FIGURA 4) (IWAHASHI ET AL., 2015; ÖSTÖR, 2008; ROMO-TENA et al., 2013).

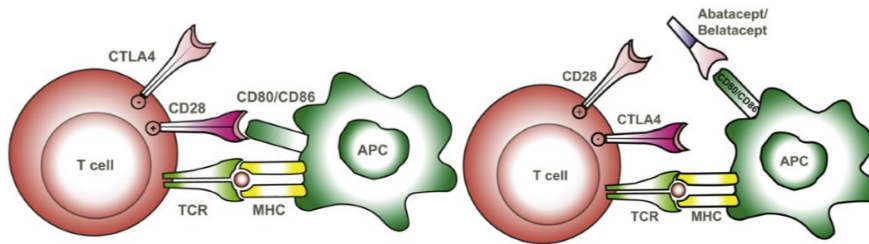
Figura 4- Imagem ilustrativa da forma molecular do abatacept.



Fonte: adaptada de ÖSTÖR, 2008

O abatacept, portanto, regula negativamente a ativação de linfócitos T através da ligação entre seu fragmento CTLA-4 e o receptor CD80/CD86 (FIGURA 5).

Figura 5- Ativação de LTCD4⁺ naive após ligação primária e secundária e ação do abatacept na inibição da ativação.



Fonte: VICENTI, 2008

Estudos anteriores descreveram que seu uso no tratamento da AR estava relacionado com a redução na concentração de diversas citocinas, como Fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, interferon- γ (INF γ), e a redução da expressão do fator reumatoide (KLIWINSKI et al., 2005; WEISMAN et al., 2006). A modulação negativa dessa resposta é importante no controle de doenças autoimunes, porém, pode interferir significativamente no reparo tecidual em outros processos inflamatórios.

Em estudo prévio, através da realização de modelo experimental de úlceras orais traumáticas em ratos, observamos redução significativa na área de úlcera em ratos tratados com abatacept (MESQUITA, et al 2020)

Nesse mesmo estudo o tratamento com abatacept reduziu a permeabilidade vascular por sete dias após a indução do processo traumático, levando a redução da contagem de mononucleares nesse período (MESQUITA et al., 2020). Esse último achado foi associado à redução da adesão endotelial observada em estudos prévios (BONELLI et al., 2013).

Aparentemente não são apenas os processos inflamatórios agudos que são afetados, pois, recentemente, durante acompanhamento de pacientes com AR tratados com abatacept, achados relevantes como o aumento da densidade femoral óssea, após o início da terapia, sugerem uma possível interação desse fármaco com o processo de remodelação óssea (TADA et al., 2018).

Essa interação apresenta como possível causa a união da molécula do fármaco CTLA-4Ig aos receptores CD80/86, presentes na superfície, não apenas de células apresentadoras de antígenos, mas também de células precursoras de osteoclastos, devido ambas possuírem a mesma linhagem precursora (MATSUURA et al., 2018). O mecanismo de ação exato permanece desconhecido, mas Matsuura et al. (2018) observaram redução da velocidade de células precursoras de osteoclastos em seu processo de diferenciação após tratamento com abatacept. Bozec et al., 2014, por sua vez, descreveram que a inibição de osteoclastos é devido

a indução da expressão da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) nas células precursoras de osteoclastos, causando a catabolização do triptofano e indução de apoptose celular, por vias ainda incertas (MICHALOWSKA et al., 2015).

Além de sua ação secundária no metabolismo ósseo, também foi observada ação desse fármaco nas proteínas de adesão do endotélio vascular, com consequente redução da angiogênese em processos inflamatórios (CUTOLO et al., 2015; MESQUITA et al., 2020). O abatacept portanto, além de participar no controle da AR, também parece interferir no processo de remodelação óssea e nos processos de angiogênese de forma que pode culminar em impacto no metabolismo ósseo dentário.

1.4 Remodelação óssea e saúde vascular da polpa dentária

O osso passa por diversos períodos de formação e remodelação durante toda a vida do indivíduo. Esses processos envolvem reabsorção de osso antigo, realizado por osteoclastos, e aposição de osso recém-formado, realizado por osteoblastos. Alterações nesse balanço entre reabsorção e aposição óssea podem levar a osteoporose, excesso de perda óssea, ou osteopetrose, excesso de aposição óssea (KATSIMBRI, 2017). A osteoporose é um achado comum, associado com alterações hormonais ou durante processos inflamatórios, como em pacientes com AR (BOZEC et al., 2014).

A remodelação óssea é crucial na prática odontológica, sendo indispensável na cicatrização de alvéolos pós exodontia, na movimentação ortodôntica, no reparo de lesões apicais após tratamento endodôntico e na osseointegração de implantes dentários. Esse processo é dividido didaticamente em três fases (HASSUMI et al., 2018).

A primeira é a fase inflamatória, responsável pela formação do coágulo sanguíneo e migração de células inflamatórias. Nessa fase ocorre formação de tecido de granulação, que é gradualmente substituído por matriz de tecido conjuntivo, rica em fibras colágenas. Durante esse processo é iniciada a segunda fase, chamada de fase proliferativa, responsável pela formação de fibras colágenas maduras e cicatrização. A terceira e última fase apresenta finalização do processo de formação óssea e alterações na arquitetura. O processo, após exodontia de incisivos de ratos, finaliza em 28 dias, correspondendo em humanos a 64 dias (DE ARAUJO et al., 2015; HASSUMI et al., 2018).

O processo de remodelação óssea gerado pela cicatrização dos alveolos é dependente da organização do eixo Receptor Ativador Nuclear Kappa B (RANK)/ Ligante do Receptor Ativador Nuclear Kappa B (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) (DE ARAUJO et al.,

2015; HASSUMI et al., 2018). A ativação do eixo RANK/RANKL apresenta expressiva ação na ativação de osteoclastos, enquanto a ativação do eixo RANK/OPG inibe sua ativação. Osteoclastos são células multinucleadas derivadas de monócitos e macrófagos, com regulação dependentes da ação de citocinas como M-CSF e RANK-L, e ação relacionada com produção de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Durante a fase inflamatória ocorre destruição óssea devido a quantidade de citocinas pró-inflamatórias liberadas, com interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- alfa), que induzem, através da diferenciação de células mesenquimais em RANKL, a diferenciação dessas células. A resposta Th17 promove a diferenciação de osteoclastos, enquanto a resposta Treg a regula, devido a expressão de CTLA-4 (MATSUURA et al., 2018).

Posteriormente, observa-se aumento da expressão de OPG, que apresenta importante ação de ativação de osteoblastos, sendo observada maior maturação e organização óssea (HASSUMI et al., 2018), associada à produção de colágeno tipo I, e formação de cristais de hidroxiapatita (fosfato de cálcio cristalino). A regulação dessa última via é feita principalmente pela proteína morfogenética óssea (BMP) e pelas vias de sinalização Wnt, através da ativação da β catenina (KATSIMBRI, 2017).

Já a polpa dentária é uma estrutura altamente vascularizada em que alterações vasculares estão relacionadas com o impacto na resposta do dente a traumas (KHORASANI et al., 2020). Devido a suas características e ao seu metabolismo próprio, a polpa dentária possui uma boa capacidade de reparo e frente a agentes agressores, fenômenos vâsculo exsudativos que caracterizam a inflamação podem ser francamente observados (LEONARDI et al., 2011).

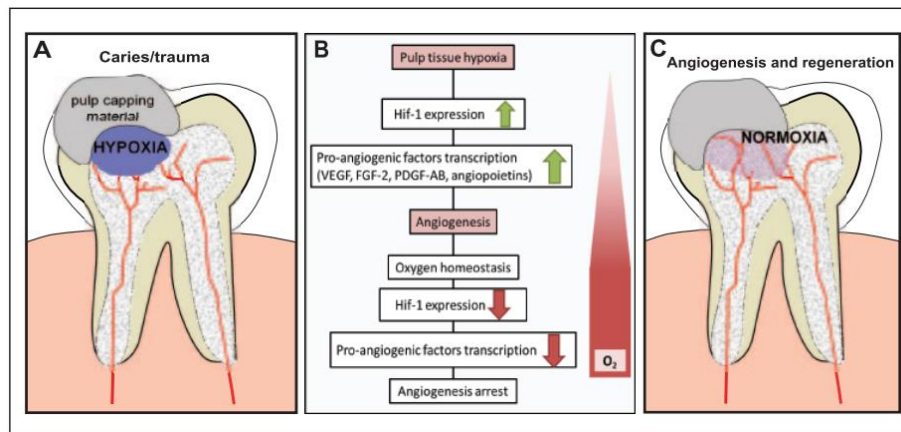
Essa estrutura apresenta alta capacidade defensiva quando exposta a agentes agressores, por ser capaz de produzir uma reação imuno inflamatória, que pode ser desencadeada por agentes agressores químicos, biológicos ou físicos (LEONARDI et al., 2011). A defesa pulpar pode ocorrer de duas diferentes formas, através de reações degenerativas e de reações inflamatórias, dependendo do tipo de agente irritante, da frequência e da intensidade desta agressão (LEONARDI et al., 2011).

Resposta inflamatórias leves são capazes de formar a dentina reacional, a esclerose dentinária, o envelhecimento pulpar e a formação de áreas de hialinização (LEONARDI et al., 2011). Reações inflamatórias mais intensas geram quadros de inflamação aguda ou crônica, denominadas de pulpíte, que podem variar de reversível à irreversível, chegando ao estágio de necrose pulpar, quando se perde a vitalidade deste tecido (KHORASANI et al., 2020; LEONARDI et al., 2011). Essa vitalidade pode ser comprometida pelo seu único

suprimento vascular, o feixe vasculonervoso apical. O forame apical é a única forma de acesso ao sistema vascular e comprometimento desse feixe também pode gerar processos hipóxicos e isquêmicos nessa região (ROMBOUTS et al., 2017).

Os fatores associados a vascularização e a angiogênese da polpa dental não são bem elucidados, mas sugere-se que tenha relação com a hipóxia causada por injúria pulpar, podendo ser causada por estímulos químicos, térmicos, traumáticos ou biológicos. Estímulos biológicos, infecções bacterianas, são as principais causas e a realização de seu tratamento consiste em um fator causador de hipóxia. Esse quadro estimula processos angiogênicos, devido a maior liberação de fator induzido por hipóxia -1 (Hif-1) e de fator de crescimento vascular (VEGF), por exemplo (FIGURA 6) (ROUMBOUTS et al, 2016).

Figura 6- Imagem ilustrativa da angiogênese pulpar causada por hipóxia.



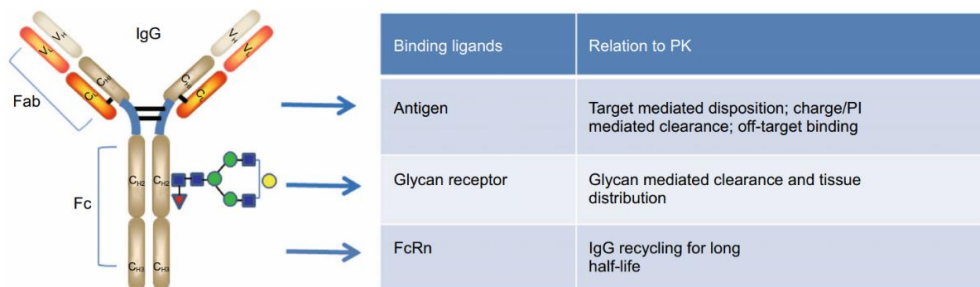
Fonte: Roumbouts et al, 2016

Esse mecanismo de angiogênese também é observado quando o dente está sob grave lesão cáries, o que leva a um colapso local dos vasos sanguíneos e uma situação de hipóxia. Nessas situações extremas o aumento da secreção de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) por células, como fibroblastos lesados, também é observado (ROUMBOUTS et al., 2016). Medicamentos com ação irritativa aos tecidos pulpares podem contribuir na quantidade de processo inflamatório e interferir na proliferação vascular.

A metabolização do abatacept, assim como de outras proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais tem sido crescentemente estudada, e observa-se estreita relação com o PH do meio. O processo de metabolização e reciclagem dos anticorpos monoclonais se dá da mesma forma que dos anticorpos IgG. A porção do final do fragmento constante do anticorpo liga-se a um receptor conhecido como receptor Fc do neonato (FcRn), que está associado a reciclagem do anticorpo IgG ou dos imunotratamentos, mAbs e proteínas recombinantes, com

consequente aumento da meia vida do fármaco, caso essa ligação não ocorra, esse anticorpo será catabolizado nessa região por lisossomos (LIU, 2017; ROOPENIAN & AKILESH, 2007) (FIGURA 7).

Figura 7 - Imagem ilustrativa da constituição de um anticorpo ou mAb, com suas ligações e relações com o PK .



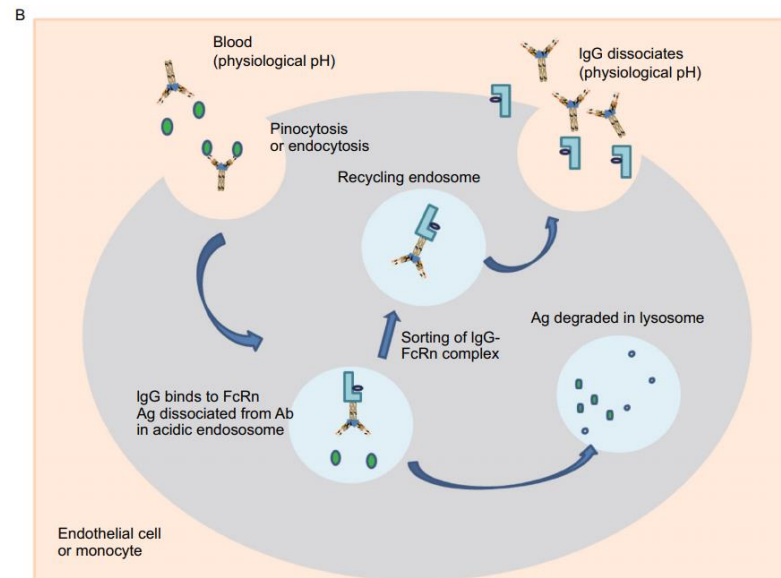
Fonte: Liu, 2017

O FcRn consiste em um receptor associado com a transferência de anticorpos IgG maternos para o feto. Esse receptor passa para o feto através da placenta e do intestino, em humanos, (ROOPENIAN, 2007) sendo encontrado, posteriormente em larga escala, em células endoteliais e monócitos, no sangue (ROOPENIAN, 2007).

As terapias imunogênicas, como o abatacept, são administradas por via intravenosa principalmente, mas, devido à necessidade de tratamentos crônicos, medicações com via de administração subcutânea ou intramuscular vem sendo desenvolvidas, nesses últimos casos a absorção ocorre por via linfática sendo drenada lentamente para o sistema vascular (LIU, 2017; RICHTER & JACOBSEN, 2014).

Em todas as formas de administração, o fármaco circulará pela corrente sanguínea, onde poderá ser absorvido por monócitos ou células endoteliais, por pinocitose ou endocitose, onde essas moléculas de anticorpos naturais ou de mAbs podem, quando em $\text{pH} < 6,5$ se unir ao FcRn e serem reciclados, voltando a circulação sanguínea. Entretanto, em casos de pH entre 7-7,4, ou em caso de saturação dos receptores essa união não ocorre e o anticorpo é encaminhado para lisossomos para a degradação, como demonstrado na figura 9. As alterações de pH estão relacionadas com a estrutura dos anticorpos ou dos fármacos, o que contribuiu com o desenvolvimento de fármacos com maior meia vida (FIGURA 8) (LIU, 2017; ROOPENIAN, 2007). A metabolização vascular pode justificar os achados de lesões semelhantes a vasculites presentes em pacientes sob utilização de alguns mAbs (HOLT et al. 2018).

Figura 8. Imagem ilustrativa da interação de mAbs com FcRn levando a sua reciclagem ou a sua degradação em lisossomos.



Fonte: LIU, 2017

O mecanismo de ação do abatacept é um tema extensamente discutido nos trabalhos científicos, entretanto, devido sua característica de utilização crônica, se faz pertinente avaliar ossos e região pulpar de animais submetidos a esse tratamento crônico, afim de levantar possíveis interferências nesses metabolismos, visto que uma possível ação em osso e em região vascular foi relatada em trabalhos anteriores.

2. JUSTIFICATIVA

O abatacept, proteína recombinante, apresenta-se como uma proteína quimérica composta por um fragmento CLTA-4 fundido ao fragmento constante da IgG, com importante ação na redução da síntese de citocinas que desregulam a atividade imunológica, controlando não apenas a AR, mas quaisquer doenças autoimunes nas quais os LTh façam parte da patogênese.

É conhecido o efeito do abatacept na inibição da perda óssea de pacientes portadores de AR, na sua interferência na ação de osteoclastos, assim também como foi descrito possível relação desse fármaco com a formação de vasos sanguíneos e a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, contudo os impactos do uso desse fármaco na polpa e na cicatrização de alvéolos não foram avaliados até então.

Na prática odontológica a inflamação e a angiogênese são indispensáveis e fazem parte de praticamente todos os processos envolvendo a arcada óssea dentária. Portanto, devido ao tratamento com abatacept aumentar a densidade mineral óssea em pacientes com AR, é pertinente avaliar se há também impacto nos processos de reabsorção e deposição óssea e inibir

a permeabilidade vascular e angiogênese e que o uso desse medicamento em doenças autoimunes só tende a aumentar, se faz necessário conhecer a ação do uso do abatacept na cicatrização de alvéolos pós exodontias e na polpa dental.

3. HIPÓTESE

- Hipótese nula:

O tratamento com abatacept não interfere no reparo ósseo pós exodontia ou em características pulpares de ratos Wistar.

- Hipótese alternativa :

O tratamento com abatacept interfere no reparo óssea pós exodontia ou em características pulpares de ratos Wistar.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do tratamento com abatacept no reparo óssea pós exodontia e em respostas vasculares da polpa dentária de ratos Wistar tratados com abatacept.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a influência da utilização de abatacept em aspectos imaginológicos, histomorfométricos e imuno-histoquímicos na remodelação óssea pós exodontia de ratos submetidos à extração do primeiro molar inferior esquerdo
- Avaliar os aspectos histomorfométricos e imuno-histoquímicos da polpa dentária dos primeiros molares direitos de Ratos Wistar tratados com abatacept.

5. CAPÍTULOS

REGIMENTO INTERNO

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para teses de doutorado, permitindo a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. O projeto de pesquisa referente ao trabalho desenvolvido foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Unichristus, tendo sido aprovado (ANEXO 1) e conduzido de acordo com o princípio dos três R's. Desse modo, a presente tese de doutorado é composta pelos seguintes capítulos:

Capítulo 1: Abatacept retarda remodelação óssea pós exodontia em ratos.

- Este trabalho será submetido à publicação na revista “Archiver of Oral Biology” (ISSN 0003-9969; Qualis CAPES A2; fator de impacto 1,931) (ANEXO 2).

Capítulo 2: Avaliação da polpa de ratos Wistar submetidos a tratamento com abatacept: um estudo histomorfométrico e de imunohistoquímica.

- Este trabalho será submetido à publicação na revista “International Endodontic Journal” (ISSN 1365-2591; Qualis CAPES A1; fator de impacto 5.264) (ANEXO 3).

5.1 Capítulo 1: Abatacept retarda remodelação óssea pós exodontia em ratos.

Karine Cestaro Mesquita^{1,2}, Thinali Sousa Dantas^{1,2}, Paulo Goberlânio de Barros Silva^{1,2}, José Vitor Mota Lemos^{1,2}, Caio Ferreira Freire Caetano², Antonio Alexandre Coelho², Ana Paula Negreiros Nunes Alves¹, Mário Rogério Lima Mota¹, Fabrício Bitu Sousa^{1,2}

¹Laboratório de Patologia Bucal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Departamento de Odontologia, Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

Autor de Correspondência:

Autor de Correspondência:

Paulo Goberlânio de Barros Silva

Curso de Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Rua João

Adolfo Gurgel, número 133, 60190-060, Fortaleza, Ceará, Brasil; Telefone 1 /

Fax: +55 85 32658100. E-mail: paulo_goberlanio@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do abatacept na remodelação óssea pós exodontia em ratos Wistar.

Metodologia: Os animais receberam administração subcutânea (SC) no grupo teste de abatacept 8mg/kg/semana, e no grupo controle solução salina equivolumétrica de 0,1ml/kg/semana, fracionada em três administrações semanais. A exodontia do primeiro molar inferior esquerdo foi realizada no décimo quinto dia pós administração, quando foi avaliada dificuldade cirúrgica, seguida de eutanásias nos dias 3, 7, 14 e 28 subsequentes (n=8/grupo/dia de eutanásia) dose previamente determinada por nossa equipe. As mandíbulas dos animais foram removidas, para realização das análises radiográfica, histológica (contagem de células inflamatórias polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) e vasos) e imunohistoquímica (FOXP3, CD3, TRAP, RANK, RANKL e OPG). Os dados foram analisados por meio do teste de ANOVA-1-way e ANOVA-2-way/Bonferroni considerando $p < 0.05$ (GraphPad Pris 5.0).

Resultados: Não houve diferença na dificuldade cirúrgica entre os grupos. Radiograficamente houve atraso na deposição de osso no grupo abatacept ($p=0.012$) e redução do número de PMN ($p=0.028$) e MN ($p=0.004$) com menor intensidade de MN ($p=0.003$). O número de osteoclastos

($p=0.009$) e células multinucleadas TRAP+ ($p=0.001$) reduziu e, apesar do tratamento com abatacept não interferir na quantidade de vasos, esteve associado a aumento na imun expressão para CD3+ ($p=0.038$), FoxP3+ ($p=0.002$), OPG ($p=0.003$) e RANK ($p=0.022$) e redução na imun expressão para RANKL ($p=0.013$).

Conclusão: O tratamento com abatacept retardou a neorformação óssea pós exodontia por meio da aparente ativação da resposta de células CD3+FOXp3+ e inibição da osteoclastogênese via alteração do eixo RANK/RANKL/OPG.

Descritores (DeCS): abatacept; bone remodeling; CTLA4-Ig; Tooth Socket

INTRODUÇÃO

O abatacept (ORENCIA®, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA) é uma proteína de fusão recombinante, constituída através da fusão do domínio extracelular do Antígeno-4 associado ao LT Citotóxico (CTLA-4) com um fragmento constante (Fc) modificado da imunoglobulina G1 humana (IgG1). Trata-se de um fármaco modificador da doença utilizado para o tratamento de pacientes com artrite reumatoide (AR), que apresentam resposta inadequada aos antagonistas do TNF- α , com ação de modulador de coestimulação seletiva de linfócitos T (Iwahashi et al., 2015; Östör, 2008; Romo-Tena et al., 2013).

O mecanismo de ação desse fármaco deve-se a função da molécula CTLA-4. Essa molécula é homóloga ao CD28 se ligando nesse receptor nos linfócitos T e modulando negativamente a ativação dos LTCD4⁺. Com isso, há redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela progressão da AR (Romo-Tena et al., 2013).

O abatacept parece interferir no metabolismo de osteoclastos, provavelmente por um mecanismo que envolve a semelhança na histogênese das células macrofágicas e na linhagem das células precursoras de osteoclastos. Como ambas as linhagens possuem em sua superfície o receptor CD80/86, essa célula se torna alvo da medicação (Matsuura et al., 2018). Isso explica parcialmente porque pacientes com AR em uso de abatacept demonstram aumento da densidade mineral femoral óssea (Tada et al., 2018).

O mecanismo de ação exato da interação do abatacept com o metabolismo ósseo permanece desconhecido, estudos, entretanto, sugerem que o abatacept impede a maturação de osteoclastos (Matsuura et al., 2018) ou induz sua apoptose (Bozec et al., 2014).

Apesar de ser um medicamento direcionado a LTCD4, aparentemente, ele parece interferir no metabolismo ósseo geral tanto por seu papel na supressão de linfócitos T, com aumento nos linfócitos T reguladores (LTreg) (Kliwinski et al., 2005), quanto por sua aparente ação secundária nos osteoclastos (Bozec et al., 2014; Matsuura et al., 2018). Uma vez que a reabsorção é um elemento chave no processo de remodelação óssea e que esse eixo parece estar alterado durante o tratamento com abatacept (De Araujo et al., 2015; Hassumi et al., 2018) é objetivo desse estudo avaliar a ação do abatacept no processo de remodelação óssea pós exodontia em animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

Esse trabalho foi desenvolvido pelo Laboratório de Patologia Bucodental do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), em que foi realizada a parte laboratorial, em colaboração com o Laboratório de Patologia do Centro Universitário Christus (Unichristus), onde foi realizada a experimentação animal. Previamente ao início dos protocolos experimentais e coleta dos dados, o estudo foi submetido à Comissão Ética no Uso de Animais da Unichristus, sob protocolo de aceitação CEUA 028/19 (ANEXO 1).

Cálculo amostral

Tendo em vista que o Abatacept é um fármaco que impacta na síntese de diversas citocinas associadas com influxo de neutrófilos, que demonstrou o efeito do tratamento com abatacept na redução da expressão de IL-1 α de 50 \pm 3 (média \pm erro padrão da média, n=8) para 31 \pm 4 (média \pm erro padrão da média, n=8) (Kliwinski et al., 2005), estimou-se necessário avaliar oito ratos por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente 90% de poder e 95% de confiança a hipótese nula deste trabalho (teste t) sendo necessária utilização de 64 animais.

Animais, Grupos e Doses

Ratos machos da linhagem Wistar (*rattus norvegicus*), com peso médio de 180 gramas, foram abrigados a 24° C em ciclo luz-escuro de 12 horas e com acesso irrestrito a água e a alimento no biotério de experimentação do centro Universitário Christus, seguindo os princípios dos três R's, redução, substituição (replacement) e refinamento (MacArthur Clark, 2018), segundo Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA, normativa número 30 publicada em 02 de fevereiro de 2016.

Os animais receberam administração por via subcutânea (SC) de abatacept na dose de 8mg/kg/semana, dose estabelecida por nossa equipe em trabalho anterior, ou de solução salina estéril a 0,9%, fracionadas em três administrações semanais, iniciando 15 dias antes do procedimento cirúrgico (Mesquita et al., 2020). A realização da exodontia do primeiro molar inferior direito foi realizada após 15 dias do início do protocolo com dose de xilazina e quetamina e o tratamento foi mantido até os dias de eutanásia após 3, 7, 14 e 28 dias da

exodontia, por sobredose de xilazina (25 mg/kg) e quetamina (75 mg/kg).

Procedimento cirúrgico

As exodontias foram realizadas 24 horas após a sétima administração SC de abatacept ou solução salina (Mesquita et al., 2020).

Nos respectivos dias de exodontia, a ordem de realização do procedimento cirúrgico dos animais foi estipulada através de randomização, pelo comando aleatorização do software Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation®, no intuito de dissipar o erro da força do operador.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com quetamina 75 mg/kg e xilazina 25 mg/kg, por via intraperitoneal (IP). O procedimento cirúrgico contou com as fases de sindesmotomia do 1º molar inferior esquerdo com auxílio de sonda exploradora, luxação e extração com uso de espátula Hollembach 3S. A avaliação da dificuldade cirúrgica foi feita pela cronometragem do tempo de procedimento, assim como a anotação de possíveis fraturas radiculares, a pesagem, em balança de 10-5g de precisão, dos dentes após serem extraídos e dos animais diariamente dos animais para realização de variação ponderal (Silva et al., 2015).

Análise Radiográfica

Após eutanásia dos animais, suas hemimandíbulas foram removidas e armazenadas em formol neutro 10%. A técnica radiográfica utilizada foi padronizada com distância foco-filme de 10 cm, seguindo a técnica do paralelismo (cone longo) com tempo de exposição de 0,18 segundos em aparelho de raioX digital (Kavo®; 63Kvp, 8mA) acoplado a dispositivo receptor digital do tipo placa de fósforo com sistema de captura digital de imagem Instrumentarium®. O equipamento foi fixado na função para radiografia digital periapical de bateria dentária anterior superior (13-23) e as imagens obtidas foram salvas em formato JPEG e exportadas para o software de análise de imagem ImageJ®. A análise das imagens foi randomizada e realizada em triplicata, por um operador que desconhecia os grupos experimentais, através do comando de seleção de área livre (Freehand selections), considerando, ao final, a média aritmética das três mensurações (Silva et al., 2015).

Processamento e análise histológicas das hemimandíbulas

Após realização da análise radiográfica, as hemimandíbulas seguiram para descalcificação em solução 10% EDTA (pH 7.3; NaOH, PA), durante 30 dias. Foi realizado processamento automatizado e o material foi então incluído em parafina, cortado em espessura de 3 µm no sentido coronal, e corado pela Hematoxilina-eosina em lâminas montadas com bálsamo do Canadá para posterior realização de análises em microscopia de luz convencional.

Contagem do número de células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e osteoclastos

Dez diferentes campos microscópicos foram fotografados no aumento de 400x no sítio referente à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Com o auxílio do software ImageJ® as células polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares e de osteoclastos as contagens foram realizadas (Ferreira-Junior et al., 2020).

Confeção de blocos de TMA (tissue microarray - arranjo em matriz de amostras teciduais).

A realização da avaliação imuno-histoquímica foi feita após a confecção de blocos de TMA. A técnica foi realizada nos blocos de todos os grupos pesquisados através de dispositivo chamado “*tissue microarrayer*” (Quick-Ray UNITMA®). As lâminas previamente coradas foram avaliadas, os campos selecionados, sendo realizado então um pareamento da lâmina com o bloco parafinado contendo a amostra. Em seguida, um fragmentos de 2 mm de diâmetro foi puncionado e a amostra transferida de maneira ordenada para um bloco receptor, o qual apresentou um padrão de matriz precisamente espaçada

O bloco receptor, após montado, foi colocado em estufa a 60°C durante 10 min, com lâmina previamente aquecida sobre o bloco de TMA, para uniformizar a parafina da superfície do bloco.

Foram confeccionados dois blocos TMA. Cada bloco composto por até 36 fragmentos de tecidos, sempre que possível em duplicata. Os blocos foram confeccionados sendo o primeiro espaço preenchido por amostra de controle negativo, o segundo espaço vazio e os demais contando com as amostras da mandíbula (Mesquita et al., 2020).

Processamento e análise imuno-histoquímica (FOXP3, CD3, TRAP, RANK, RANKL, OPG)

Para a análise imunohistoquímica, cortes de 3µm de espessura dos blocos de TMA

previamente confeccionados foram realizados, dispostos sobre lâminas silanizadas, submetidos a desparafinização, reidratação e recuperação antigênica com tris-EDTA pH 9,0 (FOXP3) ou citrato pH6,0 (demais marcadores) em banho maria a 95°C por 45 minutos. Após resfriamento, foi realizada lavagem com solução tampão de fosfato (PBS, dois banhos de cinco minutos) seguida de bloqueio de peroxidase endógena com H₂O₂ 3% por 30 minutos.

As lâminas foram então incubadas *overnight* com anticorpos primários direcionados para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP - Abcam®, 1:100, clone ab212723), receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante (RANKL - Abcam®, 1:200, clone ab45039), osteoprotegerina (Abcam®, 1:200, clone ab73400), receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK - Abcam®, 1:100, clone ab13918), FOXP3OXp3 Abcam®, 1:100, clone ab22510) e CD3 (Abcam®, 1:200, clone ab569010).

Após duas lavagens com PBS e incubação com anticorpo secundário Envision HRP (K4063 Dako®) por 30 minutos foram realizadas duas novas lavagens e revelação com 3,3'-diamino-benzidina (DAB, K0673 Dako®) por cinco minutos seguida de desidratação, diafanização, e montagem das lâminas com Enthellam®. Para controles positivos foram usadas secções histológicas de medula óssea, RANKL, baço, FOXp3 e CD3, pele, RANK, intestino, TRAP, e rim, OPG, e para controles negativos foram suprimidos as fases envolvendo incubação com anticorpos primários.

Para realização das análises, dez diferentes campos foram fotografados em aumento de 400x no sítio de exodontia para contagem de células com positividade membranar para CD3 e RANK, nuclear para FOXp3 e citoplasmática para os demais marcadores supracitados (unidade amostral = soma dos 10 campos) (Silva et al. 2016).

Análise estatística

Foram calculadas as médias e erro-padrão dos parâmetros clínicos e histológicos, que foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e comparados por meio do teste ANOVA-2-way seguido do pós-teste de Bonferroni (dados paramétricos). Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0 adotando uma confiança de 95%.

RESULTADOS

Tratamento com abatacept não impacta na dificuldade para exodontia mas reduz o ganho de

massa corpórea pós-cirúrgica

Não houve diferença significativa na massa dos dentes removidos no grupo tratado com salina (21.21 ± 0.38 mg) ou abatacept (21.48 ± 0.46 mg) ($p=0.678$). O número médio de fraturas radiculares também não diferiu entre os dois grupos (0.032 ± 0.030 vs. 0.031 ± 0.030 , $p=1.000$) ou o tempo para remoção dos dentes ($54.62 \pm 5,77$ vs $60.38 \pm 7,88$ seg, $p=0.976$).

Por outro lado, os animais tratados com abatacept demonstraram menor ganho de massa corporal ao longo do experimento. Apesar de não haver diferença no ganho médio de massa entre os grupos salina e abatacept após três ($+4,14 \pm 1,58$ vs. $+4,53 \pm 1,15$ g, $p=0.844$), sete ($+13,53 \pm 2,30$ vs. $+11,04 \pm 2,88$ g, $p=0.510$) e 14 ($+13,42 \pm 1,73$ vs. $+13,38 \pm 4,03$, $p=0.993$) dias da exodontia, no 28º dia pós exodontia os animais tratados com solução salina ($+42,09 \pm 5,04$ g) apresentaram maior ganho de massa que os animais tratados com abatacept ($+24,49 \pm 3,60$ g) ($p=0.013$). Tanto no grupo salina ($p<0.001$) como nos animais tratados com abatacept ($p=0.001$) o ganho de massa ocorreu significativamente a partir do 28º dia pós-exodontia.

Tratamento com abatacept retarda deposição de osso pós exodontia

Não houve diferença significativa na média de área radiolúcida nos grupos salina e abatacept após três ($p=0.266$) e sete ($p=0.367$) dias da exodontia. Porém, após 14 (1103 ± 131 vs. 2383 ± 472 μm^2 , $p=0.012$) e 28 (0 ± 0 vs. 621 ± 278 μm^2 , $p=0.045$) os animais tratados com salina apresentaram área de radiolucidez significativamente inferior aos animais tratados com abatacept, respectivamente. Tanto no grupo salina ($p<0.001$) como no grupo abatacept a redução da área radiolúcida ocorreu no 14º e 28º dias pós exodontia (Figura 9).

Abatacept impacta na migração celular pós exodontia

Após três dias da exodontia o número de PMN foi significativamente inferior no grupo tratado com abatacept (79.17 ± 21.88) comparado ao grupo salina (139.70 ± 8.57) ($p=0.028$). Não houve diferença nos dias sete ($p=0.768$), 14 ($p=0.682$) e 28 ($p=0.135$) pós exodontia. Nos animais do grupo salina houve redução do número de PMN a partir do sétimo dia pós exodontia ($p<0.001$) e no grupo abatacept apenas a partir do dia 14 ($p<0.001$) (Figura 12).

O número de células mononucleares foi significativamente inferior no sítio pós

exodontia do grupo abatacept em comparação ao grupo salina nos dias três (32.86 ± 2.14 vs. 55.50 ± 6.43 , $p=0.004$), sete (34.25 ± 5.06 vs. 53.50 ± 3.32 , $p=0.007$), e 14 (23.38 ± 2.36 vs. 33.29 ± 2.38 , $p=0.014$) pós exodontia. Após 28 dias, o número de mononucleares foi superior no grupo abatacept (21.00 ± 1.66 vs. 10.50 ± 1.50 , $p=0.003$). O número de células mononucleares reduziu significativamente no grupo salina a partir do 14º dia pós-exodontia ($p < 0.001$) e apenas a partir do 28º dia no grupo abatacept ($p=0.009$) (Figura 10).

O número de osteoclastos foi significativamente inferior nos animais tratados com abatacept em comparação aos animais tratados com solução salina nos dias três (5.37 ± 0.86 vs. 13.40 ± 2.94 , $p=0.009$) e sete (2.400 ± 0.62 vs. 8.50 ± 2.65 , $p=0.024$) pós exodontia. Após 14 ($p=0.417$) e 28 dias ($p=0.645$) não houve diferença significativa entre os grupos. A redução do número de osteoclastos nos grupos salina ($p=0.001$) e abatacept ($p < 0.001$) ocorreram respectivamente após 14 e 7 dias da exodontia (Figura 10). O número de vasos sanguíneos observados nos alvéolos pós exodontia não diferiu ou variou significativamente nos dois grupos experimentais.

O número de células CD3+ no sítio pós exodontia foi significativamente superior no grupo tratado com abatacept comparado ao grupo tratado com solução salina nos dias três (11.96 ± 2.98 vs. 4.57 ± 1.09 , $p=0.038$) e sete (8.78 ± 1.67 vs. 2.91 ± 0.93 , $p=0.012$) pós exodontia. Não houve diferença na contagem de células CD3+ nos dias 14 ($p=0.265$) e 28 ($p=0.927$). O número de células CD3+ aumentou significativamente no grupo tratado com salina no dia 14, retornando aos valores inicialmente encontrados no 28º dia pós exodontia ($p=0.009$) e no grupo tratado com abatacept houve redução ao longo dos dias de experimento, com significância no dia 28 ($p=0.046$) (Figura 11).

O número de células FoxP3+ no sítio pós exodontia foi significativamente superior no grupo tratado com abatacept (19.18 ± 2.10) que no grupo tratado com salina (6.05 ± 1.66) ($p=0.002$) no terceiro dia pós exodontia. Não houve diferença significativa no sétimo ($p=0.576$), 14º ($p=0.618$) e 28º ($p=0.683$) dias pós exodontia. No grupo salina o número de células FoxP3+ no sítio pós exodontia aumentou significativamente no sétimo e 14º dias pós exodontia ($p=0.002$) e nos animais tratados com abatacept os valores permaneceram igualmente elevados ao longo do curso temporal ($p=0.151$) (Figura 11).

O número de células multinucleadas TRAP+ foi significativamente inferior nos animais tratados com abatacept em comparação aos animais tratados com solução salina nos dias três (5.38 ± 1.32 vs. 14.00 ± 0.84 , $p=0.001$) e sete (5.33 ± 2.29 vs. 13.50 ± 2.06 , $p=0.038$) pós exodontia. Após 14 ($p=0.930$) e 28 dias ($p=0.883$) não houve diferença significativa entre os grupos. A redução do número de células multinucleadas TRAP+ no grupo salina ($p=0.001$)

ocorreu respectivamente após 14 dias da exodontia, mas no grupo abatacept os números permaneceram baixos ao longo do todo o curso temporal ($p=0.489$) (Figura 11).

Abatacept interfere no eixo RANK/RANKL/OPG pós exodontia

O número de células RANKL⁺ não diferiu nos grupos salina e abatacept no terceiro ($p=0.408$) e sétimo ($p=0.905$) dias pós exodontia, mas nos 14^o (149.10 ± 26.05 vs. 237.00 ± 15.26 , $p=0.013$) e 28^o (116.30 ± 16.88 vs. 190.20 ± 17.88 , $p=0.012$) dias pós exodontia, o número de células RANKL⁺ foi menor no grupo tratado com abatacept. No grupo salina houve redução da imunexpressão para RANKL a partir do sétimo dia pós exodontia ($p=0.001$) e no grupo abatacept a partir do 14^o dia ($p=0.001$) (Figura 12).

O número de células OPG⁺ não diferiu nos grupos salina e abatacept no terceiro ($p=0.087$), sétimo ($p=0.586$) e 28^o ($p=0.548$) dias pós exodontia, mas no 14^o dia pós exodontia, os animais tratados com abatacept (439.00 ± 43.43) apresentaram maior número de células OPG⁺ que os animais tratados com salina (262.00 ± 17.31) ($p=0.003$). No grupo salina ($p=0.798$) e abatacept ($p=0.128$) a variação da imunexpressão para OPG não foi significativa ao longo do curso temporal (Figura 12).

No terceiro dia pós exodontia o número de células RANK⁺ foi significativamente superior no grupo abatacept (20.27 ± 3.48) comparado ao salina (11.31 ± 0.98) ($p=0.022$). Nos demais dias, não houve diferença significativa na imunexpressão desse marcador. Tanto no grupo salina ($p=0.002$) como no grupo abatacept ($p<0.001$) houve redução na imunexpressão para RANK a partir do 14^o dia pós exodontia (Figura 12).

A relação RANKL/OPG, por sua vez, foi significativamente inferior no grupo abatacept comparado ao salina nos dias três (0.87 ± 0.15 vs. 1.54 ± 0.22 , $p=0.022$), e 14 (0.41 ± 0.09 vs. 0.92 ± 0.06 , $p=0.001$) pós exodontia, não diferindo significativamente nos dias sete ($p=0.939$) e 28 ($p=0.224$). A relação RANKL/OPG reduziu significativamente tanto no grupo salina ($p=0.006$) como no grupo abatacept ($p<0.001$) a partir do dia 14 (Figura 13).

A relação RANKL/RANK foi significativamente inferior no grupo abatacept comparado ao salina após três dias da exodontia (20.61 ± 4.64 vs. 38.22 ± 5.85 , $p=0.036$) não diferindo nos dias sete ($p=0.537$), 14 ($p=0.844$) ou 28 ($p=0.880$). Não houve variação significativa desse parâmetro ao longo do curso temporal no grupo salina ($p=0.327$) ou abatacept ($p=0.134$) (Figura 13).

Já a relação OPG/RANK demonstrou valores superiores no grupo abatacept (93.43 ± 14.66) comparado ao salina (41.57 ± 9.98) no 14^o dia pós exodontia ($p=0.012$), não

diferindo nos dias três ($p=0.860$), sete ($p=0.465$) ou 28 ($p=0.797$). Tanto no grupo salina ($p=0.002$) como no grupo abatacept ($p=0.031$) o aumento na relação OPG/RANK ocorreu a partir do dia 28 (Figura 13).

DISCUSSÃO

No presente estudo houve alteração do padrão de remodelação óssea pós exodontia nos animais tratados com abatacept, podendo ser evidenciado tanto na análise histomorfométrica como nos achados radiográficos. Menores quantidades de PMN neutrófilos, osteoclastos e células inflamatórias mononucleares nos três e 14 primeiros dias pós exodontia puderam ser observados. Interessantemente, no dia 28 o grupo tratado com abatacept manteve a contagem de mononucleares elevada, diferentemente do grupo salina.

Redução de polimorfonucleares neutrófilos, bem como monócitos e osteoclastos, são esperados durante tratamento com abatacept devido sua capacidade de bloquear o processo inflamatório via inibição de ativação de linfócitos T (Kliwinski et al., 2005). Também pode estar associado a ação secundária do fármaco na redução da transmigração de monócitos dos vasos sanguíneos, por mudanças conformacionais observadas no endotélio vascular com redução de proteínas de adesão vascular (Bonelli et al., 2013).

A correlação entre os achados histomorfométricos e radiográficos podem ser melhor compreendidos ao avaliarmos as etapas necessárias para o processo de cicatrização óssea pós exodontia, que segue etapas já muito bem estabelecidas. Inicialmente ocorrem processos de formação de coágulo e ativação do processo inflamatório para fagocitar o coágulo e combater possíveis infecções (Kim et al., 2012; Narisawa et al., 2021). No terceiro dia o aumento do processo inflamatório com liberação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias é observado, associado ao aumento da concentração de RANKL no meio, o que leva a maior ativação de osteoclastos, que contribuirão para a reabsorção óssea das regiões necessárias (Kim et al., 2012). O início da deposição óssea ocorre mediante o controle do processo inflamatório, por volta do sétimo dia. Esse processo se perpetua nos dias 14 e finaliza no dia 28, em situações normais (Kim et al., 2012). Importante correlação entre processo inflamatório e cicatrização óssea pode ser observada, podendo haver prejuízo na formação óssea em caso interferência no processo inflamatório inicial.

Reações de imuno-histoquímica foram realizadas a fim de conhecer o perfil celular envolvido nesses achados. Embora células mononucleares tenham apresentado redução em três

dias, foi observado aumento da expressão no grupo abatacept comparado com o grupo salina, de CD3, nos dias três e sete, e de FOXP3, no dia três, o que sugere uma maior presença de células CD3⁺FOXP3⁺, marcação compatível com Linfócitos T reguladores (LTreg), ou seja, a redução de mononucleares mostra estar associada a redução de macrófagos e maior expressão de CD3⁺FOXP3⁺. Esses achados são similares a estudos anteriores, realizado em pacientes com artrite reumatoide, que observaram redução de macrófagos (Bonelli et al., 2013; Bonelli et al., 2016) associado ao aumento de linfócitos Treg (Bonelli et al., 2016). Esse resultado, aparentemente conflitante com a função do abatacept, que reduz a ativação de linfócitos T, já foi descrito anteriormente e relacionado com a redução da apoptose de linfócitos Treg mediada por CD95 bem como também a suscetibilidade reduzida da supressão dessas células pelo abatacept (BONELLI *et al*, 2016). Esses achados sugerem então uma possível ativação da resposta Treg e inibição da osteoclastogênese, para tanto, reações de imuno-histoquímica para avaliação do eixo RANK/RANKL/OPG foram realizadas.

A redução na razão RANKL/RANK no grupo abatacept no dia três está associada a redução da ativação de osteoclastos (Boyce & Xing, 2007), ratificando os achados de redução de osteoclastos e de células multinucleadas TRAP⁺ nesse período de avaliação. Ainda não é certo que mecanismos o abatacept influencia para inibir a osteoclastogênese e diversas vias são candidatas como protagonistas.

A menor ativação e ação de osteoclastos pelo uso de abatacept foi descrita anteriormente por outros autores (Matsuura et al., 2018; Narisawa et al., 2021; Oi et al., 2019) os quais sugerem que esse achado ocorra devido ao aumento da expressão gênica da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO-1) durante a osteoclastogênese. Essa substância é responsável pela redução, por catabolização, da quantidade de triptofano, com consequente inibição da proliferação celular durante a osteoclastogênese (Oi et al., 2019). Outro estudo relaciona a utilização do abatacept com impacto nas células precursoras de osteoclastos que não passam pela etapa de redução da velocidade, necessária para finalização de sua maturação em osteoclastos (Matsuura et al., 2018). E em um estudo clínico prévio foi observado o aumento da expressão de OPG após uso de abatacept (Kawashiri et al., 2021).

O grupo abatacept apresentou como achado secundário a diferença com o grupo salina nas avaliações de ganho de massa corpórea, que apresentou menor aumento no dia 28. O uso de abatacept apresenta como efeito adverso comum a náusea, podendo acometer 11,6% dos pacientes (Bruce and Boyce, 2007), o que pode estar associado com o menor ganho de peso no dia 28 observado em nosso estudo, entretanto essa possível correlação não foi avaliada

Apesar da limitação desse estudo de ter tratado os ratos por um tempo relativamente

curto, estudos de farmacocinética do abatacept demonstram que 7 dias de pré-tratamento por via subcutânea já é tempo suficiente para o fármaco atingir um pico sério estável (Lon et al., 2013). A alteração do eixo RANK/RANKL/OPG contribuiu para esse desfecho e é provável que citocinas antiinflamatórias produzidas pelo aumento de linfócitos Treg no sítio de exodontia sejam importantes nesse processo (Sakaguchi et al., 2006).

CONCLUSÃO

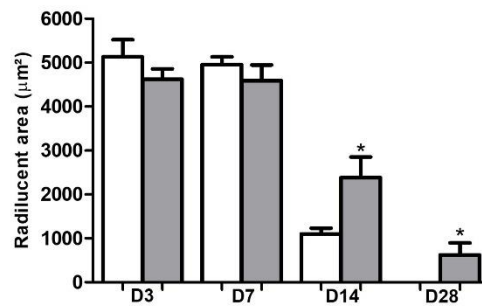
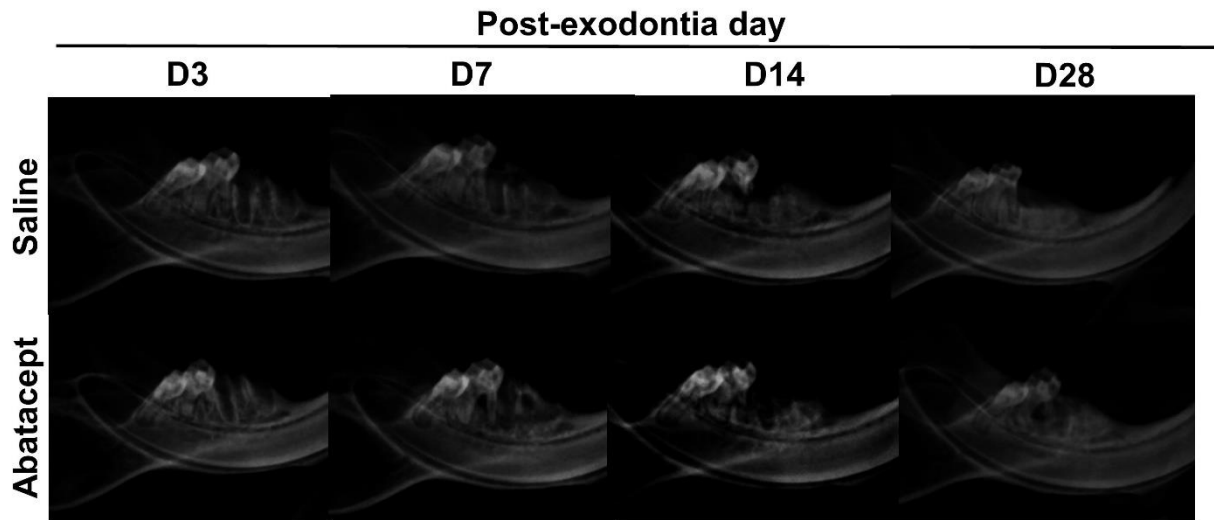
O tratamento com abatacept retardou a neorformação óssea , baseado nos achados de imagem, pós exodontia por meio da aparente ativação da resposta imune proveniente de células CD3+FOXP3+ e inibição da osteoclastogênese via alteração do eixo RANK/RANKL/OPG.

FINANCIAMENTO

Essa pesquisa foi parcialmente financiada pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) com protocolo número 429851/2018-9 e FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) com protocolo número 00164-00078.01.00/19.

FIGURAS

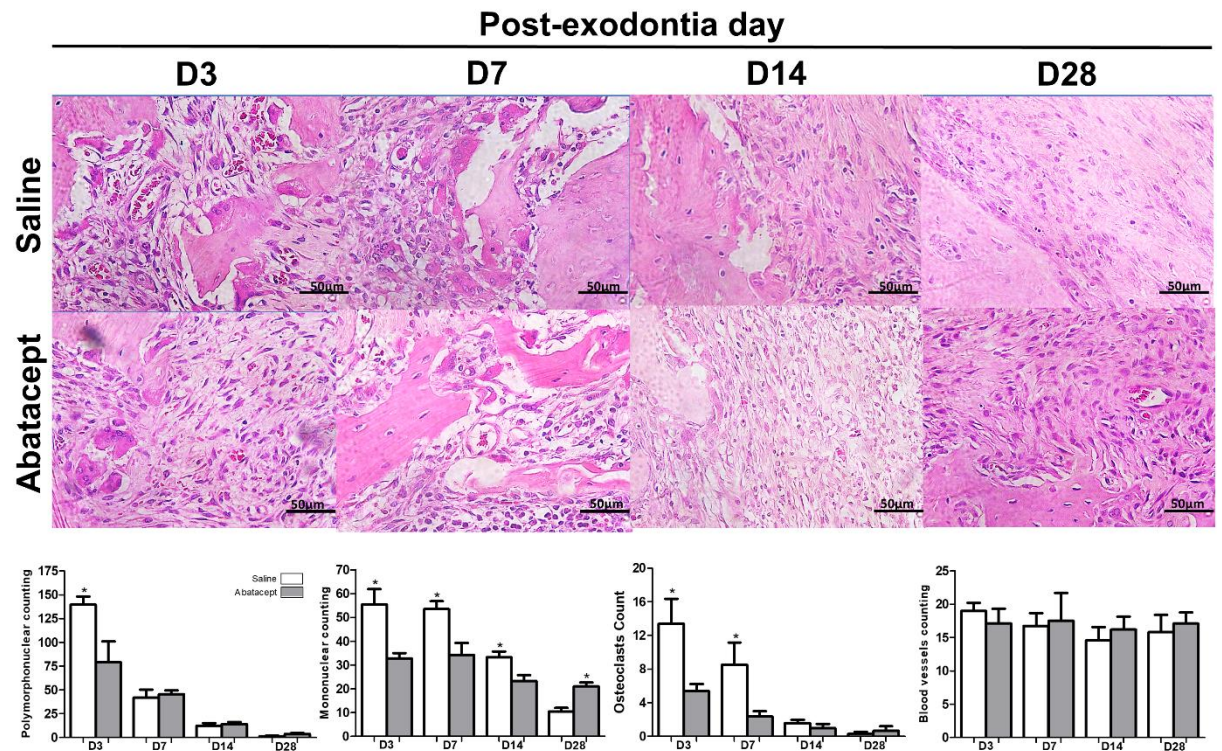
Figura 9 - Avaliação radiográfica dos alvéolos pós exodontia de ratos em tratamento com Abatacept ou solução salina.



Legenda: * $p < 0,05$ versus Salina no mesmo dia.

Fonte: Arquivo pessoal

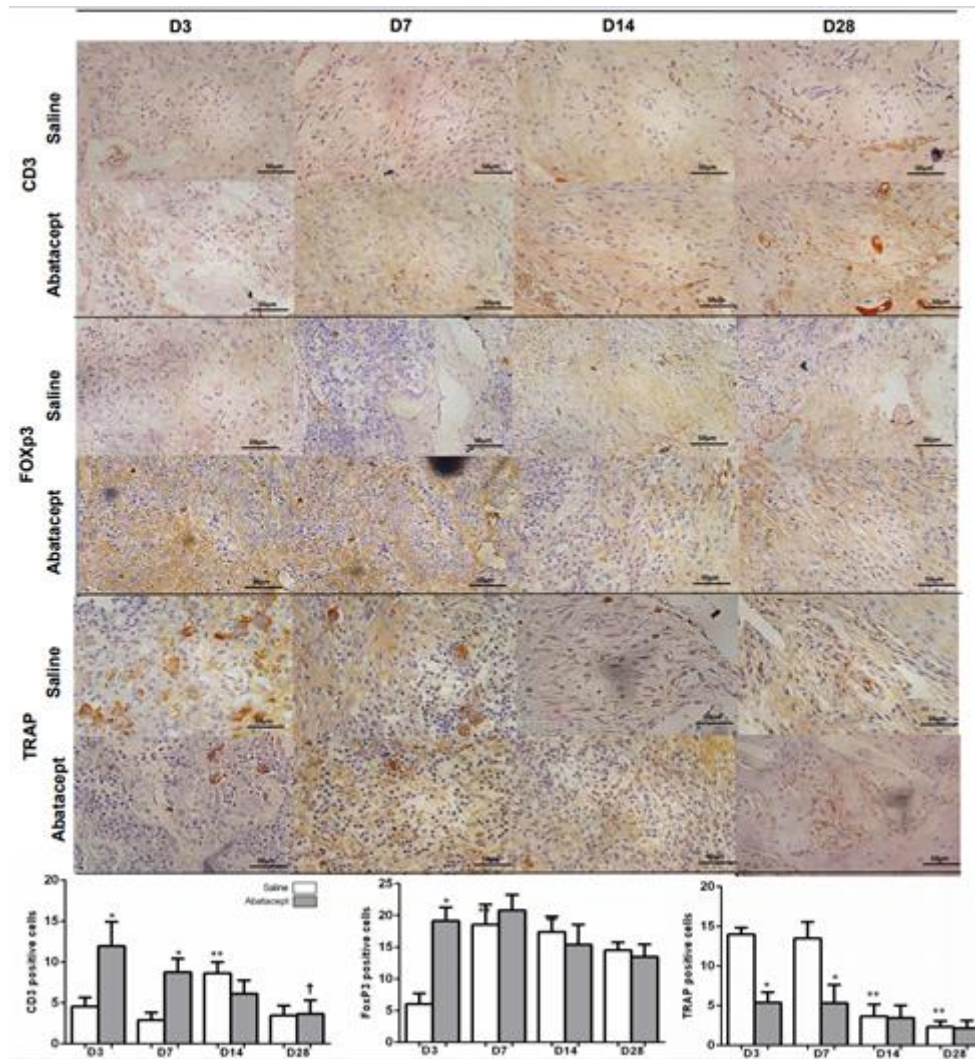
Figura 10- Perfil microscópico do alvéolo pós exodontia de ratos em tratamento com Abatacept ou solução salina.



Legenda: HE: 400x, * $p < 0,05$ versus Salina no mesmo dia (média±EPM, ANOVA-2-way/Bonferroni).

Fonte: arquivo pessoal.

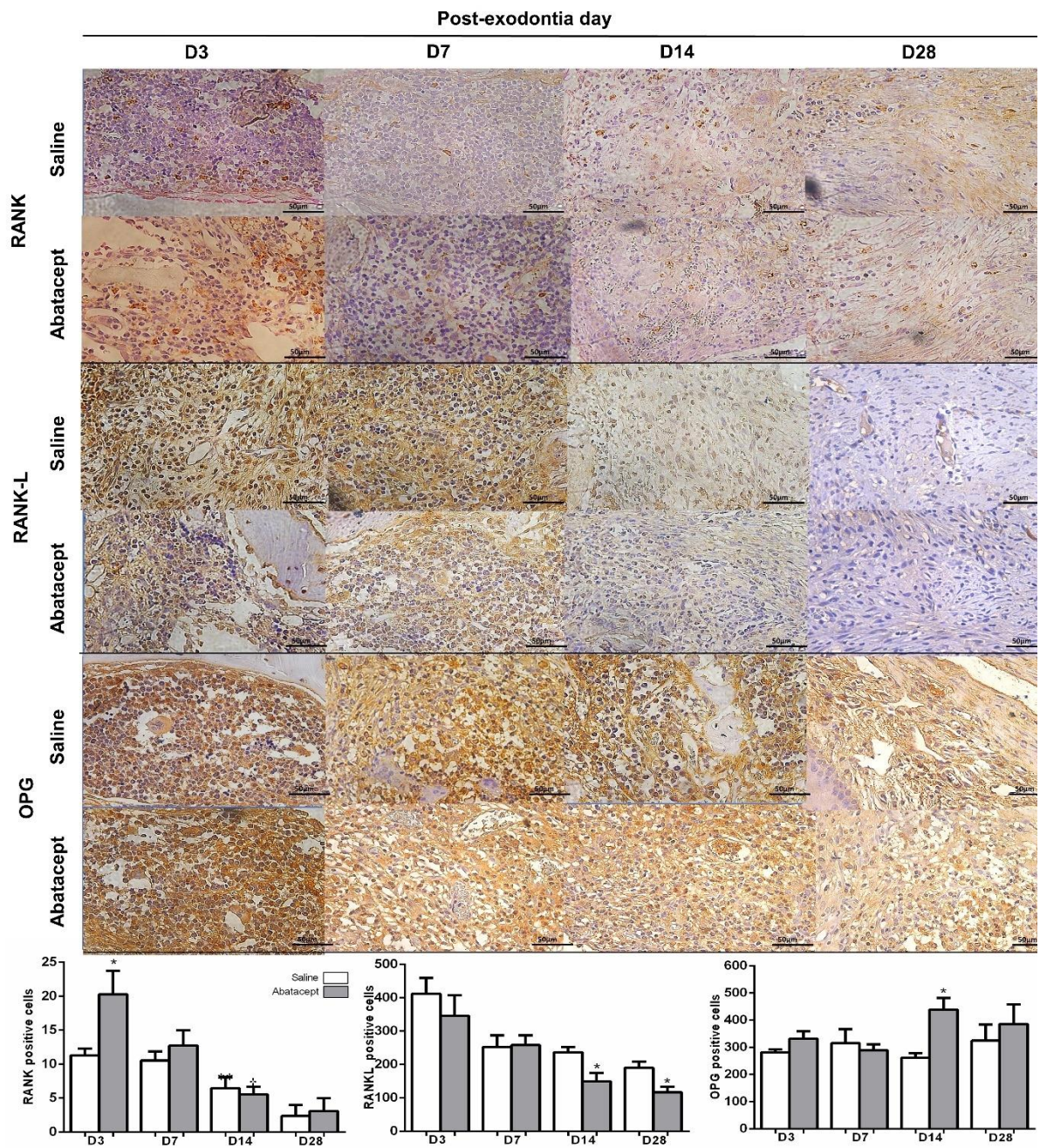
Figura 11- Painel de imunohistoquímica para os imunomarcadores CD3, FOXP3 e TRAP



Legenda: IHQ: 400x, *p<0,05 versus Salina no mesmo dia, **p<0,05 versus Salina no dia 3, †p<0,05 versus Abatacept no dia 3 (média±EPM, ANOVA-2-way/Bonferroni).

Fonte: arquivo pessoal.

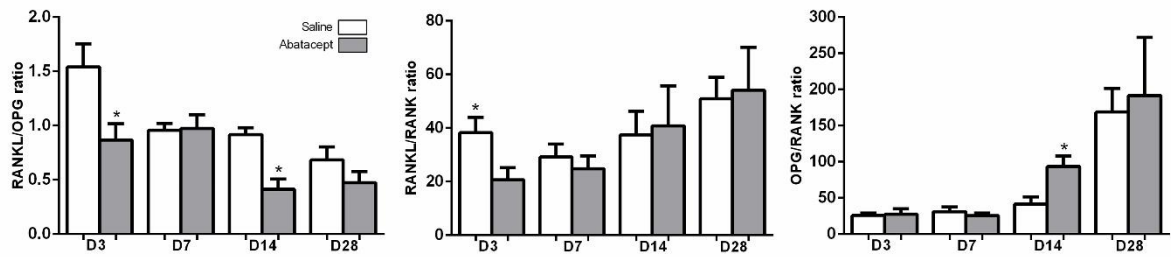
Figura 12- Painel de imuno-histoquímica para os imunomarcadores RANKL, OPG e RANK



Legenda: IHQ: 400x, * $p < 0,05$ versus Salina no mesmo dia, ** $p < 0,05$ versus Salina no dia 3, † $p < 0,05$ versus Abatacept no dia 3 (média±EPM, ANOVA-2-way/Bonferroni).

Fonte: arquivo pessoal.

Figura 13- Relação entre RANKL/OPG, RANKL/RANK e OPG/RANK



Legenda: * $p < 0,05$ na comparação entre grupos no mesmo dia de avaliação.

Fonte: Arquivo pessoal.

REFERÊNCIAS

- Blair, H. A., & Deeks, E. D. (2017). Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*, 77(11), 1221–1233. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0775-4>
- Bonelli, M., Ferner, E., Göschl, L., Blüml, S., Hladik, A., Karonitsch, T., Kiener, H. P., Byrne, R., Niederreiter, B., Steiner, C. W., Rath, E., Bergmann, M., Smolen, J. S., & Scheinecker, C. (2013). Abatacept (CTLA-4IG) treatment reduces the migratory capacity of monocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 65(3), 599–607. <https://doi.org/10.1002/art.37787>
- Bonelli, Michael, Göschl, L., Blüml, S., Karonitsch, T., Hirahara, K., Ferner, E., Steiner, C. W., Steiner, G., Smolen, J. S., & Scheinecker, C. (2016). Abatacept (CTLA-4Ig) treatment reduces T cell apoptosis and regulatory T cell suppression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (United Kingdom)*, 55(4), 710–720. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev403>
- Boyce, B. F., & Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy*, 9(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1186/ar2165>
- Bozec, A., Zaiss, M. M., Kagwiria, R., Voll, R., Rauh, M., Chen, Z., Mueller-Schmucker, S., Kroczeck, R. A., Heinzerling, L., Moser, M., Mellor, A. L., David, J. P., & Schett, G. (2014). T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Science Translational Medicine*, 6(235), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007764>
- Bruce, S. P., & Boyce, E. G. (2007). Update on abatacept: A selective costimulation modulator for rheumatoid arthritis. *Annals of Pharmacotherapy*, 41(7–8), 1153–1162. <https://doi.org/10.1345/aph.1K057>
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*, 85(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22348>
- Cutolo, M., Montagna, P., Soldano, S., Contini, P., Paolino, S., Pizzorni, C., Serio, B., Sulli, A., & Brizzolara, R. (2015). CTLA4-Ig/CD86 interactions in cultured human endothelial cells: effects on VEGFR-2 and ICAM1 expression. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 33(March 2015), 250–254.
- Cutolo, M., & Nadler, S. G. (2013). Advances in CTLA-4-Ig-mediated modulation of inflammatory cell and immune response activation in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 12(7), 758–767. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.01.001>
- De Araujo, A. A., Varela, H., De Medeiros, C. A. C. X., De Castro Brito, G. A., De Lima, K. C., De Moura, L. M., & De Araujo, R. F. (2015). Azilsartan reduced TNF- α and IL-1 β levels, increased IL-10 levels and upregulated VEGF, FGF, KGF, and TGF- α in an oral mucositis model. *PLoS ONE*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116799>
- Silva, P. G.B., Ferreira Junior, A. E. C., Teófilo, C. R., Barbosa, M. C., Lima Júnior, R. C. P., Sousa, F. B., Mota, M. R. L., De Albuquerque Ribeiro, R., & Alves, A. P. N. N. (2015).

Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*, 60(9), 1237–1245.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.015>

Deissler, H. L., Lang, G. K., & Lang, G. E. (2019). Fate of the Fc fusion protein aflibercept in retinal endothelial cells: competition of recycling and degradation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 257(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s00417-018-4166-7>

Ferreira-Junior, A. E. C., Barros-Silva, P. G. de, Oliveira, C. C. de, Lima Verde, M. E. Q., Sousa, F. B., Mota, M. R. L., Lima-Júnior, R. C. P., & Alves, A. P. N. N. (2020). Influence of infliximab therapy on bone healing post-dental extraction in rats. *Archives of Oral Biology*, 112(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104680>

García-Ortiz, A., & Serrador, J. M. (2018). Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in Molecular Medicine*, 24(4), 412–427.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.002>

Gemmell, E., Gb, M., Da, G., & Gj, S. (2001). Costimulatory molecules in human periodontal disease tissues. *Journal of Periodontal Research*, 36(1), 92–100.

Giudice, A., Liborio, F., Averta, F., Barone, S., & Fortunato, L. (2019). Oral Lichenoid Reaction: An Uncommon Side Effect of Rituximab. *Case Reports in Dentistry*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3154856>

Hassumi, J. S., Mulinari-Santos, G., Fabris, A. L. Da S., Jacob, R. G. M., Gonçalves, A., Rossi, A. C., Freire, A. R., Faverani, L. P., & Okamoto, R. (2018). Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *Journal of Applied Oral Science*, 26(0), 1–12. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0326>

Holt, M. H., Liu, V., & Fairley, J. (2018). Medium-vessel vasculitis presenting as multiple leg ulcers after treatment with abatacept. *JAAD Case Reports*, 4(8), 811–813.
<https://doi.org/10.1016/j.jdc.2018.06.021>

Iwahashi, C., Fujimoto, M., Nomura, S., Serada, S., Nakai, K., Ohguro, N., Nishida, K., & Naka, T. (2015). CTLA4-Ig suppresses development of experimental autoimmune uveitis in the induction and effector phases: Comparison with blockade of interleukin-6. *Experimental Eye Research*, 140, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.08.012>

Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 26(6), 1–5. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>

Kawashiri, S. ya, Endo, Y., Nishino, A., Okamoto, M., Tsuji, S., Takatani, A., Shimizu, T., Sumiyoshi, R., Koga, T., Iwamoto, N., Ichinose, K., Tamai, M., Nakamura, H., Origuchi, T., Aramaki, T., Ueki, Y., Yoshitama, T., Eiraku, N., Matsuoka, N., ... Kawakami, A. (2021). Association between serum bone biomarker levels and therapeutic response to abatacept in patients with rheumatoid arthritis (RA): a multicenter, prospective, and observational RA ultrasound cohort study in Japan. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 22(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12891-021-04392-5>

Khorasani, M. M. Y., Hassanshahi, G., Brodzikowska, A., & Khorramdelazad, H. (2020). Role(s) of cytokines in pulpitis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Cytokine*,

126(October 2019), 154896. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154896>

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. (2012). Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 42(5), 158–165. <https://doi.org/10.5051/jpis.2012.42.5.158>

Kliwinski, C., Kukral, D., Postelnek, J., Krishnan, B., Killar, L., Lewin, A., Nadler, S., & Townsend, R. (2005). Prophylactic administration of abatacept prevents disease and bone destruction in a rat model of collagen-induced arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 25(3), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2005.09.020>

Koster, M. J., & Warrington, K. J. (2017). Giant cell arteritis: Pathogenic mechanisms and new potential therapeutic targets. *BMC Rheumatology*, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s41927-017-0004-5>

Leonardi, D. P., Giovanini, A. F., Almeida, S., Schramm, C. A., & Baratto-Filho, F. (2011). Alterações pulpares e periapicais. *RSBO (Impr.)*, 8(4), 47–61.

Libby, P. (2008). Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*, 65(12), 140–146. <https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.s140-s146>

Linsley, P. S; Brady, W.; Urnes, M; Grosmaire, L. S; Damle, N. K; Ledbetter, J. A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*, 174(3), 561-9.

MacArthur Clark, J. (2018). The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*, 120(s1), S1–S7. <https://doi.org/10.1017/S0007114517002227>

Matsuura, Y., Kikuta, J., Kishi, Y., Hasegawa, T., Okuzaki, D., Hirano, T., Minoshima, M., Kikuchi, K., Kumanogoh, A., & Ishii, M. (2018). In vivo visualisation of different modes of action of biological DMARDs inhibiting osteoclastic bone resorption. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(8), 1220–1226. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212880>

Mei, Y. F., Yamaza, T., Atsuta, I., Danjo, A., Yamashita, Y., Kido, M. A., Goto, M., Akamine, A., & Tanaka, T. (2007). Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars. *Cell and Tissue Research*, 328(1), 117–127. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0003-5>

Mesquita, K. C., Dantas, T. S., de Barros Silva, P. G., de Queiroz Rodrigues, M. I., Alves, A. P. N. N., Mota, M. R. L., & Sousa, F. B. (2020). Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats: Role of interleukin (IL)-1 β , -6 and -10 and CD8/CD30 cells: Influence of abatacept treatment on oral wound healing: Experimental model on rats. *Life Sciences*, 243, 117243. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117243>

Michalowska, M., Znorko, B., Kaminski, T., Oksztulska-Kolanek, E., & Pawlak, D. (2015). New insights into tryptophan and its metabolites in the regulation of bone metabolism. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66(6), 779–791.

Montoyo, H. P., Vaccaro, C., Hafner, M., Ober, R. J., Mueller, W., & Ward, E. S. (2009). Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG

- homeostasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2788–2793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810796106>
- Narisawa, M., Kubo, S., Okada, Y., Yamagata, K., Nakayamada, S., Sakata, K., Yamaoka, K., & Tanaka, Y. (2021). Human dendritic cell-derived osteoclasts with high bone resorption capacity and T cell stimulation ability. *Bone*, 142(August), 115616. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115616>
- Oi, K., Tokunaga, T., Kuranobu, T., Yukawa, K., Kohno, H., Yoshida, Y., Mokuda, S., Hirata, S., & Sugiyama, E. (2019). Tumour necrosis factor α augments the inhibitory effects of CTLA-4-Ig on osteoclast generation from human monocytes via induction of CD80 expression. *Clinical and Experimental Immunology*, 196(3), 392–402. <https://doi.org/10.1111/cei.13271>
- Östör, A. J. K. (2008). Abatacept: A T-cell co-stimulation modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 27(11), 1343–1353. <https://doi.org/10.1007/s10067-008-0964-3>
- Pawlak, E., Kochanowska, I. E., Frydecka, I., Kielbiński, M., Potoczek, S., & Bilińska, M. (2005). The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 53(4), 336–341. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088318>
- Rombouts, C., Giraud, T., Jeanneau, C., & About, I. (2017). Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *Journal of Dental Research*, 96(2), 137–144. <https://doi.org/10.1177/0022034516671688>
- Romo-Tena, J., Gómez-Martín, D., & Alcocer-Varela, J. (2013). CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmunity Reviews*, 12(12), 1171–1176. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.07.002>
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: The neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nri2155>
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., et al., (2006). Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 212(3–4), 8–27. <https://doi.org/10.1080/08830180590934976>
- Souza, A. W. S. De, Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Cruvinel, W. D. M., Andrade, L. E. C., & Silva, N. P. Da. (2010). Sistema imunitário: parte II . O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(11), 665–679. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000600007>
- Tada, M., Inui, K., Sugioka, Y., Mamoto, K., Okano, T., & Koike, T. (2018). Abatacept might increase bone mineral density at femoral neck for patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: AIRTIGHT study. *Rheumatology International*, 38(5), 777–784. <https://doi.org/10.1007/s00296-017-3922-z>
- Tanideh, N., Tavakoli, P., Saghiri, M. A., Garcia-Godoy, F., Amanat, D., Tadbir, A. A., Samani, S. M., & Tamadon, A. (2013). Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine*,

Oral Pathology and Oral Radiology, 115(3), 332–338.
<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.08.450>

Weisman, M. H., Durez, P., Hallegua, D., Aranda, R., Becker, J. C., Nuamah, I., Vratsanos, G., Zhou, Y., & Moreland, L. W. (2006). Reduction of inflammatory biomarker response by abatacept in treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 33(11), 2162–2166. <https://doi.org/06/13/101> [pii]

Xu, Z., Lu, G., & Wu, F. (2009). Simvastatin suppresses homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells: Roles of caspase-3, cIAP-1 and cIAP-2. *Hypertension Research*, 32(5), 375–380. <https://doi.org/10.1038/hr.2009.24>

Capítulo 2

Avaliação da polpa de ratos Wistar submetidos a tratamento com abatacept: um estudo histomorfométrico e de imunohistoquímica

Karine Cestaro Mesquita^{1,2}, Thinali Sousa Dantas^{1,2}, Dayrine Silveira de Paula¹, Jennifer Vianna Barbosa², Paulo Goberlânio de Barros Silva^{1,2}, Ana Paula Negreiros Nunes Alves¹, Mário Rogério Lima Mota², Fabrício Bitu Sousa^{1,2}

¹Laboratório de Patologia Bucal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Departamento de Odontologia, Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Autor de Correspondência:

Paulo Goberlânio de Barros Silva

Curso de Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Rua João Adolfo Gurgel, número 133, 60190-060, Fortaleza, Ceará, Brasil; Telefone 1 / Fax: +55 85 32658100. E-mail: paulo_goberlanio@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência do tratamento com abatacept em parâmetros vasculares da polpa dentária de ratos e na imunoexpressão de vias associadas a saúde pulpar.

Metodologia: 16 ratos Wistar machos foram divididos em grupo teste, submetidos a administração subcutânea de abatacept 8mg/kg/semana, e grupo controle, com administração de solução salina estéril a 0,9% equivolumétrica, fracionadas em 3 administrações semanais por 42 dias. Após eutanásia e processamento histológico (Hematoxilina-eosina) foram realizadas fotomicrografias no aumento de 400x e para montagem integral das imagens das polpas dentárias dos molares inferiores direitos para análise histomorfométrica (da área relativa de vasos sanguíneos), avaliação de escores inflamatórios pulpares e a imuno-histoquímica (e-NOS, caspase 3 em odontoblastos, células da polpa não odontoblastos e vasos sanguíneos). Testes t de Student ou Mann-Whitney foram utilizados ($p < 0,05$, GraphPad Prism 5.0).

Resultado: As polpas dentárias dos animais tratados com abatacept não mostraram diferença

de diferença entre a área pulpar preenchida por vasos ($p= 0,850$) nem com relação aos escores inflamatórios ($p=0,263$). A imunexpressão para e-NOS ($p= 0,007$) foi reduzida nos odontoblastos e a imunexpressão para caspase 3 foi aumentada tanto nos odontoblastos ($p = 0,021$) quanto nas células da polpa não odontoblásticas ($p=0,033$) e foi observada imunomarcagem para FcRn em odontoblastos e células endoteliais, sem diferença entre os grupos avaliados.

Conclusão: Concluímos que, embora não tenha sido observada alteração nos escores inflamatórios das polpas dos animais tratados com abatacept, os achados de imunohistoquímica, redução na imunexpressão de eNOS nos odontoblastos, aumento de caspase 3 no tecido pulpar e presença de FcRn em células pulpares odontoblasticas e não odontoblásticas, sugerem um possível dano, que pode impactar na resposta pulpar a processos inflamatórios.

Descritores (DeCS): abatacept; CTLA4-Ig; Dental pulp

INTRODUÇÃO

O abatacept é um fármaco principalmente utilizado no tratamento para Artrite Reumatoide (AR), doença autoimune, contribuindo, através da redução da ativação de linfócitos T, com a diminuição de mediadores inflamatórios (Weisman et al., 2006). Consiste em uma proteína de fusão recombinante advinda da união do CTLA-4 ao fragmento constante da Imunoglobulina G1 (IgG1) humana modificada que compete com o receptor CD28, do linfócito T, pela união aos receptores da família B7 (CD80 e CD86), presente nas células apresentadoras de antígenos (APC's), interferindo, assim, na sua ativação T (Cutolo & Nadler, 2013).

Além de sua ação nos linfócitos T, foi observada também a relação desse fármaco com as proteínas de adesão ao endotélio vascular VEGFr-2 e ICAM 1, e a consequente redução da angiogênese em processos inflamatórios (Cutolo et al., 2015). A redução de angiogênese também foi observada quando aplicadas altas doses de abatacept durante reparo de feridas em mucosa oral (Mesquita et al., 2020).

Esse fármaco também tem sido utilizado no tratamento da vasculite inflamatória (Koster & Warrington, 2017), devido redução da resposta imunológica intravascular (Holt et al., 2018; Koster & Warrington, 2017). Paradoxalmente, Holt et al. (2018) descreveu um caso clínico de um paciente que desenvolveu inúmeras úlceras decorrentes de uma vasculite severa induzida pelo tratamento com abatacept.

Embora o abatacept apresente ação na inibição da ativação de linfócitos T, sua conflitante relação com o endotélio vascular torna pertinente o estudo de polpas dentárias de animais tratados com abatacept, avaliação essa não realizada anteriormente. O abatacept, devido sua fração Fc, presente em todos os anticorpos, é metabolizado em células endoteliais e macrófagos por meio de endocitose mediada pelo FcRN o que pode interferir no metabolismo dos vasos sanguíneos (Liu, 2018; Latvala et al., 2017). Uma vez que o abatacept parece ter um efeito tóxico em vasos sanguíneos (Koster & Warrington, 2017) e sabendo que a polpa dentária apresenta um suprimento vascular bastante limitado, tornando esse tecido extremamente sensível a alterações vasculares (Rombouts et al., 2017), o objetivo desse estudo foi avaliar polpas dentárias de ratos Wistar recebendo abatacept em um intervalo de 42 dias. Devido ao crescente número de pacientes utilizando essa medicação de forma crônica esse conhecimento se faz relevante.

METODOLOGIA

Aspectos éticos

Esse trabalho foi desenvolvido pelo Laboratório de Patologia Bucodental do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) em colaboração com o Laboratório de Patologia do Centro Universitário Christus (Unichristus). Previamente ao início dos protocolos experimentais e coleta dos dados o estudo foi submetido à Comissão Ética no Uso de Animais da Unichristus, sob protocolo de aceitação CEUA 028/19 (ANEXO I), sendo utilizados um total de 16 animais.

Cálculo amostral

Tendo em vista que Mesquita et al. demonstrou em modelo de úlceras orais que o tratamento com Abatacept 8mg/kg/semana reduz significativamente a neoformação vascular ($11,8 \pm 3,9$ vs. $7,2 \pm 3,9$ vasos/microcampo), estima-se necessário avaliar 16 dentes por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente 90% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste trabalho (teste t). Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra ao longo do modelo, acresceu-se 10% sobre esta, totalizando 18 dentes. Assim, seis animais por grupo e os três molares inferiores direitos de cada animal foram utilizados nessa análise.

Animais, Grupos e Doses

O estudo foi fundamentado no princípio dos 3R's (Reduction, Refinement and Replacement) (MacArthur Clark, 2018), segundo Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA, normativa número 30 publicada em 02 de fevereiro de 2016, que norteia as condutas éticas de experimentação animal. Para isso, 16 ratos machos da linhagem Wistar (*rattus norvegicus*), com peso médio de 180 gramas, foram abrigados a 24° C em ciclo luz-escuro de 12 horas e com acesso irrestrito a água e a alimento no biotério de experimentação da Unichristus.

Os animais foram divididos em grupo teste, com administração de abatacept subcutâneo (SC) 8mg/kg/semana e controle, com administração de solução salina estéril equivolúmica a 0,9%, fracionadas em 3 administrações semanais (Mesquita et al., 2020). A administração SC foi realizada por seis semanas e a eutanásia ocorreu após 42 dias do início do

experimento por sobredose de quentamina (225 mg /kg) e xilazina (75 mg/kg).

Análise histológica da polpa dentária

Após a dissecação, as hemimandíbulas direitas foram armazenadas em formol neutro 10%, descalcificadas em solução 10% EDTA (pH 7.3; NaOH, PA), durante 30 dias e processadas histologicamente para confecção de lâminas histológicas e análise do primeiro molar inferior direito (adaptado de Silva et al., 2016).

Fotomicrografias foram realizadas no aumento de 400x contemplando toda a área da polpa dentária dos primeiros molares inferiores direito, sendo, em seguida realizada a montagem da área representativa de cada da polpa, a qual foi mensurada em μm^2 utilizando o comando *freehand selections* do software ImageJ® (Silva et al., 2016).

Possíveis respostas pulpares foram avaliadas de acordo com a adoção de escores, que avaliam fatores como desorganização da camada odontoblástica, vacuolização celular, edema, congestão vascular, hemorragia e infiltrado inflamatório (leucocitário com neutrófilos polimorfonucleares e mononucleares). Segundo essa classificação é considerado escore: **0**: sem alterações pulpares (organização da camada de odontoblastos, formação de pré-dentina, congestão vascular ocasional, presença de células fusiformes). **1**: desorganização da camada de odontoblastos, vacuolização celular, discreta congestão vascular, leve edema. **2**: desorganização da camada de odontoblastos, vacuolização celular, moderado edema, moderada congestão vascular, hemorragia, presença de discreto a moderado infiltrado inflamatório. **3**: desorganização da camada de odontoblastos, vacuolização celular, moderada a intensa congestão vascular, intenso edema, presença de intenso infiltrado inflamatório (ESTANISLAU, 2019).

Processamento e análise imuno-histoquímica para caspase-3, e-NOS e FcRn.

Para a análise imunohistoquímica, cortes de 3 μm de espessura dos blocos foram realizados, dispostos sobre lâminas silanizadas, submetidos a desparafinização, reidratação e recuperação antigênica com solução de citrato pH 6,0 (eNOS e FcRn) e Tris-EDTA pH 9,0 (caspase 3). Posteriormente ao resfriamento em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em solução tampão de fosfato (PBS) e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% diluído PBS por 30 minutos. Após lavagens em PBS, realizou-se incubação *overnight* com os anticorpos primários para eNOS (1:200 ab5589, Abcam®), caspase 3 (1:200 ab13585, Abcam®), FcRn (1:300 ab193148)

Para controles positivos foram usadas secções histológicas de medula óssea (caspase 3), e baço (eNOS e FcRn), e para controles negativos foram suprimidos as fases envolvendo incubação com anticorpos primários.

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

A análise dos campos foi realizada por escores de imunomarcação dados por dois observadores de forma cega, variando de 0 a 3 (sendo 0, ausência de células positivas; 1, 1-33% de células positivas; 2, variação de 34-66% de células marcadas e 3, valores de 67-100% de células marcadas, respectivamente) nos odontoblastos, nos vasos sanguíneos e nas demais células da polpa dentária não odontoblastos (Silva et al., 2015).

Análise estatística

Após realização de teste de normalidade, Kolmogorov-Smirnov, as variáveis não paramétricas foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis/Dunn e os dados paramétricos pela Análise de Variância (ANOVA-1-way e ANOVA-2-way)/Bonfferoni ($p < 0,05$, GraphPad Pris 5.0).

RESULTADOS

Foi observada redução do número de vasos/mm² da polpa do grupo abatacept comparado com o grupo salina (26.75±3.95vs. 16.75±2.00) ($p = 0,030$), assim como da área média dos vasos entre os mesmos grupos (15.80±4.47 vs. 6.50±0.94) ($p = 0,010$). (Tabela2) (Figura 14)

Tabela 2- Parâmetros histomorfométricos e imunohistoquímicos de marcação pulpar

	Grupo		p-Valor
	Salina	Abatacept	
Parâmetros histomorfométricos			
Número de vasos/mm ²	26.75±3.95	16.75±2.00	0,030 ^{a*}
Área média dos vasos (mm ²)	15.80±4.47	6.50±0.94	0,010 ^{a*}
Escores inflamatórios	0 (0-2)	0 (0-2)	0,263 ^b
eNOS			

Odontoblastos	3 (2-3)	1 (1-2)	0,007^{b*}
Não odontoblastos	1 (0-1)	1 (0-1)	0,479 ^b
Endotélio	1 (0-1)	0 (0-1)	0,126 ^b
Caspase 3			
Odontoblastos	1 (0-1)	2 (1-2)	0,021^{b*}
Não odontoblastos	0 (0-1)	1 (1-1)	0,033^{b*}
Endotélio	0 (0-1)	0 (0-2)	0,755 ^b
FcRn			
Odontoblastos	2 (1-2)	2 (2-3)	0,634 ^b
Não odontoblastos	0 (0-0)	0 (0-1)	1,000 ^b
Endotélio	1 (0-1)	1 (1-1)	1,000 ^b

^aTeste t de Student (média±EPM); ^bTeste de Mann-Whitney [mediana (mínimo-máximo)].

*p<0,05 versus dia Salina;

A avaliação de imunohistoquímica demonstrou diferença estatística tanto para e-NOS quanto para caspase 3. O grupo abatacept apresentou redução dos escores de imunomarcção de e-NOS nos odontoblastos (3 (2-3) vs. 1 (1-2)) (p= 0,007), sem diferença nas células não odontoblásticas (1 (0-1) vs. 1 (0-1)) (p=0,479) e no endotélio (1 (0-1) vs. 0 (0-1)) (p= 0,126). A marcação de caspase 3, entretanto, demonstrou aumento tanto nos odontoblastos (1 (0-1) vs. 2 (1-2)) (p = 0,021) quanto nas células não odontoblásticas (0 (0-1) vs. 1 (1-1)) (p=0,033), sem, entretanto, apresentar diferença na avaliação do endotélio vascular (0 (0-1) vs. 0 (0-2)) (p=0,755) (Tabela 2) (Figura 17). Não foi observada diferença entre os grupos salina e abatacept quanto a imunomarcção para FcRn em odontoblastos (2 (1-2) vs. 2 (2-3)) (p=0,634), células não odontoblásticas (0 (0-0) vs. 0 (0-1))(p=1,000) e em células endoteliais (1 (0-1) vs. 1 (1-1)) (p=1,000) (Tabela 2) (Figura 15).

DISCUSSÃO

A utilização de abatacept não influenciou nos escores de inflamação pulpar, não havendo, portanto, diferença quanto a organização celular dessa estrutura, entretanto, foi observada redução do número e área dos vasos, quando comparado o grupo salina com abatacept, além de diferenças na imunoexpressão de e-NOS e caspase-3 e, pela primeira vez, a detecção da presença de FcRn no endotélio vascular de polpas dentárias e em odontoblastos também foram observados.

A polpa dentária foi escolhida para ser estudada por ser um tecido que apresenta um limitado, apesar de robusto, feixe vascular como única fonte de suprimento sanguíneo, o que torna esse tecido especialmente sensível a alterações vasculares (Libby, 2008). Diversos estudos mostram que o tratamento com abatacept leva a redução do processo inflamatório (Blair & Deeks, 2017; Kliwinski et al., 2005; Weisman et al., 2006) e da angiogênese (Cutolo et al., 2015; Mesquita et al., 2020), o que foi confirmado em nosso estudo com menor número e área de vasos nesse grupo.

Interessantemente, houve uma redução na imunexpressão para e-NOS e um aumento para caspase 3. A e-NOS é a isorforma da Óxido Nítrico Sintase com conhecida ação direta em células endoteliais, promovendo angiogênese (García-Ortiz & Serrador, 2018), porém, achado descrito em estudos que avaliam modelos de pulpíte em ratos observaram sua diminuição em odontoblastos durante processos inflamatórios pulpare, com um mecanismo de ação ainda não elucidado, mas que interfere negativamente na vitalidade pulpar (Mei et al., 2007), também observado na imunexpressão para caspase 3. A caspase 3 consiste em um dos mais importantes marcadores de apoptose (Xu et al., 2009) e o aumento da imunexpressão de caspase 3, tanto em odontoblastos como em células da polpa não-odontoblasticas, sugerem um possível dano tecidual nesses elementos celulares. Portanto, as imunexpressões de caspase 3 e e-NOS, sugerem alguma lesão pulpar, o que pode ser reforçada pela redução do número e diâmetro dos vasos, embora não tenha sido observada alteração nos escores inflamatórios.

Esses achados podem estar relacionados com relatos de vasculite induzida pela utilização dessa medicação (Holt et al., 2018), embora o abatacept seja prescrito como relevante forma de tratamento de vasculite, de origem autoimune, em outros artigos (Koster & Warrington, 2017). Esse achado não está limitado ao abatacept, mas parte de sua conformação tridimensional e a sua farmacocinética. A constituição do abatacept é dependente da IgG1 humana modificada (Blair & Deeks, 2017), que, como o anticorpo IgG, é metabolizado nas células endoteliais por meio de endocitose induzida pelo seu receptor natural FcRn (Roopenian & Akilesh, 2007). Esse receptor é responsável por reciclar os anticorpos, impedindo que os mesmos sejam destruídos por catabolização. Esse processo de absorção e reciclagem, ou catabolização, ocorre em diversas regiões, mas de forma significativa no endotélio vascular, e macrófagos presentes em algumas regiões (Montoyo et al., 2009; Roopenian & Akilesh, 2007; Latvala et al., 2017). Apesar desse receptor já ter sido descrito em inúmeros tecidos (Latvala et al., 2017) sua presença na polpa dentária não havia sido antes reportada.

A imunomarcção para FcRn foi então avaliada em nosso estudo, a fim de investigar a possível associação entre os achados de e-NOS e caspase 3.

Os resultados confirmaram a imunomarcagem de FcRn no endotélio vascular dos vasos das polpas dentárias, tendo sido observada também, de forma inédita, a imunomarcagem em odontoblastos. Diferenças entre os grupos não foram observadas, mas as mesmas não eram esperadas, visto que não apresentam relação direta com a utilização da medicação, sendo apenas uma forma de reciclagem do IgG.

Esse estudo foi pioneiro na avaliação da polpa de ratos sob utilização de abatacept, buscando inicialmente caracterizar os achados pulpares em animais sob utilização desse fármaco. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de investigar se há impactos negativos na resposta pulpar frente a processos inflamatórios e os mecanismos pelos quais essa alteração ocorreria e sua possível correlação com a ação do FcRn.

Concluimos que, embora não tenha sido observada alteração nos escores inflamatórios das polpas dos animais tratados com abatacept, a significativa redução no número e diâmetro dos vasos além dos achados de imuno-histoquímica, redução na imunexpressão de eNOS nos odontoblastos e aumento de caspase 3 no tecido pulpar, sugerem um possível dano, que pode impactar na resposta pulpar a processos inflamatórios e, embora a causa para esses achados não tenha sido investigada, novos estudos são necessários para estabelecer a relação causa-efeito com a imunomarcagem do FcRn no endotélio vascular e nos odontoblastos. Visto que os anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes são formas de tratamento que tendem a complementar e até mesmo substituir parcial ou totalmente a terapia farmacológica convencional de inúmeras doenças, esse trabalho sugere que há um impacto na saúde da polpa dentária.

FINANCIAMENTO

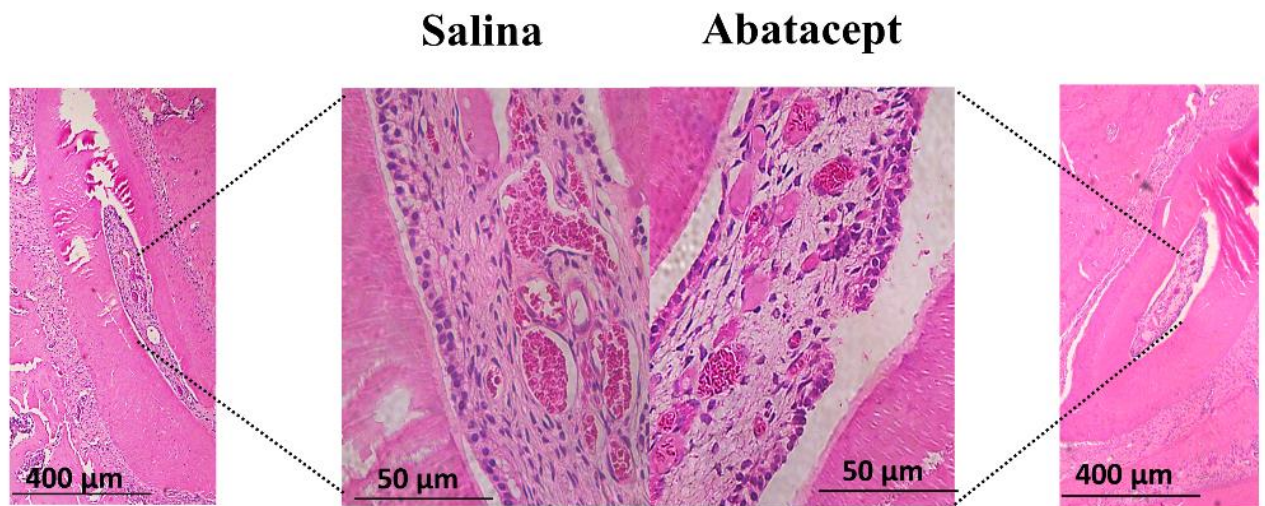
Essa pesquisa foi parcialmente financiada pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) com protocolo número 429851/2018-9 e FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) com protocolo número 00164-00078.01.00/19.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Setor de Pulsoterapia do Hospital Universitário Walter Cantídio sem cujas doações de restos de Abatacept para descarte essa pesquisa não teria sido possível bem como aos funcionários do Biotério do Centro Universitário Christus sem cujo apoio os experimentos não teriam sido possíveis.

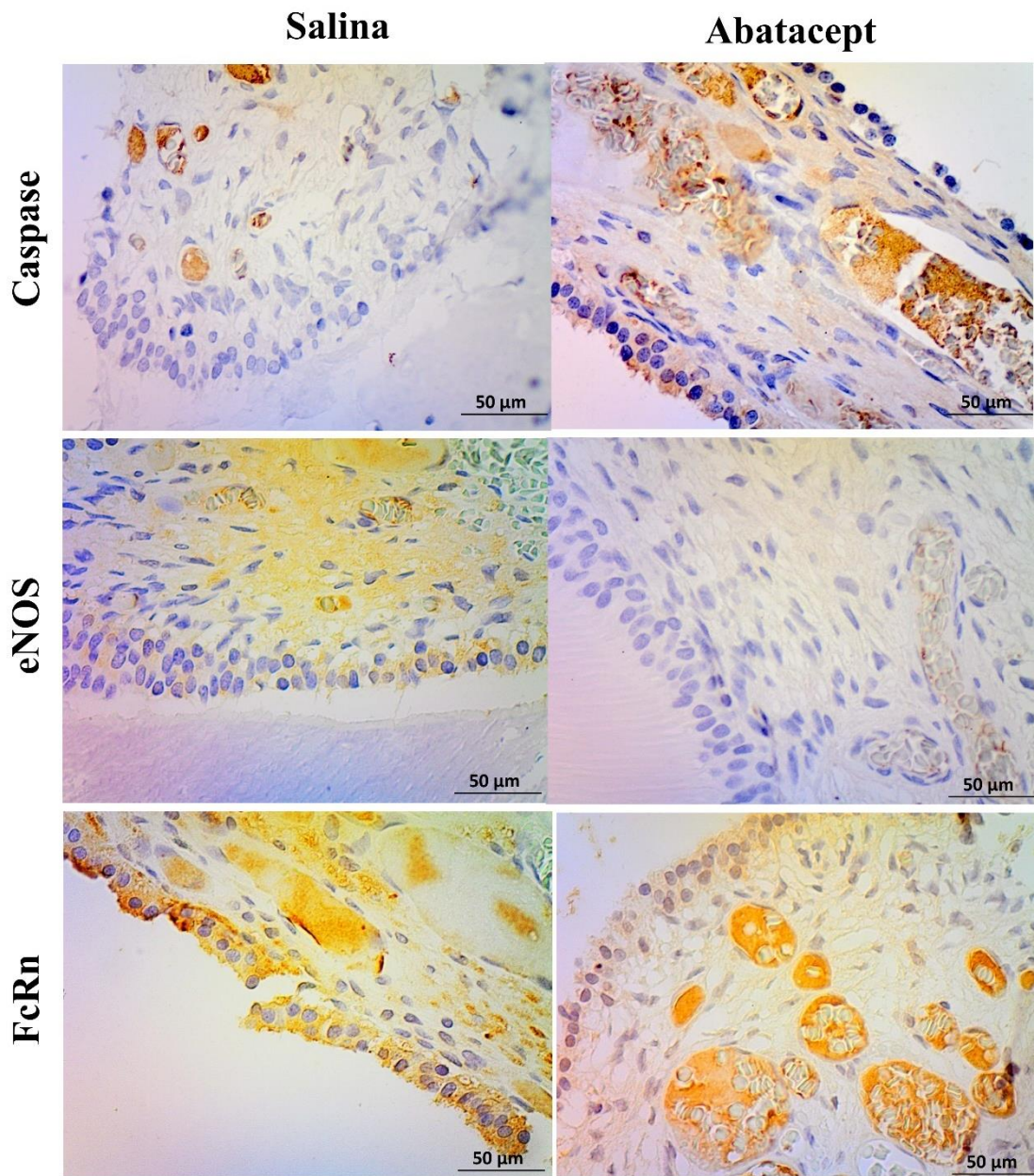
FIGURAS

Figura 14- Imagem ilustrativa das polpas do grupo salina e abatacept no aumento de 5x e no aumento de 40x respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 15- Paineil ilustrativo dos resultados imunohistoquímicos para e-NOS, caspase 3 e FcRn da polpa de animais tratados com solução salina e com abatacept.



Fonte: arquivo pessoal.

CONCLUSÃO GERAL

O tratamento com abatacept retarda a neorformação óssea pós exodontia por meio de ativação da resposta Treg e inibição da osteoclastogênese via alteração do eixo RANK/RANKL/OPG e na polpa dentária o uso desse fármaco induziu redução do diâmetro dos vasos sanguíneos da polpa com consequente redução do número de vasos e da celularidade, aparentemente associada a redução de eNOS e aumento de caspase 3.

REFERÊNCIAS

- Blair, H. A., & Deeks, E. D. (2017). Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*, 77(11), 1221–1233. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0775-4>
- Bonelli, M., Ferner, E., Göschl, L., Blüml, S., Hladik, A., Karonitsch, T., Kiener, H. P., Byrne, R., Niederreiter, B., Steiner, C. W., Rath, E., Bergmann, M., Smolen, J. S., & Scheinecker, C. (2013). Abatacept (CTLA-4Ig) treatment reduces the migratory capacity of monocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 65(3), 599–607. <https://doi.org/10.1002/art.37787>
- Bonelli, Michael, Göschl, L., Blüml, S., Karonitsch, T., Hirahara, K., Ferner, E., Steiner, C. W., Steiner, G., Smolen, J. S., & Scheinecker, C. (2016). Abatacept (CTLA-4Ig) treatment reduces T cell apoptosis and regulatory T cell suppression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (United Kingdom)*, 55(4), 710–720. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev403>
- Boyce, B. F., & Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy*, 9(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1186/ar2165>
- Bozec, A., Zaiss, M. M., Kagwiria, R., Voll, R., Rauh, M., Chen, Z., Mueller-Schmucker, S., Kroczek, R. A., Heinzerling, L., Moser, M., Mellor, A. L., David, J. P., & Schett, G. (2014). T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Science Translational Medicine*, 6(235), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007764>
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*, 85(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22348>
- Cutolo, M., Montagna, P., Soldano, S., Contini, P., Paolino, S., Pizzorni, C., Seriola, B., Sulli, A., & Brizzolaro, R. (2015). CTLA4-Ig/CD86 interactions in cultured human endothelial cells: effects on VEGFR-2 and ICAM1 expression. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 33(March 2015), 250–254.
- Cutolo, Maurizio, & Nadler, S. G. (2013). Advances in CTLA-4-Ig-mediated modulation of

inflammatory cell and immune response activation in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 12(7), 758–767. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.01.001>

De Araujo, A. A., Varela, H., De Medeiros, C. A. C. X., De Castro Brito, G. A., De Lima, K. C., De Moura, L. M., & De Araujo, R. F. (2015). Azilsartan reduced TNF- α and IL-1 β levels, increased IL-10 levels and upregulated VEGF, FGF, KGF, and TGF- α in an oral mucositis model. *PLoS ONE*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116799>

Dave JH, Vora HH, Trivedi TI, Ghosh NR. (2016). Nibrin expression in oral squamous cell carcinoma: association with clinicopathological parameters. *J Cancer Metastasis Treat.*;2:436-42.

Silva, P. G.B., Ferreira Junior, A. E. C., Teófilo, C. R., Barbosa, M. C., Lima Júnior, R. C. P., Sousa, F. B., Mota, M. R. L., De Albuquerque Ribeiro, R., & Alves, A. P. N. N. (2015). Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*, 60(9), 1237–1245. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.015>

Deissler, H. L., Lang, G. K., & Lang, G. E. (2019). Fate of the Fc fusion protein aflibercept in retinal endothelial cells: competition of recycling and degradation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 257(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s00417-018-4166-7>

Estanislau IMG. Modelo experimental de movimentação dentária induzida com ancoragem esquelética: estudo morfológico. 2019. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2019.

Ferreira-Junior, A. E. C., Silva, P. G.B. de, Oliveira, C. C. de, Lima Verde, M. E. Q., Sousa, F. B., Mota, M. R. L., Lima-Júnior, R. C. P., & Alves, A. P. N. N. (2020). Influence of infliximab therapy on bone healing post-dental extraction in rats. *Archives of Oral Biology*, 112(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104680>

García-Ortiz, A., & Serrador, J. M. (2018). Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in Molecular Medicine*, 24(4), 412–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.002>

Gemmell, E., Gb, M., Da, G., & Gj, S. (2001). Costimulatory molecules in human periodontal

disease tissues. *Journal of Periodontal Research*, 36(1), 92–100.

Giudice, A., Liborio, F., Averta, F., Barone, S., & Fortunato, L. (2019). Oral Lichenoid Reaction: An Uncommon Side Effect of Rituximab. *Case Reports in Dentistry*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3154856>

Hassumi, J. S., Mulinari-Santos, G., Fabris, A. L. Da S., Jacob, R. G. M., Gonçalves, A., Rossi, A. C., Freire, A. R., Faverani, L. P., & Okamoto, R. (2018). Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *Journal of Applied Oral Science*, 26(0), 1–12. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0326>

Holt, M. H., Liu, V., & Fairley, J. (2018). Medium-vessel vasculitis presenting as multiple leg ulcers after treatment with abatacept. *JAAD Case Reports*, 4(8), 811–813. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2018.06.021>

Iwahashi, C., Fujimoto, M., Nomura, S., Serada, S., Nakai, K., Ohguro, N., Nishida, K., & Naka, T. (2015). CTLA4-Ig suppresses development of experimental autoimmune uveitis in the induction and effector phases: Comparison with blockade of interleukin-6. *Experimental Eye Research*, 140, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.08.012>

Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 26(6), 1–5. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>

Kawashiri, S. ya, Endo, Y., Nishino, A., Okamoto, M., Tsuji, S., Takatani, A., et al., (2021). Association between serum bone biomarker levels and therapeutic response to abatacept in patients with rheumatoid arthritis (RA): a multicenter, prospective, and observational RA ultrasound cohort study in Japan. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 22(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12891-021-04392-5>

Khorasani, M. M. Y., Hassanshahi, G., Brodzikowska, A., & Khorramdelazad, H. (2020). Role(s) of cytokines in pulpitis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Cytokine*, 126(October 2019), 154896. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154896>

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. (2012). Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 42(5), 158–165. <https://doi.org/10.5051/jpis.2012.42.5.158>

- Kliwinski, C., Kukral, D., Postelnek, J., Krishnan, B., Killar, L., Lewin, A., Nadler, S., & Townsend, R. (2005). Prophylactic administration of abatacept prevents disease and bone destruction in a rat model of collagen-induced arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 25(3), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2005.09.020>
- Koster, M. J., & Warrington, K. J. (2017). Giant cell arteritis: Pathogenic mechanisms and new potential therapeutic targets. *BMC Rheumatology*, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s41927-017-0004-5>
- Latvala, S., Jacobsen, B., Otteneder, M. B., Herrmann, A., & Kronenberg, S. (2017). Distribution of FcRn Across Species and Tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 65(6), 321–333. <https://doi.org/10.1369/0022155417705095>
- Leonardi, D. P., Giovanini, A. F., Almeida, S., Schramm, C. A., & Baratto-Filho, F. (2011). Alterações pulpare e periapicais. *RSBO (Impr.)*, 8(4), 47–61.
- Libby, P. (2008). Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*, 65(12), 140–146. <https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.s140-s146>
- Linsley, Peter S; Brady, William; Urnes, M; Grosmaire, Laura S; Damle, Nitin K; Ledbetter, J. A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*, 174(3), 561-9.
- MacArthur Clark, J. (2018). The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*, 120(s1), S1–S7. <https://doi.org/10.1017/S0007114517002227>
- Matsuura, Y., Kikuta, J., Kishi, Y., Hasegawa, T., Okuzaki, D., Hirano, T., Minoshima, M., Kikuchi, K., Kumanogoh, A., & Ishii, M. (2018). In vivo visualisation of different modes of action of biological DMARDs inhibiting osteoclastic bone resorption. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(8), 1220–1226. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212880>
- Mei, Y. F., Yamaza, T., Atsuta, I., Danjo, A., Yamashita, Y., Kido, M. A., Goto, M., Akamine, A., & Tanaka, T. (2007). Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars. *Cell and Tissue Research*, 328(1), 117–127. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0003-5>
- Mesquita, K. C., Dantas, T. S., de Barros Silva, P. G., de Queiroz Rodrigues, M. I., Alves, A. P.

- N. N., Mota, M. R. L., & Sousa, F. B. (2020). Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats: Role of interleukin (IL)-1 β , -6 and -10 and CD8/CD30 cells: Influence of abatacept treatment on oral wound healing: Experimental model on rats. *Life Sciences*, *243*, 117243. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117243>
- Michalowska, M., Znorko, B., Kaminski, T., Oksztulska-Kolanek, E., & Pawlak, D. (2015). New insights into tryptophan and its metabolites in the regulation of bone metabolism. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *66*(6), 779–791.
- Montoyo, H. P., Vaccaro, C., Hafner, M., Ober, R. J., Mueller, W., & Ward, E. S. (2009). Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(8), 2788–2793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810796106>
- Narisawa, M., Kubo, S., Okada, Y., Yamagata, K., Nakayamada, S., Sakata, K., Yamaoka, K., & Tanaka, Y. (2021). Human dendritic cell-derived osteoclasts with high bone resorption capacity and T cell stimulation ability. *Bone*, *142*(August), 115616. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115616>
- Oi, K., Tokunaga, T., Kuranobu, T., Yukawa, K., Kohno, H., Yoshida, Y., Mokuda, S., Hirata, S., & Sugiyama, E. (2019). Tumour necrosis factor α augments the inhibitory effects of CTLA-4-Ig on osteoclast generation from human monocytes via induction of CD80 expression. *Clinical and Experimental Immunology*, *196*(3), 392–402. <https://doi.org/10.1111/cei.13271>
- Östör, A. J. K. (2008). Abatacept: A T-cell co-stimulation modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, *27*(11), 1343–1353. <https://doi.org/10.1007/s10067-008-0964-3>
- Pawlak, E., Kochanowska, I. E., Frydecka, I., Kielbiński, M., Potoczek, S., & Bilińska, M. (2005). The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *53*(4), 336–341. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088318>
- Rombouts, C., Giraud, T., Jeanneau, C., & About, I. (2017). Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *Journal of Dental Research*, *96*(2), 137–144. <https://doi.org/10.1177/0022034516671688>

- Romo-Tena, J., Gómez-Martín, D., & Alcocer-Varela, J. (2013). CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmunity Reviews*, *12*(12), 1171–1176. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.07.002>
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: The neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology*, *7*(9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nri2155>
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., et al. (2006). Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*, *212*(3–4), 8–27. <https://doi.org/10.1080/08830180590934976>
- Souza, A. W. S. De, Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Cruvinel, W. D. M., Andrade, L. E. C., & Silva, N. P. Da. (2010). Sistema imunitário: parte II . O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Revista Brasileira de Reumatologia*, *50*(11), 665–679. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000600007>
- Tada, M., Inui, K., Sugioka, Y., Mamoto, K., Okano, T., & Koike, T. (2018). Abatacept might increase bone mineral density at femoral neck for patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: AIRTIGHT study. *Rheumatology International*, *38*(5), 777–784. <https://doi.org/10.1007/s00296-017-3922-z>
- Tanideh, N., Tavakoli, P., Saghiri, M. A., Garcia-Godoy, F., Amanat, D., Tadbir, A. A., Samani, S. M., & Tamadon, A. (2013). Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *115*(3), 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.08.450>
- Weisman, M. H., Durez, P., Hallegua, D., Aranda, R., Becker, J. C., Nuamah, I., Vratsanos, G., Zhou, Y., & Moreland, L. W. (2006). Reduction of inflammatory biomarker response by abatacept in treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, *33*(11), 2162–2166. <https://doi.org/06/13/101> [pii]
- Xu, Z., Lu, G., & Wu, F. (2009). Simvastatin suppresses homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells: Roles of caspase-3, cIAP-1 and cIAP-2. *Hypertension Research*, *32*(5), 375–380. <https://doi.org/10.1038/hr.2009.24>

CONCLUSÃO GERAL

O tratamento com abatacept retarda a neorformação óssea pós exodontia por meio de ativação da resposta Treg e inibição da osteoclastogênese via alteração do eixo RANK/RANKL/OPG e na polpa dentária o uso desse fármaco induziu redução do diâmetro dos vasos sanguíneos da polpa com consequente redução do número de vasos e da celularidade, aparentemente associada a redução de eNOS e aumento de caspase 3.

REFERÊNCIAS

- AKILESH, S. *et al.* Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 7, p. 4580-4588, 2007.
- BONELLI, M. *et al.* Abatacept (CTLA-4IG) treatment reduces the migratory capacity of monocytes in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 3, p. 599-607, 2013.
- BORVAK, J. *et al.* Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. **Int. Immunol.** v.10, p.1289–1298, 1998.
- CUNHA, A.C. Polpa dental: constituintes e respostas frente a agentes agressores. **Faculdade de odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais**, 2010.
- CUTOLO, M; NADLER, S. G. Advances in CTLA-4-Ig-mediated modulation of inflammatory cell and immune response activation in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 7, p. 758-767, 2013.
- ELSALHY, M.; AZIZIEH, F.; *et al.* Cytokines as diagnostic markers of pupal inflammation. **International Endodontic Journal**, v. 46, n.6, p. 573-580, 2012
- FELLNER, C. Biologics Will Pump Up the Vasculitis Market, **Pipeline Plus**, v.41, n.4, 2016.
- GOPALUNI, S. *et al.* Clinical Trials in Vasculitis. **Curr Treat Options in Rheum**, v. 2, p. 161-177, 2016.
- HAHN, C. L.; LIEWEHR, F. R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. **Journal of Endodontics**. v.33, n.6, p.643-651, 2007
- HOLT, M.H. *et al.* Medium-vessel vasculitis presenting as multiple leg ulcers after treatment with abatacept, **JAAD case reports**, v. 4, p.811-813, 2018.
- JONES, E. A. & WALDMANN, T. A. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. **J. Clin. Invest.** v.51, p. 2916–2927, 1972.
- KHORASANI, M. M. Y., HASSANSHAHI, G. *et al.* Role(s) of cytokines in pulpitis: Latest evidence and therapeutic approaches. **Cytokine**, v.126, p. 1-8, 2020
- KOSTER, M.J.; WARRINGTON, K.J. Giant cell arteritis: pathogenic mechanisms and new potential therapeutic targets, **BMC Rheumatology**, 2017.
- LEONARDI, D. P.; GIOVANINI, A. F.; ALMEIDA, S.; SCHRAMM, C. A.; BARATTO-FILHO, F. Alterações pulpares e periapicais/Pulp and periapical pathologies, **Revista Sul-Brasileira de Odontologia (RBSO)**, v. 8, n.4, 2011.
- LIU, M.; ZHAO, Y.; WANG, C.; *et al.* Interleukin-17 plays a role in pulp inflammation partly by WNT5A protein induction. **Archive of oral Biology**, v.103, p. 33-39, 2019

- MESQUITA, K. C. *et al.* Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats: Role of interleukin (IL)-1 β , -6 and -10 and CD8/CD30 cells: Influence of abatacept treatment on oral wound healing: Experimental model on rats. **Life Sciences**, v. 243, p. 117243, 2020.
- MORELAND, L.; BATE, G; KIRKPATRICK, P. Abatacept. **Nat Rev Drug Discov** 5, 185–186, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrd1989>
- PARK, S. H.; YE, L.; *et al.*, Inflammation of the dental pulp. **Mediators of inflammation**, v.2015, p. 1-2, 2015
- PAWLAK, E. *et al.* The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. **Arch Immunol The Exp**, v. 53, p. 336-341, 2005.
- PIEPER, J. *et al.* CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. **BMC Immunology**, v.14, n.34, 2013.
- PINTO, J.S., Alterações pulpare inflamatórias, **Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto FMDUP**, 2012.
- RAMIREZ, G. A. *et al.* Intravascular immunity as a key to systemic vasculitis: a work in progress, gaining momentum, **Clinical and Experimental Immunology**, p. 150-166, 2013.
- ROMO-TENA, J. *et al.* CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. **Autoimmunity reviews**, v.12, p. 1171-1176, 2013.
- ROOPENIAN, D. C.; AKILESH, S. FcRn: The neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 715–725, 2007.
- WEISMAN, M. H., *et al.* Reduction of Inflammatory Biomarker Response by Abatacept in Treatment of Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 33, n.11, 2006.
- XIONG, H.; WEI, L.; PENG, B. IL-17 stimulates the production of the inflammatory chemokines IL-6 and IL-8 in human dental pulp fibroblasts. **International Endodontic journal**, v.48, n.6, p.505-511, 2014
- ZHU, X. *et al.* MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. **J. Immunol.** v.166, p.3266–3276. 2001.

Anexos 1– Parecer da Comissão Ética no Uso de Animais

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Unichristus
Centro Universitário Christus

Of. No. 028/19

Protocolo da CEUA: 028/19

Pesquisador Responsável: Profa. KARINE CESTARO MESQUITA

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DO USO DE ABATACEPT NA REMODELAÇÃO ÓSSEA PÓS EXODONTIA EM RATOS.

*Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 26 (vinte e seis) de agosto de 2019.*

Descrição do animal utilizado:

<i>Espécie:</i>	Ratos machos	<i>Número Amostral:</i>	96
-----------------	--------------	-------------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 26/8/2020.

Fortaleza, 26 de agosto de 2019.

Anexo 2– Norma Archives of Oral Biology

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements



Preparation

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

Manuscript Structure

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

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

Results or Findings

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

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. **Conclusions** The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section. **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

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

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections:

(1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Keywords

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

Image manipulation

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

Illustration

services

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

Tables

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

Reference management software

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

Data visualization

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

Research data

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

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

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

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

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

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

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

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#). **Data statement**

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

Anexo 3 – norma internacional endodontic jornal

Content of Author Guidelines:

1. General
2. Ethical Guidelines
3. Manuscript Submission Procedure
4. Manuscript Types Accepted
5. Manuscript Format and Structure
6. Graphical Abstracts
7. After Acceptance

Useful Websites: Submission Site, Articles published in International Endodontic Journal, [Author Services](#), [Wiley's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

The International Endodontic Journal publishes original scientific articles, systematic and narrative reviews, clinical articles and case reports in the field of Endodontology; the branch of dental sciences dealing with health, injuries to and diseases of the pulp and periradicular region, and their relationship with systemic health and well-being. Original scientific articles and reviews are published in the areas of biomedical science, applied materials science, bioengineering, epidemiology and social science relevant to endodontic disease and its management, and the restoration of endodontically treated teeth. In addition, letters to the editor, book reviews, summaries and abstracts of scientific meetings, news items and significant obituaries and retirements are accepted subject to the approval of the Editor-in-Chief.

1.1 Preprints Policy

The International Endodontic Journal will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

1.2. Data Sharing

The International Endodontic Journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper. All accepted manuscripts may elect to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Sample statements are available [here](#). If published, statements will be placed in the heading of your manuscript.

2. ETHICAL GUIDELINES

The International Endodontic Journal adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1 Authorship and Acknowledgements

The policy of the journal is that only ONE corresponding author is accepted.

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

The International Endodontic Journal adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on:

1. substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and
3. final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Please find more information on the conflict of interest form in section 2.6.

Funding: Please specify all sources of funding for the study.

Conflict of interest: Please specify all potential conflicts of interest.

Please find more information on the conflict of interest form in section 2.5.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts must be submitted electronically via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/iej>.

The use of the online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from iejeditor@cardiff.ac.uk.

3.1 ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the International Endodontic Journal encourages authors to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. Please see Wiley's resources on ORCID [here](#)

3.2. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission. However, only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the abstract, main text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures or Title page. The Title page should be uploaded as a separate file. On a separate page after the references, please reference figures as 'Figure 1', 'Figure 2' etc. to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded and provide a brief legend that described the image but does not repeat information that should be in the main body of the text. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.5. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Scientific Articles (includes Clinical Research (randomized control trials, cohort studies, case control studies, cross sectional studies, case series), Basic Research – Biological, Basic Research – Technical, and Education):

These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the

observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original Scientific Articles must conform to the highest international standards in the field.

Review Articles (systematic and narrative):

These are accepted for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should generally include a clearly defined search strategy and take a broad view of the field rather than merely summarizing the literature. Extensive or unbalanced citation of the authors' own publications is not acceptable.

Clinical Techniques:

These can describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognised clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Case Reports:

These can illustrate unusual and clinically relevant and new observations, but they must be of sufficiently high quality to be considered worthy of publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered. Illustrative material must be of the highest quality and healing outcomes, if appropriate, should be demonstrated after an extended period – normally four years.

Supporting Information:

The International Endodontic Journal encourages submission of adjuncts to printed papers via the supporting information website (see submission of supporting information below). Authors wishing to describe novel procedures or illustrate cases more fully with figures and/or video may be encouraged to utilise this facility.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. It is preferred that manuscript is professionally edited.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their research findings or clinical reports so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable. Abbreviations should also be kept to a minimum, particularly those that are not standard. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Article Preparation Support: **Wiley Editing Services** offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence. Also, check out our resources for **Preparing Your Article** for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Abbreviations: The International Endodontic Journal adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. When non-standard terms appearing 3 or more times in the manuscript are to be abbreviated, they should be written out completely in the text when first used with the abbreviation in parenthesis.

5.2. Reporting guidelines

5.2.5. Animal studies

Animal studies should be written using the Preferred Reporting Items for Animal Studies in Endodontology (PRIASE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al. 2021, doi: 10.1111/iej.13477).

When submitting manuscripts that have been written using the PRIASE 2021 guidelines, authors should include the following statement in the beginning of “Materials and Methods” section: “The manuscript of this animal study has been written according to Preferred Reporting Items for Animal studies in Endodontology (PRIASE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al. 2021, doi: 10.1111/iej.13477).

A PRIASE 2021 checklist (for editors/referees) and flowchart (as a Figure to be included in the manuscript for readers) should also be completed and included in the submission material. The PRIASE 2021 checklist and flowchart can be downloaded from: <http://pride-endodonticguidelines.org/priase/>

It is recommended that authors consult the following papers when writing manuscripts, which explain the rationale for the PRIASE 2021 guidelines and their importance:

Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JA, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Camilleri J, RM S, Dummer PMH (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *International Endodontic Journal* **54**, 848-57. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.13477>)

Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JA, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Jakovljevic A, Dummer PMH (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: Explanation and Elaboration. *International Endodontic Journal* **54**, 858-86. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.13481>)

5.3. Structure

All manuscripts submitted to *International Endodontic Journal* should include Title Page, Abstract, Main Text, References and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

All manuscripts submitted to the *International Endodontic Journal* should include Title Page (separate file), Abstract, Main Text, References, Acknowledgements, Funding, Conflict of Interest, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

Title Page: The title page should bear: (i) Title, which should be concise as well as descriptive; (ii) Initial(s) and last (family) name of each author; (iii) Name and address of department, hospital or institution to which work should be attributed (excluding street names and postal codes); (iv) Running title (no more than 30 letters and spaces); (v) No more than six keywords (in alphabetical order); (vi) Name, full postal address, telephone, fax number and e-mail address of the author responsible for correspondence.

Abstract for Original Scientific Articles (includes Clinical Research (randomized control trials, cohort studies, case control studies, cross sectional studies, case series), Basic Research – Biological, Basic Research - Technical and Education) should be no more than 350 words giving details of what was done using the following structure:

- **Aim:** Give a clear statement of the main aim of the study and the main hypothesis tested, if any.
- **Methodology:** Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and statistical tests.
- **Results:** Give the main results of the study, including the outcome of any statistical analysis.
- **Conclusions:** State the primary conclusions of the study and their implications. Suggest areas for further research, if appropriate.
- **Funding:** Provide the primary source of funding with grant number for the study (if no funding: say ‘none’).
- **Conflict of interest:** Specify potential conflicts of interest for all authors. If no conflict exists, the authors must explicitly state so.

Abstract for Systematic Review Articles should be no more than 350 words using the following structure where applicable:

- **Title:** Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.
- **Background:** Provide a brief introduction of the subject and why it is important.

- **Objectives:** The research question including components such as participants, interventions, comparators, and outcomes. Use PICO format.
- **Methods:** Briefly describe i) the inclusion criteria, ii) provide databases searched and dates, iii) mention the method used to assess study quality (risk of bias) iv) meta-analysis methodology (if appropriate).
- **Results:** i) Number and type of included studies and participants ii) results for main outcomes (benefits and harms). If a meta-analysis was undertaken, include summary measures and confidence intervals. iii) direction of the effect in terms that are meaningful to clinicians and patients.
- **Discussion:** i) Strengths and ii) limitations of evidence.
- **Conclusions:** General interpretation of the results and important implications.
- **Funding:** Primary source of funding for the review (if no funding: say 'none').
- **Registration:** Registration number and name.

Abstract for Review Articles (narrative)

The Abstract should be unstructured and no more than 350 words.

Abstract for Clinical Techniques and Case Reports should be no more than 350 words using the following structure:

- **Aim:** Give a clear statement of the main aim of the report and the clinical problem which is addressed.
- **Summary:** Describe briefly the clinical technique(s) or the case report(s).
- **Key learning points:** Provide up to 5 short, bullet-pointed statements to highlight the key messages of the report. All points must be fully justified by material presented in the report.

Main Text of Original Scientific Article should include Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion:

- **Introduction:** should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and gaps in knowledge. Exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation, or hypothesis to be tested.
- **Material and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced.

Experimental Subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association **Declaration of Helsinki** (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (product: company, town/city, state, country) included.

- **Results:** should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Data should not be duplicated in Tables and Figures.
- **Discussion:** may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The Discussion section should progress with a critical review of the methodology before discussing the results in light of previous work in the field. The Discussion should include the strengths and limitations of the work and should end with a brief summary and a comment on the potential clinical relevance of the findings, if any. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

- **Conclusion:** should contain a summary of the findings.

Main Text of Systematic Review Articles should be divided into Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusions, Funding and Conflict of Interest:

- **Introduction:** Should be focused to place the subject matter in context and to justify the need for the review.
- **Method:** Divide into logical sub-sections in order to improve readability and enhance understanding (e.g. details of protocol registration, literature search process, inclusion/exclusion criteria, data extraction, quality assessment, outcome(s) of interest, data synthesis and statistical analysis, quality of evidence).
- **Results:** Present in structured fashion (e.g. results of the search process, characteristics of the included studies, results of primary meta-analysis, additional analysis, publication bias, quality of evidence).
- **Discussion:** Should summarize the results, highlighting completeness and applicability of evidence, quality of evidence, agreements and disagreements with other studies or reviews, strength and limitations, implications for practice and research.
- **Conclusion(s):** Section should reach clear conclusions and/or recommendations on the basis of the evidence presented.
- **Funding:** Provide the primary source of funding with grant number for the study (if no funding: say 'none').
- **Conflict of Interest:** Need to specify potential conflicts of interest for all the authors. If no conflict exists, the authors must explicitly state so.

Main Text of Review Articles should be divided into Introduction, Review and Conclusions. The Introduction section should be focused to place the subject matter in context and to justify the need for the review. The Review section should be divided into logical sub-sections in order to improve readability and enhance understanding. Search strategies must be described and the use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. The use of tabulated and illustrative material is encouraged. The Conclusion section should reach clear conclusions and/or recommendations on the basis of the evidence presented.

Main Text of Clinical Techniques and Case Reports should be divided into Introduction, Report, Discussion and Conclusion. They should be well illustrated with clinical images, radiographs, diagrams and, where appropriate, supporting tables and graphs. However, all illustrations must be of the highest quality.

Acknowledgments: Acknowledgments should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. See also above under Ethical Guidelines.

Funding: The International Endodontic Journal requires that all sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged. Grant or contribution numbers may be acknowledged, and principal grant holders should be listed.

Conflict of Interest: Any potential conflicts of interest must be noted.

5.4. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. The EndNote reference style can be obtained upon request to the editorial office (iejeditor@cardiff.ac.uk). Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

In the text: single or double authors should be acknowledged together with the year of publication, e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990). If more than two authors the first author followed by et al. is sufficient, e.g. (Tobias et al. 1991).

If more than 1 paper is cited the references should be in year order and separated by ", " e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990, Tobias et al. 1991).

Reference list: All references should be brought together at the end of the paper in alphabetical order and should be in the following form.

- (i) Names and initials of up to six authors. When there are seven or more, list the first three and add et al.
- (ii) Year of publication in parentheses
- (iii) Full title of paper followed by a full stop (.)
- (iv) Title of journal in full (in italics)
- (v) Volume number (bold) followed by a comma (,)
- (vi) First and last pages

Examples of correct forms of reference follow:

Standard journal article

Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M (1991) Class II antigen-expressing cells in experimentally induced pulpitis. *International Endodontic Journal* **24**, 8-14.

Corporate author

British Endodontic Society (1983) Guidelines for root canal treatment. *International Endodontic Journal* **16**, 192-5.

Journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M (1979) Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood* **54** (Suppl. 1), 26a.

Books and other monographs

Personal author(s)

Gutmann J, Harrison JW (1991) *Surgical Endodontics*, 1st edn Boston, MA, USA: Blackwell Scientific Publications.

Chapter in a book

Wesselink P (1990) Conventional root-canal therapy III: root filling. In: Harty FJ, ed. *Endodontics in Clinical Practice*, 3rd edn; pp. 186-223. London, UK: Butterworth.

Published proceedings paper

DuPont B (1974) Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of the Third Annual Meeting of the International Society for Experimental Rematology*; pp. 44-46. Houston, TX, USA: International Society for Experimental Hematology.

Agency publication

Ranofsky AL (1978) *Surgical Operations in Short-Stay Hospitals: United States-1975*. DHEW publication no. (PHS) 78-1785 (Vital and Health Statistics; Series 13; no. 34.) Hyattsville, MD, USA: National Centre for Health Statistics.8

Dissertation or thesis

Saunders EM (1988) *In vitro and in vivo investigations into root-canal obturation using thermally softened gutta-percha techniques (PhD Thesis)*. Dundee, UK: University of Dundee.

URLs

Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Smith A (1999) Select committee report into social care in the community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report015285.html> [accessed on 7 November 2003]

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction, symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by a thin space (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Figure legends: Figure legends should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

Permissions: If all or part of previously published illustrations are to be used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. This is the responsibility of the authors before submission.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/echecklist.asp>

5.6. Guidelines for reporting of DNA microarray data

The International Endodontic Journal gives authors notice that, with effect from 1st January 2011, submission to

the International Endodontic Journal requires the reporting of microarray data to conform to the MIAME guidelines. After this date, submissions will be assessed according to MIAME standards. The complete current guidelines are available at http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_2.0.html. Also, manuscripts will be published only after the complete data has been submitted into the public repositories, such as GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or ArrayExpress (http://www.ebi.ac.uk/microarray/submissions_overview.html), in MIAME compliant format, with the data accession number (the identification number of the data set in the database) quoted in the manuscript. Both databases are committed to keeping the data private until the associated manuscript is published, if requested.

Prospective authors are also encouraged to search for previously published microarray data with relevance to their own data, and to report whether such data exists. Furthermore, they are encouraged to use the previously published data for qualitative and/or quantitative comparison with their own data, whenever suitable. To fully acknowledge the original work, an appropriate reference should be given not only to the database in question, but also to the original article in which the data was first published. This open approach will increase the availability and use of these large-scale data sets and improve the reporting and interpretation of the findings, and in increasing the comprehensive understanding of the physiology and pathology of endodontically related tissues and diseases, result eventually in better patient care.

6. GRAPHICAL ABSTRACT

Authors are invited to submit a graphical abstract along with their manuscript to be published in the International Endodontic Journal's:

- Online table of contents.
- Content alert emails.
- Within the article.

The graphical abstract should visually convey the key findings of the report and present a clear message to the reader. It should be used as a means of attracting the readers' attention and promoting further engagement with the article.

To create an effective graphical abstract, authors should focus on presenting to the reader what they can learn from the report, communicating only the key message.

Guidelines for designing a Graphical Abstract:

1. Creating a graphical abstract does **not** mean just copying and pasting a figure from the manuscript.
2. Use text sparingly, so the graphical abstract does not become cluttered, but ensure that you have clearly stated the purpose of the report, research design, clinical case and the outcome of the study or case. Use language consistent with terms and definitions in the article that are free of editorialization (personal opinion) or bias.
3. Use only images that you have a legal right to use. Authors are responsible for obtaining permission to use any images that they include from outside sources, including articles, web pages, stock photo sites or Google image searches. Any needed permissions must be submitted along with your graphical abstract or identified in the Acknowledgements section of your manuscript.
4. Exclude imagery that can be viewed as advertisement, such as trade names, logos, or images of trademarked items.
5. The Graphical Abstract should be submitted along with the manuscript through our ScholarOne platform and uploaded with the file designation "Graphical Abstract".
6. Required file properties:
 - Resolution: 700 pixels (width) x 600 pixels (height).
 - Font size: at least 12pt.
 - Font: Calibri.
 - File size should not exceed 1MB.
7. A good example of how a graphical abstract should look can be seen here: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.13141>

Please contact the editorial office at IEJeditor@cardiff.ac.uk if you have any questions.

7. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

7.1 Wiley Author Services

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with **Wiley Author Services**. You will be asked to sign a publication license at this point as well as pay for any applicable APCs.

7.2 Copyright & Licensing

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License. Standard **re-use and licensing rights** vary by journal. Note that **certain funders** mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND **Creative Commons License**.

Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for **self-archiving** of different versions of the article under specific conditions.

7.3 Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. Manuscripts accepted 'in press' are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting and appear in PDF format only. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. The final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

7.4 Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online/with their proofs included as a pdf. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email.

7.5 Early View

Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

7.6 Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

7.7 Wiley's Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

7.8 Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore

sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: [Sheridan Printer](#). If you have queries about offprints please email [Customer Service](#).

7.9 Author Services

For more substantial information on the services provided for authors, please see [Wiley Author Services](#)

- [Submit an Article](#)
- [Get content alerts](#)
- [Subscribe to this journal](#)