



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

MARIA IMACULADA DE QUEIROZ RODRIGUES

ALOGLIPTINA RETARDA A CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS
ORAIS EM MUCOSA JUGAL DE RATOS WISTAR

FORTALEZA
2022

MARIA IMACULADA DE QUEIROZ RODRIGUES

ALOGLIPTINA RETARDA A CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS ORAIS
EM MUCOSA JUGAL DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica;
Área temática: Estomatopatologia.

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

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

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)

R614a Rodrigues, Maria Imaculada de Queiroz.
Alogliptina retarda a cicatrização de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos wistar / Maria Imaculada de Queiroz Rodrigues. – 2022.
65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Úlceras orais. 2. Cicatrização. 3. Receptor 4 toll-like. 4. Inibidores da dipeptidil peptidase IV. I. Título.
CDD 617.6

MARIA IMACULADA DE QUEIROZ RODRIGUES

ALOGLIPTINA RETARDA A CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS ORAIS
EM MUCOSA JUGAL DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica;
Área temática: Estomatopatologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior
Centro Universitário Christus (Unichristus)

A Deus.

Aos meus pais, Maria Concebida e Edi.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, instituição em que tive a honra de me graduar, e pude retornar para a realização do mestrado acadêmico em Clínica Odontológica, na pessoa do magnífico reitor, Prof. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque.

À **Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da UFC**, na pessoa de sua diretora, Profa. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (PPGO)**, na pessoa da coordenadora, Profa. Cristiane Sá Roriz Fonteles. É um grande privilégio ser aluna de Mestrado do PPGO, e agradeço a todos que compõem o programa e contribuíram para a execução desta pesquisa.

Ao **Laboratório de Patologia Bucal (LPB-UFC)**, ao **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM-UFC)**, ao Biotério Setorial do **Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF-UFC)** e ao **Laboratório Morfofuncional do curso de Medicina da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)**, pelo apoio físico-estrutural para o desenvolvimento desse estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, que me deu forças e possibilitou a concretização desse sonho. Sem Ele, nada é possível.

Aos meus pais, **Maria Concebida de Queiroz Rodrigues e Edi Pereira Rodrigues**, e meu irmão, **Carlos Cesar Queiroz Rodrigues**, pelo amor e apoio incondicional e por abraçarem meus sonhos, sem nunca julgar. Por confiarem em mim e me permitirem alçar voos que até mesmo eu duvidava que seria capaz. Todas as vitórias conquistadas até hoje não são apenas minhas, são nossas.

A minha querida professora e orientadora, **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, por toda dedicação, paciência, cuidado e confiança. Ser sua aluna desde a graduação é uma honra e um privilégio. A senhora ensina pelo exemplo. Exemplo de profissional, pesquisadora, professora e mulher. Sua orientação influenciou de forma determinante na minha formação profissional e pessoal. Sua dedicação à pesquisa e à docência nos faz querer dar sempre o nosso melhor. Tenho absoluta certeza que sou uma profissional melhor por ter sido guiada pelos seus ensinamentos.

Ao querido professor **Paulo Goberlânio de Barros Silva**, pela paciência e ajuda ao longo de toda a realização desse trabalho. O senhor é exemplo de humildade e generosidade. Agradeço por todas as orientações e contribuições para que esse trabalho pudesse ser realizado. Sua confiança em mim e nesta pesquisa foram fundamentais para que este trabalho fosse concretizado.

Ao professor **Mário Rogério Lima Mota** por todos os ensinamentos e orientações desde a época de iniciação científica até aqui. O senhor é exemplo de sabedoria e conhecimento.

Ao professor **Fabício Bitu Sousa** pelo exemplo de profissionalismo. Agradeço por todas as orientações, desde a graduação, nas clínicas de estomatologia e do Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE).

Aos integrantes do **Laboratório de Patologia Bucal**, em especial às minhas amigas **Joyce Ohana de Lima Martins, Maria Elisa Quezado Lima Verde, Isabelly Vidal do Nascimento, Milena Oliveira Freitas e Dayrine Silveira de Paula**, pelo companheirismo e parceria. A convivência com vocês tornou a rotina mais leve. Agradeço também pela ajuda em

todas as etapas dessa pesquisa. Nossa parceria vai para além dos muros da universidade e sou muito grata por isso.

Aos demais amigos e colegas, contemporâneos da pós-graduação e integrantes do Laboratório de Patologia Bucal, pela amizade, troca de conhecimentos, conversas e imenso apoio. Entre os quais, destaco, **Cássia Emanuella Nóbrega Malta, Pedro Henrique Chaves Isaias, José Ronildo Lins do Carmo Filho, João Eudes Teixeira Pinho Filho, Liova Amaru Chabot Díaz, Osias Vieira de Oliveira Filho, Sthefane Gomes Feitosa, Iury da Silva Ximenes, Guilherme Costa Soares, José Vitor Mota Lemos, Karine Cestaro Mesquita e Thinali Sousa Dantas.**

Aos alunos e colegas de iniciação científica, por todo apoio durante as etapas de realização desse trabalho e pelo companheirismo desde o tempo em que eu também fazia parte desse time. Em especial, **Manuela da Silva Moreira, Marta Maria Castro Honório, Francisco Dênis Araújo da Silva e Mariana Dantas do Nascimento**, os quais tenho o privilégio de chamar também de amigos.

Às minhas colegas de turma de graduação e de turma de mestrado, **Adília Mirela Pereira Lima Cid e Cibele Sales Rabelo**, pelo amor, carinho e companheirismo. Nossa amizade é um presente lindo que eu levarei por toda a vida.

Às colegas de pós-graduação, **Weslanny de Andrade Moraes, Sussan Daniela Salazar Segales e Matheus Vieira Nascimento**, por todo o apoio e ajuda nas etapas de análise microbiológica desta pesquisa. Vocês são exemplos de generosidade e bondade.

Ao técnico do Laboratório de Patologia Bucal, **Alceu Machado de Sousa**, pela ajuda nas etapas laboratoriais desse trabalho. Obrigada por todas as dicas e ensinamentos em colorações e técnicas laboratoriais.

A todos os funcionários da UFC, por zelarem e cuidarem da nossa instituição, permitindo que todas as atividades realizadas sejam possíveis. Em especial, ao **Rui Lino**.

Aos demais **professores do curso de Odontologia da UFC**. Agradeço por todos os ensinamentos e pela honra de ter sido aluna de cada um deles.

À minha grande amiga, **Jeciana Campelo Denério**, por todo o apoio e cuidado. Sua amizade foi fundamental durante esse período do mestrado.

RESUMO

A cicatrização de úlceras orais é um processo complexo e fatores como a infecção microbiana podem interferir significativamente. A alogliptina é um hipoglicemiante oral utilizado no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, porém esse fármaco inibe a ativação de vias de um importante receptor da resposta imune inata, o Receptor *Toll-Like* 4 (TLR4), fundamental no reconhecimento de bactérias gram-negativas. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do tratamento com Alogliptina no processo de cicatrização de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos Wistar. Foram utilizados quatro grupos experimentais: grupo controle (GC) tratado com solução salina 0,1ml/kg/dia e três grupos testes tratados com Alogliptina 1 (GTA1), 3 (GTA3) e 9mg/kg/dia (GTA9) por via oral. A úlcera foi induzida utilizando um *punch* dermatológico e os animais foram eutanasiados nos dias 1, 3, 7 e 14 pós ulceração. Nestes dias foram mensurados o diâmetro da úlcera, a variação ponderal e de índice glicêmico e foi coletado swab superficial da úlcera para plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Além disso, foi realizada avaliação dos escores de Grimace para análise de desconforto ao longo desse período. Foram confeccionadas lâminas coradas em Hematoxilina & Eosina para análises microscópicas (escores de cicatrização) e histomorfométrica (contagem de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares), bem como lâminas coradas por Tricrômio de Masson e *Picrosirius Red* para análise histoquímica (deposição de colágeno) e análise imuno-histoquímica para TLR4, TLR2, Fator de Crescimento Transformador (TGF)- β e CD31. Os testes ANOVA-2-way/Bonferroni e Kruskal-Wallis/Dunn foram utilizados para análise estatística (GraphPad Prism 5.0®, $p < 0,05$). O tratamento com Alogliptina aumentou a área ($p < 0,001$) e a quantidade de UFC na superfície da úlcera ($p = 0,049$), enquanto reduziu o ganho de massa corpórea dos animais ($p = 0,007$) nos grupos GTA3 e GTA9. Houve aumento dos escores de Grimace e do desconforto global ao longo do período de avaliação nos grupos tratados com as maiores doses Alogliptina ($p = 0,02$). Na análise microscópica, foi observado aumento dos escores histológicos ($p = 0,039$) e de células mononucleares ($p = 0,006$), além de redução da contagem de polimorfonucleares ($p < 0,05$) e na deposição de colágeno ($p = 0,031$) no grupo GTA9. Além disso, observaram-se menor expressão de TLR4 ($p = 0,001$) e TGF- β ($p < 0,001$), além do aumento da imunoexpressão para CD31 ($p < 0,001$) nos grupos nos grupos de maior dose, bem como menor expressão de TLR2 ($p = 0,001$) no grupo de maior dose. Conclui-se que o tratamento com Alogliptina está associado ao retardo da cicatrização de úlceras orais, provavelmente devido menor expressão dos receptores TLR4 e TLR2 e,

consequentemente, aumento da densidade microbiológica na superfície da úlcera. Observou-se prejuízo do processo cicatricial com permanência do processo inflamatório e diminuição da expressão de TGF- β associada a menor deposição de colágeno.

Palavras-chave: úlceras orais; cicatrização; receptor 4 toll-like; inibidores da dipeptidil peptidase IV.

ABSTRACT

The healing of oral ulcers is a complex process and factors such as microbial infection can significantly interfere. Alogliptin is an oral hypoglycemic agent used in the treatment of type 2 diabetes mellitus, but this drug inhibits the activation of pathways of an important innate immune response receptor, the Toll-Like Receptor 4 (TLR4), which is fundamental in the recognition of gram-negative bacteria. The objective of this study was to evaluate the influence of Alogliptin treatment on the healing process of traumatic oral ulcers in the buccal mucosa of Wistar rats. Four experimental groups were used: control group (CG) treated with saline solution 0.1ml/kg/day and three test groups treated with Alogliptin 1 (GTA1), 3 (GTA3) and 9mg/kg/day (GTA9) orally. The ulcer was induced using a dermatological punch and the animals were euthanized on days 1, 3, 7 and 14 post ulceration. On these days, the ulcer diameter, weight variation and glycemic index were measured and superficial ulcer swab was collected for plating and colony forming units (CFU) count. In addition, an evaluation of Grimace scores was performed to analyze discomfort throughout this period. Slides stained with Hematoxylin & Eosin were prepared for microscopic analysis (healing scores) and histomorphometric (counting of polymorphonuclear and mononuclear inflammatory cells), as well as slides stained with Masson's Trichrome and Picrosirius Red for histochemical analysis (collagen deposition) and immunological analysis. -histochemistry for TLR4, TLR2, Transforming Growth Factor (TGF)- β and CD31. ANOVA-2-way/Bonferroni and Kruskal-Wallis/Dunn tests were used for statistical analysis (GraphPad Prism 5.0®, $p < 0.05$). Alogliptin treatment increased the area ($p < 0.001$) and the amount of CFU on the ulcer surface ($p = 0.049$), while reducing the animals' body mass gain ($p = 0.007$) in the GTA3 and GTA9 groups. There was an increase in Grimace scores and global discomfort throughout the evaluation period in the groups treated with the highest Alogliptin doses ($p = 0.02$). In the microscopic analysis, an increase in histological scores ($p = 0.039$) and in mononuclear cells ($p = 0.006$) was observed, in addition to a reduction in the polymorphonuclear count ($p < 0.05$) and in collagen deposition ($p = 0.031$) in the GTA9 group. In addition, lower expression of TLR4 ($p = 0.001$) and TGF- β ($p < 0.001$) were observed, in addition to increased immunoexpression for CD31 ($p < 0.001$) in the groups in the higher dose groups, as well as lower expression of TLR2 ($p = 0.001$) in the higher dose group. It is concluded that treatment with Alogliptin is associated with delayed healing of oral ulcers, probably due to lower expression of TLR4 and TLR2 receptors and, consequently, increased microbiological density on the ulcer surface. Impairment of the healing

process was observed, with permanence of the inflammatory process and decreased expression of TGF- β associated with less collagen deposition.

Keywords: oral ulcer; wound healing; toll-like receptor 4; dipeptidyl-peptidase IV inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ativação do TLR4 através das vias dependente e independente de MyD88.....	24
Figura 2 – Ativação do TLR4 através da via dependente de MyD88.....	25
Figura 3 – Ativação do TLR4 através da via independente de MyD88.....	26
Figura 4 – Área sob a curva em relação a análise de desconforto de acordo com a Escala de Grimace em ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	42
Figura 5 – Perfil microscópico de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	43
Figura 6 – Perfil de colagênese de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	47
Figura 7 – Perfil de colagênese de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	47
Figura 8 – Imunoexpressão para TLR4 em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	48
Figura 9 – Imunoexpressão para TLR2 em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	49
Figura 10 – Imunoexpressão para TGF- β em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	50
Figura 11 – Imunoexpressão para CD31 em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupos experimentais e dias de eutanásia.....	33
Tabela 2 – Especificação dos clones, fabricante, controle positivo e alvos dos anticorpos primários.....	37
Tabela 3 – Perfil de cicatrização clínica da úlcera, variação de massa corpórea e contagem microbiológica da superfície da úlcera em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	40
Tabela 4 – Análise de desconforto de acordo com a Escala de Grimace em ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	41
Tabela 5 – Escores histológicos, análise histomorfométrica e porcentagem da área de deposição de colágeno em úlcera induzida em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA-2-way	Análise de Variância 2 Fatores
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Proteína Ativadora
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting In Vivo Experiments</i>
AUC	Área Sob a Curva
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD14	Agrupamento de Diferenciação 14
CD31	Agrupamento de Diferenciação 31
C _{máx}	Concentração Máxima
CYP	Citocromo P450
DAB	Diaminobenzidina
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DFE	Departamento de Fisiologia e Farmacologia
DM	Diabetes Mellitus
DPP-4	Dipeptidil peptidase-4
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPM	Erro Padrão da Média
ERK	Quinases Reguladas por Sinal Extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FFOE	Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GC	Grupo Controle
GIP	Polipeptídeo Insulínico Dependente de Glicose
GLP-1	Peptídeo Tipo Glucagon 1
GTA	Grupo Teste Tratado com Alogliptina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IFN- β	Interferon beta
IKK	Complexo I κ B Quinase
IL	Interleucina

IP	Intraperitoneal
IRAK	Quinases Associadas a IL-1R
IRF3	Fator Regulador de IFN 3
JNK	c-Jun N-terminal Quinase
LBP	Proteína de Ligação ao LPS
LPB	Laboratório de Patologia Bucal
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições Ricas em Leucinas
MAL	Proteína Tipo Adaptador MyD88
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MD2	Diferenciação Mieloide 2
MEC	Matriz Extracelular
MI	Alogliptina N-Desmetilada
MII	Alogliptina N-Acetilada
MyD88	Diferenciação Mieloide 88
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PMN	Polimorfonucleares
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
RGB	<i>Red, Green, Blue</i>
TAB	Proteínas de Ligação a TAK1
TAK1	Quinase Ativada por TGF 1
TBK	Quinase 1 de Ligação TANK
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador beta
TIR	Domínio Receptor Toll/IL-1
TLR	Receptores <i>Toll-Like</i>
TMA	Tissue Microarray

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRAF6	Fator 6 Associado ao Receptor de TNF
TRAM	Molécula Adaptadora Relacionada ao TRIF
TRIF	Adaptador Indutor de IFN- β Contendo Domínio TIR
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
VCAM-1	Molécula de Adesão a Células Vasculares-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Processo de cicatrização	22
2.2 Receptores <i>Toll-Like 4</i>	23
2.3 Alogliptina	27
3 JUSTIFICATIVA	29
4 HIPÓTESES	30
4.1 Hipótese nula	30
4.2 Hipótese alternativa	30
5 OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo geral	31
5.2 Objetivos específicos	31
6 METODOLOGIA	32
6.1 Aspectos éticos	32
6.2 Animais e cálculo amostral	32
6.3 Grupos experimentais e protocolo de indução da úlcera	32
6.4 Análise de desconforto	33
6.5 Mensuração do diâmetro das lesões, variação percentual de massa corpórea e índice glicêmico	34
6.6 Análise microbiológica da superfície da úlcera	34
6.7 Análise histológica	35
6.8 Análise histomorfométrica: avaliação do infiltrado inflamatório	35
6.9 Análise histoquímica: avaliação da colagênese	36
6.10 Análise por imunohistoquímica utilizando a Técnica de Microarranjos Teciduais (TMA - <i>tissue microarray</i>)	37
6.11 Análise estatística	38
7 RESULTADOS	39
8 DISCUSSÃO	51
9 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	64

1 INTRODUÇÃO

Úlceras orais são uma condição comum, alvo frequente de queixa dos pacientes, que causam dor e desconforto. Essas lesões são caracterizadas por uma descontinuidade da superfície epitelial, recobertas por uma membrana fibrinopurulenta e com periferia eritematosa (SCHEMEL-SUÁREZ; LÓPEZ-LÓPEZ; CHIMENOS-KÜSTNER, 2015). As principais causas dessa alteração são traumas, sendo então chamadas de úlceras traumáticas. Estas acometem, geralmente, superfícies não queratinizadas da cavidade oral como mucosa do lábio e mucosa jugal (CAVALCANTE *et al.*, 2011). Úlceras traumáticas orais podem ser causadas por uma interferência mecânica, química, elétrica ou térmica. As causas mecânicas podem estar associadas a mordedura da mucosa, dentes com bordas cortantes, uso de próteses mal adaptadas, entre outros. Os aspectos químicos estão associados à exposição da cavidade oral a substâncias ácidas ou básicas. Úlceras por causas térmicas estão associadas à ingestão de líquidos ou alimentos muito quentes, e úlceras por queimaduras elétricas são mais raras, acometendo geralmente crianças (BASCONES-MARTÍNEZ; FIGUERO-RUIZ; ESPARZA-GÓMEZ, 2005).

Essa lesão oral geralmente tem resolução espontânea, e o processo cicatricial varia de 10 a 14 dias e não deixa cicatrizes. O curso clínico das úlceras traumáticas orais está dividido em 4 etapas. Nas primeiras 24 horas há sintomatologia dolorosa e a mucosa afetada adquire um aspecto rugoso. Em seguida, a lesão passa para um estágio pré-ulcerativo, onde a região fica eritematosa. No terceiro estágio, há a formação da ulceração propriamente dita e diminuição da dor e, por fim, a lesão entra no estágio cicatricial (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

A cicatrização de feridas como as úlceras orais é um processo complexo, e está presente em todos os tecidos do corpo humano. Esse processo geralmente é semelhante nos diversos tecidos, e envolve a integração de quatro etapas fundamentais: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tecidual. A correta progressão dessas etapas, contudo, pode ser afetada por alguns fatores, que levam à uma cicatrização tardia. Um dos principais e mais preocupantes fatores é a infecção microbiana, que pode ocorrer secundariamente sobre as úlceras. Há evidências de que os microrganismos colonizam a superfície das feridas e formam comunidades, os chamados biofilmes (PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015). Uma vez estabelecida a injúria ao tecido e exposição ao meio externo, no caso da cavidade oral, ao meio bucal, há a exposição da ferida aos diversos microrganismos presentes no tecido. Quando há uma resposta insuficiente do hospedeiro, esses microrganismos podem adentrar o sítio da ferida, multiplicarem-se e estabelecerem o quadro infeccioso, e nesse processo há uma

exacerbação e prolongamento da inflamação, com produção extensa de citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina (IL)-1 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , o que leva a um consequente retardo do processo cicatricial (GUO; DIPIETRO, 2010; OLIVEIRA; DIAS, 2012; PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015).

A ativação do processo inflamatório pela presença de microrganismos ocorre devido a presença de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR), presentes nas superfícies das células como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Um dos principais PRR são os Receptores *Toll-Like* (TLR), responsáveis por reconhecer os chamados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (FERRAZ *et al.*, 2011; STRBO; YIN; STOJADINOVIC, 2014). A ativação dos TLR é um dos primeiros mecanismos de defesa do organismo para estabelecimento da resposta imune inata. Esse processo é crucial para o combate aos patógenos e restabelecimento da integridade e função dos tecidos (FERRAZ *et al.*, 2011; MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016). Através da interação PRR-PAMP, são gerados sinais para a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias (FERRAZ *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2018).

O TLR4 é um dos principais PRR e é reconhecido como receptor da endotoxina bacteriana Lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram-negativas, e de moléculas endógenas liberadas durante distúrbios inflamatórios ou infecciosos (FERRAZ *et al.*, 2011; NEAL *et al.*, 2013).

Estima-se que existam mais 750 espécies bacterianas presentes na cavidade oral, colonizando os variados sítios orais. A composição da microbiota oral é diferente para cada indivíduo, entretanto, existem alguns gêneros bacterianos de maior prevalência em uma boca saudável. Dentre essas bactérias citam-se as gram-positivas *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, e *Propionibacterium*, e as gram-negativas, que constituem uma maior diversidade de microrganismos: *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilis*, *Capnocytophaga*, *Eikenella* e *Leptotrichia*. Quando em equilíbrio, esses microrganismos vivem em estado de simbiose com seu hospedeiro, porém, quando há mudança no microambiente, um processo infeccioso pode ser instalado. Por exemplo, a *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria oportunista gram-negativa, está presente na cavidade oral saudável, mas que em condições específicas, está diretamente associada a doenças, como a doença periodontal (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009; GERMANO *et al.*, 2018).

Apesar da microbiota oral de animais de laboratório ser majoritariamente composta por bactérias gram-positivas, representando cerca de 70% dos microrganismos, há uma população, ainda que menor, de bactérias potencialmente patogênicas gram-negativas, como as

bactérias do gênero *Citrobacter*, *Pseudomonas* e *Escherichia coli* (PORTO *et al.*, 2007). Já foi relatado que bactérias gram-negativas são frequentemente mais associadas a processos infecciosos em feridas cirúrgicas, principalmente, devido a produção de endotoxinas por esses microrganismos, o que contribui para o aumento da sua virulência (SANTOS *et al.*, 2016).

Assim, o TLR4 é uma peça fundamental no reconhecimento desses microrganismos e desenvolvimento da resposta do hospedeiro (FERRAZ *et al.*, 2011; NEAL *et al.*, 2013). Sua hipoatividade pode tornar o hospedeiro susceptível aos patógenos locais, uma vez que estes não são reconhecidos. Isto pode levar à colonização bacteriana em feridas, com o subsequente desenvolvimento de infecções, o que retarda o processo cicatricial (FERRAZ *et al.*, 2011; PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015).

A Alogliptina é um medicamento da classe dos inibidores da enzima Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4), utilizado com eficácia comprovada no tratamento da Diabetes Mellitus (DM) tipo 2. Alguns estudos já observaram, *in vitro*, que a Alogliptina, bem como outros fármacos da mesma classe, atua inibindo a resposta inflamatória mediada pelo TLR4. Contudo, a inibição se dá de forma secundária, não sendo o alvo principal desta droga (TA *et al.*, 2010).

Numa recente revisão de literatura, foi demonstrado que nos pacientes usuários de Alogliptina há aumento na incidência de infecções do trato urinário (SCHEEN, 2015). Essa infecção é causada, principalmente, pelas bactérias *Escherichia coli* e *Proteus*, microrganismos gram-negativos, principais ativadores do TLR4 (FERRAZ *et al.*, 2011; PEREIRA; SOUZA; BITENCOURT, 2019). Associado a isso, um recente estudo demonstrou que a Alogliptina apresenta a capacidade de inibir a resposta inflamatória mediada pelo TLR4 induzida por LPS, através do bloqueio de proteínas quinases presentes na cascata de ativação do receptor. Contudo, esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado (TA *et al.*, 2010). Em outro trabalho, realizado em camundongos, o tratamento com Alogliptina diminuiu a expressão de TLR4, inibindo assim a cascata de sinalização mediada pelo receptor (EL-SAHAR *et al.*, 2021). Em ratos, a Alogliptina também foi capaz de reduzir significativamente os níveis teciduais de TLR4 (AM KABEL; ARAB; ELMAABOUD, 2021).

A resposta inflamatória mediada pelo TLR4 é apontada como um fator muito importante no processo cicatricial de feridas. Em camundongos TLR4^{-/-}, após injúria tecidual na pele, a área da ferida era maior do que em camundongos selvagens. Ademais, foi demonstrada uma maior concentração de células (neutrófilos e macrófagos) durante o processo inflamatório nos camundongos deficientes de TLR4, bem como menores níveis de IL-1 e IL-6, levando os autores a sugerir que o TLR4 exerce papel crítico na regulação da resposta inflamatória adequada logo após a lesão, para a correta cicatrização na pele (CHEN *et al.*, 2013).

Diante disso, é provável que a inibição das vias ativadas pelo TLR4 diminua o reconhecimento bacteriano pelo hospedeiro. Em lesões expostas a microrganismos, como é o caso das úlceras orais, isso pode levar a um aumento da susceptibilidade a infecções e, por consequência, aumento da resposta inflamatória através de outras vias, independentes de TLR4, culminando em um atraso no processo de cicatrização. Poucos são os estudos que avaliam esse papel fundamental do TLR4 no processo inflamatório em feridas cutâneas e não há estudos na literatura que avaliem esse mecanismo em úlceras traumáticas orais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processo de cicatrização

A hemostasia é a primeira etapa do processo de cicatrização, e ocorre logo após a injúria tecidual, interrompendo o sangramento através do processo de constrição vascular, que é principalmente mediado por fatores como serotonina, tromboxano A₂ e adrenalina. Estes promovem também a agregação e ativação plaquetária no local da ferida, levando à formação do tampão rico em fibrina (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). O coágulo então formado libera citocinas pró-inflamatórias, como Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Transformador (TGF)- β , Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e IL-8, para início da migração celular (PORTOU *et al.*, 2015).

Na etapa posterior, há aumento do suprimento sanguíneo e da permeabilidade vascular e, mediado pelos fatores liberados pelo coágulo, há a viabilização da migração de células inflamatórias para o sítio da ferida, dando início ao processo inflamatório, cujas principais células são os neutrófilos, macrófagos e linfócitos, sendo que estes últimos surgem num estágio mais tardio da inflamação. As primeiras células a migrarem para o local da injúria são os neutrófilos, que atingem seu pico nas primeiras 24 horas, estando presentes por um período de 3 a 5 dias. Essas células atuam com finalidade principal de fagocitose de bactérias e detritos, além de liberar proteases e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) que têm propriedades antimicrobianas. A partir do terceiro dia há uma predominância de macrófagos, que têm um papel essencial na liberação de citocinas a fim de estimular a resposta inflamatória e recrutamento de outros leucócitos, e também agem na eliminação de células que sofreram apoptose, através do processo de fagocitose, além de atuar como célula apresentadora de antígenos. Outra função dos macrófagos é sua atuação no início da fase de proliferação, estimulando queratinócitos, fibroblastos e o processo de angiogênese através de modificação do seu perfil fenotípico de pró (M1) para anti-inflamatório (M2). Já se foi observado que a ausência de macrófagos no processo inflamatório leva a uma redução da formação tecidual (SORG *et al.*, 2016). Após isso, os linfócitos migram para o local da ferida, atuando na fase de proliferação tardia e remodelação precoce. Eles produzem fatores de crescimento tecido-específico e estimulam células endoteliais e fibroblastos, dando início ao processo de proliferação e de remodelação tecidual (GUO; DIPIETRO, 2010; OLIVEIRA; DIAS, 2012; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014; PERCIVAL; FRANCOLINI;

DONELLI, 2015).

Na etapa de proliferação celular, ocorre inicialmente a reepitelização do local da ferida e a deposição de Matriz Extracelular (MEC). Ocorre, também, o estímulo para a formação de novos vasos, a angiogênese, e esse processo pode ser avaliado através da imunoexpressão do CD31, uma molécula de adesão endotelial plaquetária (YUAN *et al.*, 2018). Ainda nesta etapa, há o acúmulo de fibroblastos no local da lesão e deposição de colágeno do tipo III, imaturo. Assim, fibroblastos e colágeno, juntamente com os novos vasos, constituem a formação do tecido de granulação. Alguns fibroblastos começam a diferenciar-se em miofibroblastos, com função contrátil para unir as bordas da ferida. Em seguida, na fase de remodelação, há um rearranjo dessas estruturas, as células que migraram na fase inflamatória sofrem apoptose, há a substituição do colágeno tipo III, pelo colágeno tipo I, o que confere à ferida maior resistência à tração (GANTWERKER; HOM, 2012; GONZALEZ *et al.*, 2016).

2.2 Receptores *Toll-Like* 4

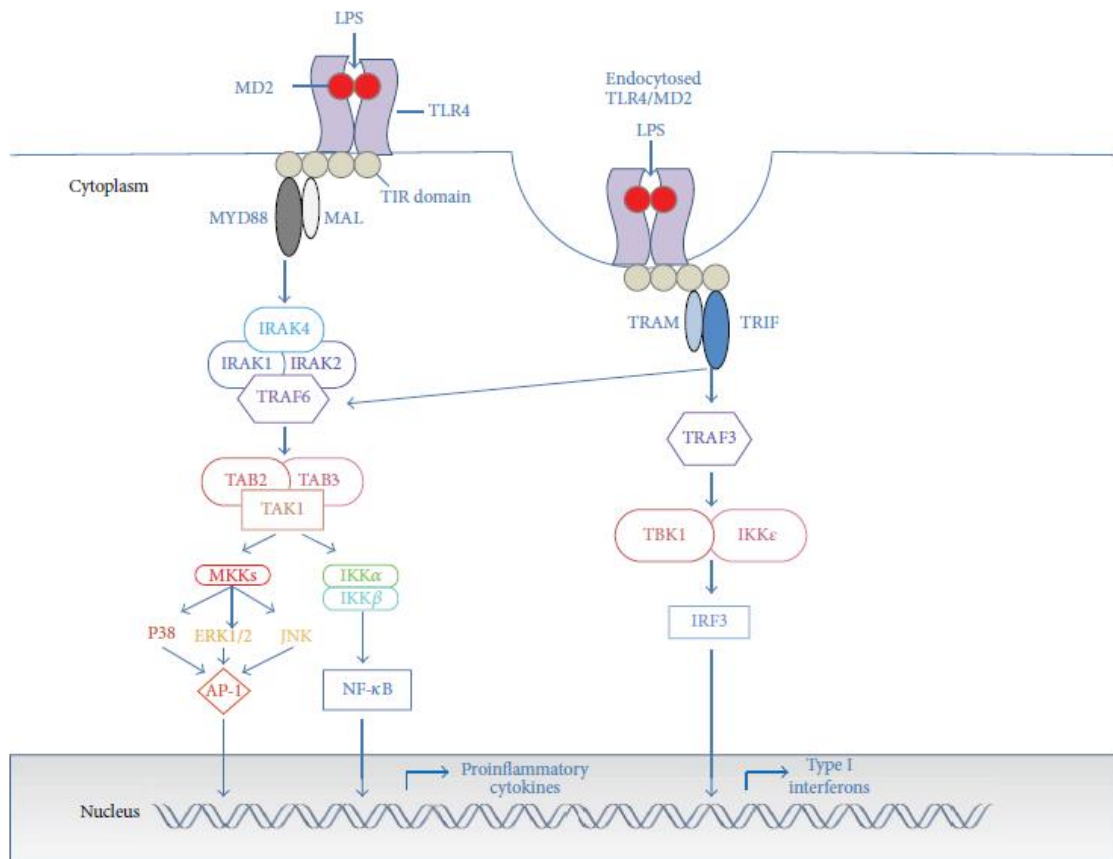
Existem 10 tipos de TLR em humanos e estes podem ser divididos em 2 subfamílias: A primeira subfamília são de receptores que estão presentes na superfície da membrana celular, e corresponde aos TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10, que atuam identificando proteínas e lipídeos. Cada TLR dessa subfamília possui um domínio intracelular e um extracelular. O domínio intracelular é conhecido como Domínio Receptor Toll/IL-1 (TIR), por sua semelhança com a família de receptores da IL-1. Já o domínio extracelular são as chamadas repetições ricas em leucinas (LRR) (TAKEDA; AKIRA, 2015). A outra subfamília de TLR está situada intracelularmente nos endossomos e é responsável por reconhecer ácidos nucleicos e PAMPs (XU *et al.*, 2018). Esses TLR possuem apenas o domínio intracelular TIR (TAKEDA; AKIRA, 2015).

O TLR4 possui um domínio extracelular e um intracelular. Para que este receptor reconheça a LPS, é necessário, inicialmente, que a Proteína de Ligação a LPS (LBP) presente no soro extraia o monômero LPS da parede bacteriana, e o transfira ao Agrupamento de Diferenciação 14 (CD14), um glicosilfosfatidilinositol. Posteriormente, o CD14 transfere o LPS para a Diferenciação Mieloide 2 (MD2), que está na superfície celular, e esta irá estabelecer uma associação física com o TLR4 (COCHET; PERI, 2017). O MD2 não possui domínios transmembrana e intracelular, e sua associação com o domínio extracelular do TLR4 se dá de forma não covalente por interação com o LPS, formando, assim, o complexo receptor TLR4/MD2 (TAKEDA; AKIRA, 2015; MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016). Já o TLR2

parece exercer importante papel na ativação do TLR4. Uma vez que o CD14 não possui domínio transmembrana, o TLR2 seria então responsável por interagir com o CD14, formando o complexo receptor de LPS: CD14/TLR2 (TAKEUCHI *et al.*, 1999; ZHAN; STAMOVA; SHARP, 2018).

Uma vez reconhecido o LPS, a sinalização mediada pelo TLR4 pode ativar duas vias: dependente da proteína adaptadora fator de Diferenciação Mieloide 88 (MyD88) e independente de MyD88 (Figura 1) (FERRAZ *et al.*, 2011; MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016).

Figura 1 – Ativação do TLR4 através das vias dependente e independente de MyD88

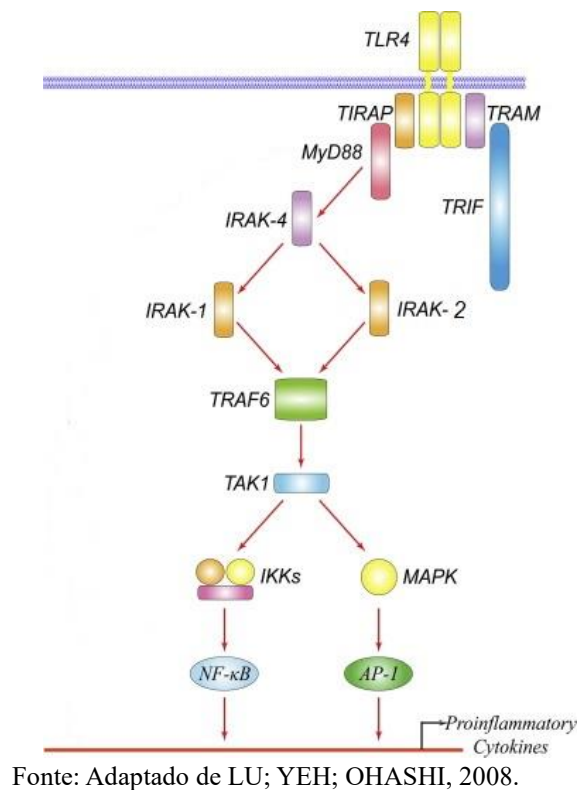


Fonte: MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016.

Quando ocorre a ligação de um LPS ao complexo receptor TLR4/MD2, é preciso que ocorra uma dimerização com 2 complexos receptores para o início da cascata de ativação. Na via dependente de MyD88, que acontece prioritariamente na membrana plasmática, o domínio TIR do completo receptor recruta a proteína MyD88 e a Proteína Tipo Adaptador MyD88 (MAL). Em seguida, essas proteínas levam à fosforilação das Quinases Associadas a

IL-1R (IRAK1 e IRAK2). Essas quinases se associam, então, ao Fator 6 Associado ao Receptor de TNF (TRAF6), o que leva à ativação da Quinase Ativada por TGF 1 (TAK1), através da mediação das proteínas adaptadoras, as Proteínas de Ligação a TAK1 2 e 3 (TAB2 e TAB3). Posteriormente, a TAK1 ativa as Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), sendo elas as c-Jun N-terminal Quinase (JNK), p38 e Quinases Reguladas por Sinal Extracelular (ERK1/2). Concomitantemente, a TAK1 estimula a ativação do Complexo I κ B Quinase (IKK), que é composto por duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β . Ao fim desse processo, a MAPKs e IKK levam a ativação e translocação nuclear dos fatores de transcrição Proteína Ativadora (AP)-1 e Fator Nuclear κ B (NF- κ B), respectivamente, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 2) (FERRAZ *et al.*, 2011; MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016).

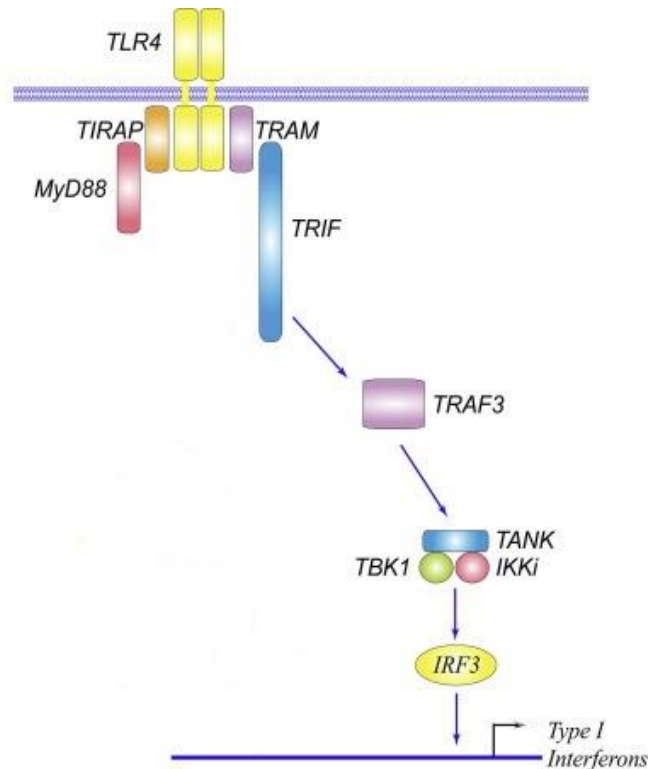
Figura 2 – Ativação do TLR4 através da via dependente de MyD88



A ativação da via independente de MyD88 ocorre nos endossomos e é preciso que ocorra a internalização do dímero TLR4/MD2. Após essa etapa, são recrutadas as proteínas Adaptador Indutor de Interferon (IFN)- β Contendo Domínio TIR (TRIF) e a Molécula Adaptadora Relacionada ao TRIF (TRAM). Depois disso, o TRAF3 é ativado, estimulando a

translocação nuclear do Fator Regulador de IFN 3 (IRF3), mediada pela Quinase 1 de Ligação TANK (TBK) e IKK ϵ , levando à produção de IFNs do tipo I (Figura 3) (FERRAZ *et al.*, 2011; MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016).

Figura 3 – Ativação do TLR4 através da via independente de MyD88



Fonte: Adaptado de LU; YEH; OHASHI, 2008.

Ambas as vias ativadas pelo TLR4 podem ativar diretamente a via do NF- κ B, levando à ativação de mediadores como óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β , e conseqüentemente, aumentando a atividade fagocitária de macrófagos e outros fagócitos teciduais locais (NEAL *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2018). Além dessas citocinas, outras também são estimuladas pelos TLR4, como IL-6, IL-10 e IL-12 (ROSSOL *et al.*, 2011).

Em relação às citocinas ativadas pelo TLR4 e seus papéis no processo inflamatório, o TNF- α é produzido principalmente por monócitos e macrófagos ativados, e nestes, atua aumentando sua atividade fagocitária e antimicrobiana pela via clássica de estímulo de fagocitose. Além disso, TNF- α induz diversas moléculas de adesão nas células endoteliais, como E-selectina, Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1) e Molécula de Adesão a Células Vasculares-1 (VCAM-1) que, por sua vez, recrutam leucócitos para atuação durante a fase inflamatória. IL-1 β também é expressa por monócitos e macrófagos em resposta ao LPS, através da ativação por TLR4. Ainda, IL-1 β é capaz de estimular a produção de IL-6 e promover

migração de neutrófilos maduros e células progenitoras da medula óssea para o sítio inflamatório (ROSSOL *et al.*, 2011).

2.3 Alogliptina

O benzoato de Alogliptina é um fármaco não covalente à base de quinazolinona, que atua como inibidor seletivo reversível da DPP-4, através da formação de ligações não covalente com o sítio catalítico dessa enzima. Foi desenvolvido pela Takeda Inc (Japão) e aprovado para uso pela *Food and Drug Administration* em 2013 (SAISHO, 2015). No Brasil, foi aprovada em maio de 2016 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e seu nome comercial é Nesina® (ANVISA, 2016).

A Alogliptina é o medicamento de primeira escolha em caso de pacientes intolerantes a metformina, ou em associação com este fármaco, quando a metformina de uso isolado não proporciona resultados favoráveis no tratamento do DM tipo 2 (MARINO; COLE, 2014; KEATING, 2015). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da DPP-4, de maneira dose-dependente. A DPP-4 atua na rápida degradação dos hormônios incretinas Peptídeo Tipo Glucagon 1 (GLP-1) e Polipeptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose (GIP) (KEATING, 2015). Esses hormônios são responsáveis por estimular a secreção de insulina dependente de glicose das células β pancreáticas, e o hormônio GLP-1, também, é responsável pela inibição da secreção de glucagon dependente de glicose. Com a inibição da enzima DPP-4 pela Alogliptina, a atividade dos hormônios GLP-1 e GIP é mantida, e isso culmina na diminuição dos níveis séricos de glicose (TA *et al.*, 2010; YABE; SEINO, 2016).

Em relação à farmacocinética, a Alogliptina é rapidamente absorvida por administração oral, tendo biodisponibilidade de 100%, e atinge sua Concentração Máxima ($C_{m\acute{a}x}$) no plasma em um tempo médio de 1 a 2 horas, com meia vida ($t_{1/2}$) de 21,4 horas, o que permite a administração em uma dose única diária (JARVIS; CABRERA; CHARRON, 2013; MARINO; COLE, 2014). É recomendável a dose única diária de 25mg para pacientes adultos com DM tipo 2, mas o medicamento também está disponível nas doses de 6,25 e 12,5 mg (MARINO; COLE, 2014; KEATING, 2015).

Sua eliminação é realizada, principalmente, pelos rins, que eliminam 60%-80 do medicamento inalterado, com possibilidade de adicional secreção tubular ativa, o que implica em ajuste de dose em pacientes com insuficiência renal moderada a severa. Foram detectados dois metabólitos menores da Alogliptina, o M-I (Alogliptina N-Desmetilada), que é inibidor ativo da DPP-4, e M-II (Alogliptina N-Acetilada), sem atividade inibitória, que representam <

1% e <6%, respectivamente, do composto original (JARVIS; CABRERA; CHARRON, 2013; YABE; SEINO, 2016). Outras enzimas já foram relatadas como contribuintes no metabolismo da Alogliptina, como as do Citocromo P450 (CYP) CYP2D6 e CYP3A4 (KEATING, 2015).

A Alogliptina é um fármaco seguro, e uma revisão de ensaios clínicos mostra que seus efeitos adversos são semelhantes aos encontrados nos grupos placebo ou grupos tratados com outro fármaco comparativo, sendo classificados como leves a moderados (JARVIS; CABRERA; CHARRON, 2013; YABE; SEINO, 2016). Como efeitos colaterais dignos de nota, os estudos demonstram que seu uso crônico leva ao aumento da susceptibilidade a infecções, como nasofaringite e infecção do trato respiratório superior (JARVIS; CABRERA; CHARRON, 2013; SCHEEN, 2015). A Alogliptina apresenta um baixo risco de hipoglicemia, e quando esta ocorre, sua severidade é considerada de leve a moderada. Os maiores riscos de hipoglicemia associados à Alogliptina estão relacionados ao uso do fármaco com outro agente hipoglicemiante, como a Pioglitazona (KEATING, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

As úlceras traumáticas orais constituem lesões de alta incidência na população. No entanto, os protocolos de tratamento são variáveis nos serviços de estomatologia e consultórios odontológicos, uma vez que não se sabe a real etiopatogênese dessas lesões.

A resposta imune inata aos microrganismos potencialmente patogênicos é essencial para que se tenha um processo cicatricial de feridas livre de infecções, uma vez que o não reconhecimento desses microrganismos e a subsequente infecção da ferida pode levar a um aumento do período de cicatrização.

A alogliptina é um fármaco francamente utilizado no controle do diabetes mellitus tipo 2, doença cada vez mais prevalente no mundo todo. Porém, esse fármaco está associado a aumento no risco de infecção em mucosas por inativação de receptores da resposta imune inata, principalmente localizados em macrófagos. Dentre estes receptores, o TLR4 é um dos principais afetados por esse fármaco. Este faz parte de uma superfamília de receptores da resposta imune inata e sua ativação desencadeia uma cascata que culmina com ativação de mecanismos de defesa para impedir o desenvolvimento de processos infecciosos na superfície das feridas. Pacientes que fazem uso de medicamentos que interfiram na ativação do processo inflamatório mediado por esse receptor apresentam susceptibilidade a infecções específicas. E em pacientes diabéticos, em que o processo de cicatrização é sabidamente mais lento, isso é ainda mais grave, pois os prejuízos no processo de cicatrização podem ser potencializados pela medicação utilizada para o tratamento da doença.

Ressalta-se que, em úlceras orais, a descontinuação do epitélio torna o tecido conjuntivo exposto, e a incapacidade do sistema imune de responder de forma imediata prolonga o processo de ulceração e a possibilidade de infecção.

Assim, torna-se imprescindível entender como a resposta imune inata poderia influenciar no reparo de úlceras orais.

4 HIPÓTESES

4.1 Hipótese nula

O tratamento com Alogliptina não influencia no processo de cicatrização de úlceras traumáticas orais em ratos Wistar.

4.2 Hipótese alternativa

O tratamento com Alogliptina influencia no processo de cicatrização de úlceras traumáticas orais em ratos Wistar.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da Alogliptina no processo de cicatrização de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos Wistar.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar clinicamente a influência do tratamento com Alogliptina na variação de massa corpórea e na redução da dimensão de área de úlcera em mucosa jugal de ratos Wistar;
- Avaliar clinicamente a influência do tratamento com Alogliptina no comportamento animal sugestivo de desconforto em ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera em mucosa jugal;
- Avaliar a influência do tratamento com Alogliptina na presença de bactérias na superfície da úlcera durante processo de cicatrização tecidual em ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera em mucosa jugal;
- Avaliar histologicamente a influência do tratamento com Alogliptina nas fases de cicatrização tecidual e na contagem de células polimorfonucleares (PMN) neutrófilos e mononucleares em ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera em mucosa jugal;
- Avaliar por meio de técnicas histoquímicas a influência do tratamento com Alogliptina na deposição do colágeno em ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera em mucosa jugal;
- Avaliar a influência do tratamento com Alogliptina na imunoexpressão dos receptores da resposta imune inata TLR4 e TLR2 durante processo de cicatrização tecidual em ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera em mucosa jugal;
- Avaliar a influência do tratamento com Alogliptina na imunoexpressão de TGF- β e CD31 e sua influência no processo de cicatrização tecidual em ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera em mucosa jugal.

6 METODOLOGIA

6.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, protocolado sob o CEUA nº 9982290120 (ANEXO A). O trabalho seguiu as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments checklist*) (KILKENNY *et al.*, 2010) para estudos com animais e foram adotadas condutas éticas para minimizar seu desconforto com base nos princípios dos 3R (*reduction, refinement, replacement*).

6.2 Animais e cálculo amostral

Esse trabalho foi desenvolvido pelo Laboratório de Patologia Bucal (LPB) do Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Foram utilizados ratos fêmeas da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 220 gramas. Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da UFC, abrigados a 24° C em ciclo luz-escuro de 12 horas e com acesso a água e alimento *ad libitum*.

Tendo em vista que em um modelo inflamatório de resistência à insulina, de Rahman *et al.* (2020), no qual o tratamento com Alogliptina melhorou significativamente parâmetros comportamentais em ratos (11 ± 7 para 25 ± 10), estima-se necessário avaliar seis animais por grupo, a fim de obter uma amostra que represente, com 80% de poder e 95% de confiança, a hipótese alternativa desse estudo.

6.3 Grupos experimentais e protocolo de indução da úlcera

O desenho experimental contou com quatro grupos experimentais: um grupo controle (GC) tratado com solução salina 0,1ml/kg/dia e três grupos testes tratados com Alogliptina 1mg/kg/dia (GTA1), 3mg/kg/dia (GTA3) e 9mg/kg/dia (GTA9) (BAO *et al.*, 2014) por via oral dissolvidos em solução salina equivolúmica ao GC. De acordo com Bao *et al.* (2014), as doses de 1 e 3mg/kg/dia são capazes de inibir a enzima DPP-4 em ratos, mantendo os níveis normais de glicose. A dose de 9mg/kg/dia foi adicionada a fim de construir uma curva dose-resposta. O tratamento teve início três dias antes da indução das úlceras e foi mantido até o dia anterior à eutanásia.

Após distribuição aleatória dos animais (comando “=aleatório ()” do *Microsoft Excel, Microsoft Office®*), os animais foram anestesiados, por via Intraperitoneal (IP), com quetamina 10% (80 mg/kg) e xilazina 2% (10 mg/kg). Em seguida, foi realizada a antisepsia da mucosa, utilizando clorexidina 0,12%, e a úlcera foi induzida em região de mucosa jugal esquerda através de *punch* dermatológico (Rhosse®) com 6mm de diâmetro e 2mm de profundidade. O tecido remanescente foi excisado utilizando lâmina de bisturi de Bard Parker® convencional (adaptado de MESQUITA *et al.*, 2020).

Durante a indução da úlcera utilizou-se plástico-bolha para envolver os animais e estes assim foram mantidos após o procedimento (durante o monitoramento clínico pós-operatório). Além disso, foram dispostas duas luvas de procedimento com água morna em cada caixa, para que o ambiente permanecesse aquecido e fossem evitados quadros de hipotermia. Os animais permaneceram em observação até recobrem os reflexos (NEVES *et al.*, 2013). Não foi necessária alteração da dieta nem restrição hídrica no período pós-operatório.

Os animais foram eutanasiados 1, 3, 7 e 14 dias após a indução das úlceras (n=6/grupo/dia), totalizando 96 animais (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupos experimentais e dias de eutanásia

	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Total
GC	n=6	n=6	n=6	n=6	n=24
GTA1	n=6	n=6	n=6	n=6	n=24
GTA3	n=6	n=6	n=6	n=6	n=24
GTA9	n=6	n=6	n=6	n=6	n=24
Total	n=24	n=24	n=24	n=24	n=96

GC = grupo controle (GC); GTA1 = grupo teste tratado com Alogliptina 1mg/kg/dia; GTA3 = grupo teste tratado com Alogliptina 3mg/kg/dia; GTA9 = grupo teste tratado com Alogliptina 9mg/kg/dia

Fonte: Elaborada pela autora.

6.4 Análise de desconforto

Os animais eutanasiados no 14º dia após a indução da úlcera foram avaliados diariamente quanto ao desconforto, desde o dia da indução da úlcera ao dia até o dia da eutanásia. Para isso, foram condicionados individualmente de forma aleatória em sala escura com luz vermelha em caixa de polipropileno para armazenamento de camundongos. Após 5 minutos em quarto escuro, os animais foram observados por mais 5 minutos (cronometrados) utilizando-se da escala de Grimace para classificar o nível de desconforto, estabelecendo

através de uma escala os escores de desconforto dos animais, de 0 (nenhum desconforto) a 1 (desconforto leve) e 2 (desconforto acentuado) para aperto orbital, protuberância do nariz/bochecha, posição da orelha e mudança do bigode para ratos. O resultado foi expresso como mediana (valores mínimo-máximo). Ainda, foi calculada a Área Sob a Curva (AUC) para cada animal e as AUC médias foram comparadas entre os grupos de estudo (KLUNE *et al.*, 2019).

6.5 Mensuração do diâmetro das lesões, variação percentual de massa corpórea e índice glicêmico

Os animais foram eutanasiados com sobredose (3x a dose anestésica) de quetamina 10% (240 mg/kg) e xilazina 2% (30 mg/kg) nos dias 1, 3, 7 e 14 após indução da úlcera. Nesses dias, após eutanásia, foi coletada amostra da superfície da úlcera/mucosa de reparo para análise microbiológica e a área de úlcera mensurada com um paquímetro digital (Digimess®) com 0,01mm de precisão, sendo obtidas duas medidas (D= maior diâmetro e d= menor diâmetro) para o cálculo da área ($A = \pi \cdot d \cdot D / 4$). Além disso, os animais foram pesados no dia de indução da úlcera e no dia de eutanásia para cálculo da variação de massa corpórea ($\Delta_{\text{massa}} = \text{massa final} - \text{massa inicial}$). Ainda, no dia de início da administração do fármaco e nos dias de eutanásia, 50 μL de sangue foram coletados via veia caudal para controle da glicemia, utilizando um Glicosímetro (Accu Chek®) (BRIZENO *et al.*, 2016).

6.6 Análise microbiológica da superfície da úlcera

A coleta de bactérias da superfície da úlcera foi realizada no dia de início de administração do fármaco e logo após eutanásia dos animais utilizando *microbrushes* estéreis e individuais levemente dispostos sobre a superfície da úlcera ou sobre o epitélio de reparo sobre a área ex-ulcerada. Os *microbrushes* foram colocados em microtubos contendo 1ml de solução de cloreto de sódio 0,89% tamponada (DAGISTAN *et al.*, 2009) e as amostras hermeticamente fechadas foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE)-UFC. Os tubos foram agitados em vortex (AP56, Phoenix Lufenco®) por 1 minuto e a suspensão passou por diluição seriada 1:10, 1:100 e 1:1.000 em solução de cloreto de sódio 0,89%.

Em seguida, foi realizada a semeadura de 25 μL , através da técnica de espalhamento usando alça drigalsky em *Brain Heart Infusion* (BHI) ágar (Kasvi®). As placas foram

incubadas por 48 horas, a 37 °C, para posterior contagem e cálculo das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

6.7 Análise histológica

No dia de eutanásia, a região da mucosa dos animais contendo a área ulcerada foi coletada cirurgicamente e acondicionada em formol tamponado 10% por 48 horas para processamento histológico (BRIZENO *et al.*, 2016).

Os fragmentos de mucosa fixados em formol tamponado a 10% foram analisados macroscopicamente e hemisseccionados no maior eixo da úlcera/tecido de reparo da área ex-ulcerada. Posteriormente, os espécimes foram submetidos à desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação em parafina, fundição a 60°C e inclusão dos fragmentos, formando blocos à temperatura ambiente. Foram, então, feitas secções de 3 µm de espessura, através de um micrótomo, para montagem de lâmina histológica e posterior coloração com hematoxilina-eosina.

A análise das lâminas foi realizada através de microscópio óptico, utilizando escores de estadiamento da úlcera, variando de 0 a 4. Foi considerado como escore 0 a ausência de úlcera com tecido conjuntivo remodelado; escore 1, ausência de úlcera com discreta/moderada fibrose associada a inflamação crônica; escore 2, presença de úlcera com fibrose e moderada inflamação crônica; escore 3, úlcera e processo inflamatório crônico (tecido de granulação); e escore 4, úlcera e processo agudo (ectasia, vasos dilatados, infiltrado inflamatório misto) (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

6.8 Análise histomorfométrica: avaliação do infiltrado inflamatório

Foram fotografados cinco microcampos próximos a região ulcerada (três na superfície e dois na profundidade, totalizando 1,30 mm²) de cada lâmina corada por hematoxilina-eosina no aumento de 400x utilizando microscópio (DM2000, Leica®) com câmera (DFC295, Leica®) e *software* (LAS, Leica®) acoplados. Em seguida, foram contados o total (somatório) de células polimorfonucleares (PMN) neutrófilos e células mononucleares, utilizando o comando *Cell counter* do *software* ImageJ® e o somatório foi utilizado como unidade amostral. O resultado foi expresso como média ± Erro Padrão da Média (EPM) (BRIZENO *et al.*, 2016).

6.9 Análise histoquímica: avaliação da colagênese

Para análise de colágeno total foram realizados cortes de 3 μm para coloração por Tricrômio de Masson e *Picrosirius Red*.

As lâminas destinadas ao Tricrômio de Masson, após desparafinização em estufa a 60°C por 3h, dois banhos de 5 minutos em xilol, reidratação em solução de etanol decrescente (90%, 85% e 70%) com posterior lavagem com água foram coradas com Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 minutos e lavadas em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em Fucsina durante 4 minutos. Após nova lavagem foram diferenciadas em solução de Ácido Fosfomolíbico por 10 minutos. Em seguida, foram coradas com Azul de Anilina durante 10 minutos e lavadas em água destilada. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan®.

Cinco microcampos de cada lâmina corada por Tricrômio de Masson foram fotografados, seguindo a mesma metodologia descrita para aquelas coradas por hematoxilina-eosina. As imagens foram exportadas para o *software* ImageJ® e submetidas a escalonamento de cores (*Colour function > colour deconvolution > alcian blue e H*) para separação das imagens em azul, vermelho e um residual de cor. As imagens azuis foram binarizadas e submetidas a análise do percentual de área marcada por colágeno total (*Process > Binary > Make Binary > Analyze > Analyze Particles*) (adaptado de ALVES *et al.*, 2015).

As lâminas destinadas ao *Picrosirius Red*, após desparafinização em estufa a 60°C por 3h, dois banhos de 5 minutos em xilol, reidratação em solução de etanol decrescente (90%, 85% e 70%) com posterior lavagem com água foram incubadas em solução de *Picrosirius* (ScyTek®) e contracoradas com hematoxilina de Harris por 10 segundos. Cinco microcampos de cada lâmina foram fotografados, seguindo a mesma metodologia descrita para as lâminas coradas por hematoxilina-eosina. As imagens foram exportadas para o ImageJ®, para análise do percentual de área corada em vermelho (colágeno total).

Para determinar a porcentagem de área total de colágeno, a calibração foi feita usando o comando *Threshold command (Image > Adjust > Color Threshold)* e a função *Red, Green, Blue* (RGB) foi ajustada nas imagens (vermelho = mínimo 71, máximo 255; verde = mínimo 0, máximo 69; azul = mínimo 0, máximo 92) (ALVES *et al.*, 2015).

Em ambas as análises, considerou-se a média dos campos avaliados, os quais foram expressos em forma de média \pm EPM.

6.10 Análise por imunohistoquímica utilizando a Técnica de Microarranjos Teciduais (TMA - *tissue microarray*)

Foram utilizadas duas áreas representativas (duplicata) dos blocos dos animais para a confecção de blocos de TMA através do dispositivo “*tissue microarrayer*” (Quick-Ray UNITMA®). Após confecção dos blocos, foram realizados cortes de 3 µm dispostos sobre lâminas silanizadas para reação de imunohistoquímica através da técnica da estreptavidina-biotinilada. Após desparafinização e reidratação, foi feita a recuperação antigênica com solução de citrato pH 6,0 ou Tris EDTA pH 9,0. Posteriormente ao resfriamento em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em Solução Tampão de Fosfato (PBS) e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em PBS por 30 minutos.

Após lavagens em PBS, foi realizada a incubação *overnight* com os anticorpos primários para os receptores da resposta imune inata anti-TLR4 e anti TLR-2, para o fator de crescimento anti-TGF-β e para a molécula de adesão celular endotelial plaquetária anti-CD31. Na tabela 2 estão descritos a diluição e controle positivo de cada anticorpo.

Tabela 2 – Especificação dos clones, fabricante, controle positivo e alvos dos anticorpos primários

Anticorpo	Clone	Diluição	Marca	Controle positivo	Alvo
Anti-TLR4	Ab22048	1:150	Abcam®	Úlcera	Membrana celular
Anti-TLR2	Ab213676	1:150	Abcam®	Úlcera	Membrana celular
Anti-TGF-β	Ab92486	1:200	Abcam®	Úlcera	Citoplasma
Anti-CD31	Ab182981	1:1000	Abcam®	Rim de rato	Membrana celular

Fonte: Elaborada pela autora.

O controle negativo foi realizado suprimindo-se o anticorpo primário da reação em um dos cortes. Após lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o polímero HRP IgG-anti-rato-anti-coelho (Dako®) por 30 minutos, feita revelação com 3,3-diamino-benzidina (DAB) (Abcam®), contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 10 segundos e montagem com Entellan®.

A avaliação imunohistoquímica quantitativa foi realizada por dois observadores diferentes para todas as lâminas. Foram fotografados cinco microcampos para os marcadores anti-TLR4, anti-TLR2 e anti-TGF-β, e três microcampos para o marcador anti- CD31, seguindo

a mesma metodologia descrita para as lâminas coradas por hematoxilina-eosina, em regiões com maior concentração de células imunocoradas localizadas em tecido conjuntivo (ou tecido de granulação) próximo à área ulcerada. Em seguida, foram contados o total (somatório) de células/vasos imunomarcados, utilizando o comando *Cell counter* do *software* ImageJ® e o somatório foi utilizado como unidade amostral. O resultado foi expresso como média \pm Erro Padrão da Média (EPM) (adaptado de BRIZENO *et al.*, 2016; TEÓFILO *et al.*, 2020).

6.11 Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos em forma de média e erro-padrão e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e os escores da escala de Grimace e histológicos expressos em forma de mediana (mínimo - máximo). Os dados paramétricos foram analisados pelo teste Análise de Variância com dois fatores (ANOVA-2-way) seguido do pós-teste de Bonferroni e os dados não paramétricos e escores analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

Todas as análises foram realizadas no *software* *GraphPad Prism* 5.0 para *Windows* adotando uma confiança de 95%.

7 RESULTADOS

Efeito da Alogliptina sobre parâmetros clínicos e microbiológicos da úlcera oral e variação de massa corpórea dos animais

Com relação a área de úlcera, no 1º dia não houve diferença entre os grupos. No 3º dia, o grupo GTA9 ($11,8 \pm 0,8$) apresentou maior média de área de úlcera quando comparado ao grupo controle ($6,4 \pm 1,0$). Bem como no 7º dia pós ulceração, os grupos GTA3 ($5,2 \pm 1,2$) e GTA9 ($5,8 \pm 1,3$) também apresentaram maior média de área de úlcera em relação ao grupo salina ($1,3 \pm 0,6$) ($p < 0,001$) (Tabela 3).

Com relação a variação ponderal, o ganho de massa corpórea foi significativamente inferior nos animais dos grupos GTA3 ($98,9 \pm 0,8$) e GTA9 ($96,2 \pm 1,3$) em relação ao grupo salina ($104,7 \pm 2,0$) no 14º dia ($p = 0,007$) (Tabela 3).

Quanto à análise microbiológica, três dias antes da indução da úlcera não houve diferença entre os grupos. No 1º dia após a ulceração os animais do grupo GTA9 ($2,7 \pm 0,2$) apresentaram contagem de UFC significativamente maior que o grupo controle ($1,2 \pm 0,3$). Bem como no 3º dia de protocolo, nos animais dos grupos GTA3 ($3,6 \pm 0,3$) e GTA9 ($3,8 \pm 0,5$), a contagem foi significativamente superior em relação ao grupo tratado com solução salina ($2,0 \pm 0,4$) ($p = 0,049$) (Tabela 3).

Quanto a glicemia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao longo do protocolo experimental ($p = 0,075$).

Tabela 3 – Perfil de cicatrização clínica da úlcera, variação de massa corpórea e contagem microbiológica da superfície da úlcera em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina

	Salina	Dose Alogliptina			p-Valor
		1 mg/Kg	3 mg/Kg	9 mg/Kg	
Área de úlcera					
(mm²)					
1D	9,4±0,5	12,0±2,3	12,1±1,1	12,7±0,9	<0,001^a
3D	6,4±1,0	6,5±1,4	6,2±0,8	11,8±0,8*	
7D	1,3±0,6	2,6±1,0	5,2±1,2*	5,8±1,3*	
14D	1,1±0,5	0,8±0,4	1,1±0,4	1,1±0,6	
Massa (g)					
1D	97,8±0,9	98,7±1,3	97,6±0,6	96,7±1,0	0,007^a
3D	97,0±0,5	96,9±0,3	98,1±0,9	98,1±0,9	
7D	101,6±1,0	98,2±0,9	100,0±1,6	98,9±1,2	
14D	104,7±2,0	103,7±2,0	98,9±0,8*	96,2±1,3*	
Análise					
microbiológica					
(log₁₀UFC/mL)					
D-3	1,6±0,1	2,2±0,3	1,6±0,5	1,1±0,4	0,049^a
1D	1,2±0,3	2,2±0,3	2,2±0,4	2,7±0,2*	
3D	2,0±0,4	2,6±0,5	3,6±0,3*	3,8±0,5*	
7D	2,1±0,3	1,8±0,3	2,4±0,6	2,1±0,6	
14D	1,3±0,4	1,9±0,4	1,3±0,3	1,4±0,5	

^aTeste ANOVA 2-way/Bonferroni.

* p<0,05 versus Salina

Fonte: Dados da pesquisa.

Análise de desconforto

Nos dias 1, 2 e 5 a mediana dos escores da Escala de Grimace foi significativamente superior no grupo GTA9 ($p=0,014$, $p=0,01$ e $p=0,039$, respectivamente), em relação ao grupo salina. No dia 3, o grupo GTA1 ($p=0,012$) apresentou mediana significativamente inferior em relação ao grupo controle. E, nos dias 10, 12 e 14, o grupo GTA3 ($p=0,005$, $p=0,025$ e $p=0,015$, respectivamente) apresentou mediana significativamente superior quando comparado ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise de desconforto de acordo com a Escala de Grimace em ratos Wistar tratados com Alogliptina

	Dose Alogliptina				p-Valor
	Salina	1 mg/Kg	3 mg/Kg	9 mg/Kg	
Escores Escala de Grimace					
D0	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,000
D1	1 (0-2)	2 (1-2)	1,5 (1-2)	2 (2-4)*	0,014^a
D2	1 (1-2)	1,5 (1-2)	2 (1-2)	3 (2-3)*	0,01^a
D3	2 (1-2)	1 (1-1)*	2 (1-2)	2 (1-3)	0,012^a
D4	2 (1-2)	2 (1-3)	1 (1-2)	2 (1-3)	0,135
D5	1,5 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	2,5 (2-3)*	0,039^a
D6	1,5 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	2 (1-3)	0,13
D7	1 (0-2)	1 (1-1)	1 (1-2)	1,5 (0-2)	0,474
D8	1 (1-1)	1 (1-2)	1 (1-1)	1 (0-3)	0,764
D9	0,5 (0-1)	1 (1-1)	1 (0-2)	1 (0-2)	0,345
D10	0 (0-0)	1 (0-1)	1 (1-2)*	0 (0-2)	0,005^a
D11	0 (0-1)	0,5 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	0,285
D12	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-1)*	0 (0-1)	0,025^a
D13	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0,554
D14	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-1)*	0 (0-1)	0,015^a

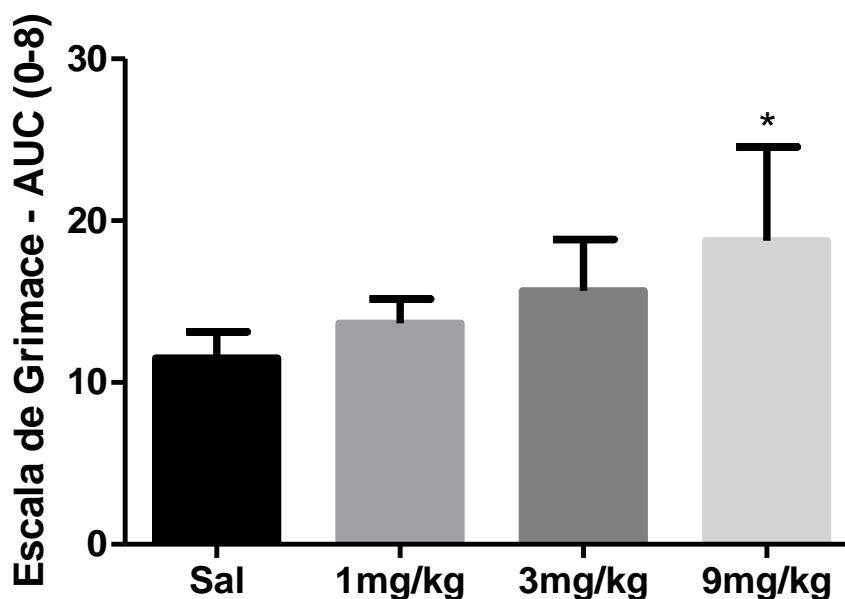
^aTeste Kruskal-Wallis/Dunn.

* $p<0,05$ versus Salina

Fonte: Dados da pesquisa.

Adicionalmente, quando calculada a área sob a curva para cada animal, observou-se que o grupo GTA9 apresentou uma maior área sob a curva média do somatório dos escores da Escala de Grimace em relação ao grupo salina ($p=0,02$) (Figura 4).

Figura 4 – Área sob a curva em relação a análise de desconforto de acordo com a Escala de Grimace em ratos Wistar tratados com Alogliptina



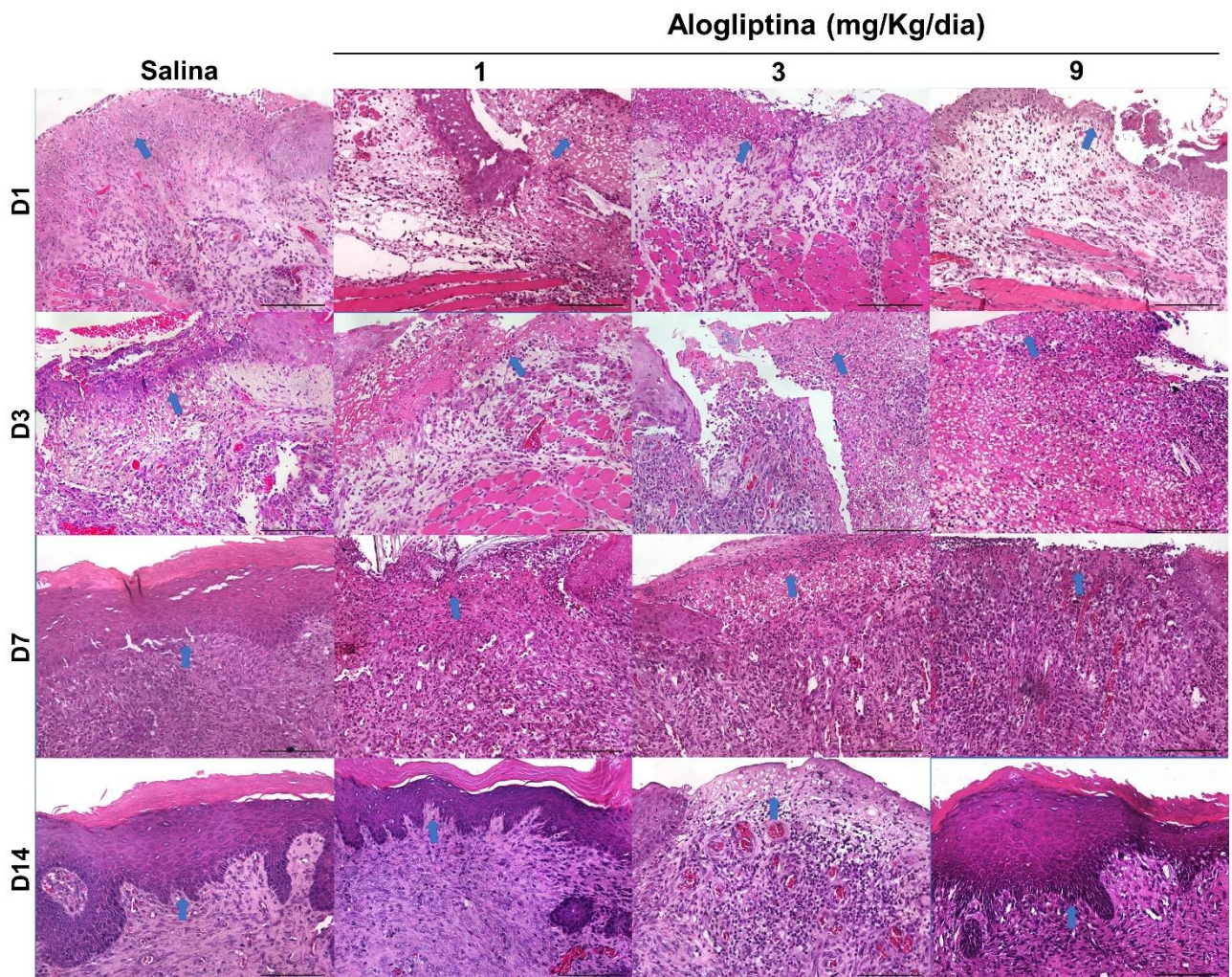
* $p < 0,05$ versus Salina; (média \pm EPM; Kruskal-Wallis/Dunn).
Fonte: Dados da pesquisa.

Efeito da Alogliptina sobre alterações histopatológicas de úlcera orais

Todos os grupos mostraram redução significativa dos escores histológicos ao longo do curso temporal. No 1º dia a mediana foi 4 em todos os grupos, sem diferença entre os grupos ($p=1,000$). No 3º dia, o grupo GTA9 apresentou mediana significativamente superior em relação ao GTA1 ($p=0,028$). No 7º dia, o grupo GTA9 apresentou mediana significativamente superior quando comparada ao grupo tratado com solução salina ($p=0,039$). No 14º dia, o grupo GTA3 apresentou mediana significativamente superior em relação ao GTA1 ($p=0,012$) (Figura 5) (Tabela 5).

Os grupos controle ($p<0,001$), GTA3 ($p=0,002$) e GTA9 ($p<0,001$) apresentaram diminuição dos escores histológicos no 7º dia em relação ao 1º dia. Porém, no grupo GTA1 essa redução só foi observada no 14º dia ($p<0,001$) (Figura 5) (Tabela 5).

Figura 5 – Perfil microscópico de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina



Fonte: Elaborada pela autora. Coloração = Hematoxilina-eosina; Aumento = 200x; Barra: 100 μ m; Seta azul: Área ulcerada/cicatrizada.

Estudo histomorfométrico

Perfil celular: Contagem de polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares

Em todos os grupos os polimorfonucleares apresentaram maior contagem no primeiro dia após a ulceração e diminuição ao longo do período de protocolo. No entanto, no 7º dia os animais do grupo GTA9 ($139,0 \pm 24,8$) apresentaram média significativamente inferior quando comparado ao grupo salina ($496,5 \pm 68,2$) ($p < 0,05$) (Tabela 5).

A maior contagem de células mononucleares foi observada no 3º dia em todos os grupos. Porém, nesse mesmo dia, nos grupos GTA3 ($708,7 \pm 73,8$) e GTA9 ($752,8 \pm 37,7$) houve uma contagem significativamente superior em relação ao grupo salina ($507,7 \pm 59,5$) ($p = 0,006$) (Tabela 5).

Análise da deposição de colágeno

Não houve diferença significativa na contagem total de colágeno após 7 dias da ulceração. Contudo, no 14º dia o grupo GTA9 ($18,2 \pm 2,6$), na análise por Tricrômio de Masson, apresentou redução da densidade média da área de deposição de colágeno quando comparado ao grupo salina ($35,2 \pm 0,8$) ($p = 0,031$) (Tabela 5) (Figura 6). Esse mesmo resultado também foi observado na análise por *Picrosirius Red* ($p = 0,032$) (Tabela 5) (Figura 7).

Tabela 5 – Escores histológicos, análise histomorfométrica e porcentagem da área de deposição de colágeno em úlcera induzida em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina

	Dose Alogliptina				p-Valor
	Salina	1 mg/Kg	3 mg/Kg	9 mg/Kg	
Escores					
histológicos					
1D	4(4-4)	4(4-4)	4(4-4)	4(4-4)	1,000
3D	4(3-4)	3(3-4)	3(3-4)	4(3-4)**	0,028^a
7D	1(1-3)†	3(1-3)	3(1-3)†	3(2-3)*†	0,039^a
14D	0,5(0-3)†	0,0(0-2)†	3(1-3)**†	1(1-3)†	0,012^a
p-Valor^a	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	
Células PMN					
1D	590,8±167,6	617,7±149,1	594,3±71,8	675,3±146,1	<0,05^b
3D	594,2±117,4	450,2±94,9	340,0±57,0	397,3±44,4	
7D	496,5±68,2	326,8±44,9	221,0±46,6	139,0±24,8*	
14D	134,5±51,7	70,4±45,6	99,6±38,8	114,3±42,9	
Células					
Mononucleares					
1D	310,0±38,4	272,7±36,1	242,6±32,8	190,3±20,0	0,006^b
3D	507,7±59,5	595,7±51,1	708,7±73,8*	752,8±37,7*	
7D	150,8±17,3	196,8±20,8	213,8±32,8	229,2±21,3	
14D	227,8±47,1	163,0±32,6	171,5±42,0	224,2±54,4	

Continua

^aTeste Kruskal-Wallis/Dunn

^bTeste ANOVA 2-way/Bonferroni.

*p<0,05 versus Salina; **p<0,05 versus 1mg/kg; †p<0,05 versus D1

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 5 – Escores histológicos, análise histomorfométrica e porcentagem da área de deposição de colágeno em úlcera induzida em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina

Porcentagem da área de deposição de colágeno (Tricrômio de Masson)					
7D	37,3±3,8	32,4±5,1	34,5±4,7	29,4±3,9	0,031^b
14D	35,2±0,8	30,1±4,0	24,4±3,5	18,2±2,6*	
Porcentagem da área de deposição de colágeno (Picrosirius Red)					
7D	14,8±3,1	16,0±3,6	12,0±1,2	10,3±2,8	0,032^b
14D	51,8±9,7	36,8±2,6	34,7±3,7	27,7±4,8*	

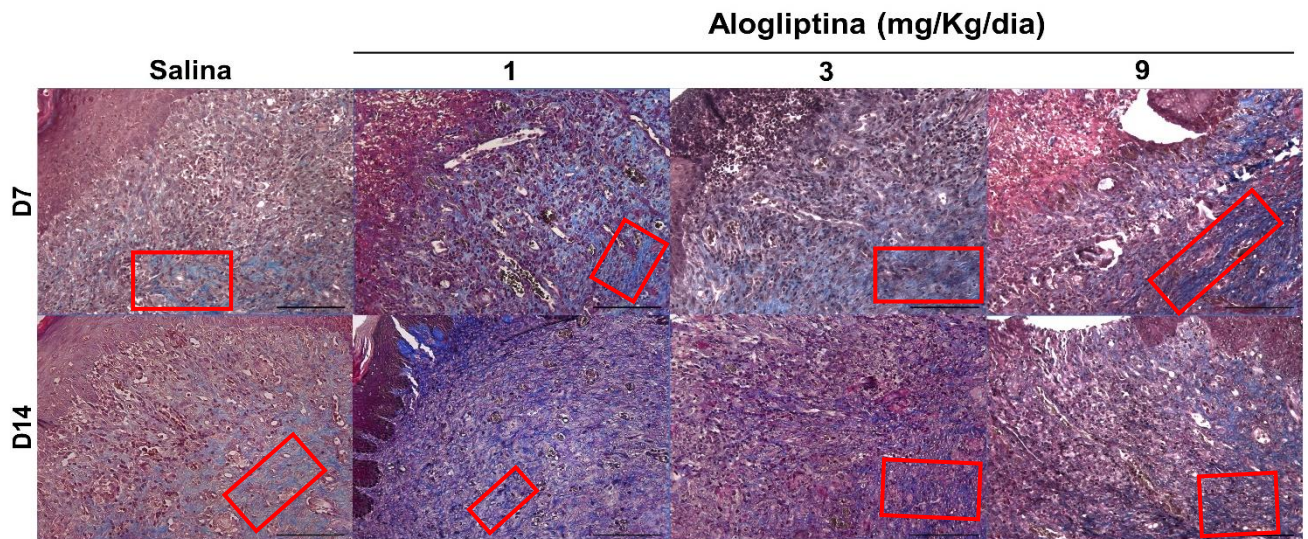
^aTeste Kruskal-Wallis/Dunn

^bTeste ANOVA 2-way/Bonferroni.

*p<0,05 versus Salina; †p<0,05 versus D1

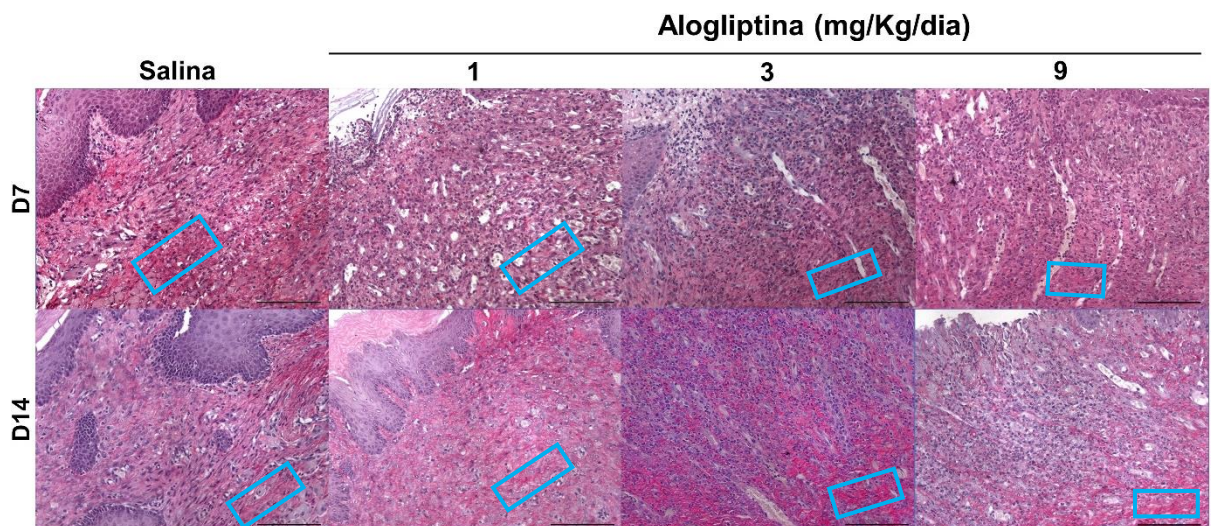
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 6 – Perfil de colagênese de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina



Fonte: elaborada pelo autor. Coloração = Tricrômio de Masson; Aumento = 200x; Barra: 100 μ m; Caixa em vermelho: Área de colagênese.

Figura 7 – Perfil de colagênese de úlceras em mucosa jugal de ratos Wistar tratados com Alogliptina

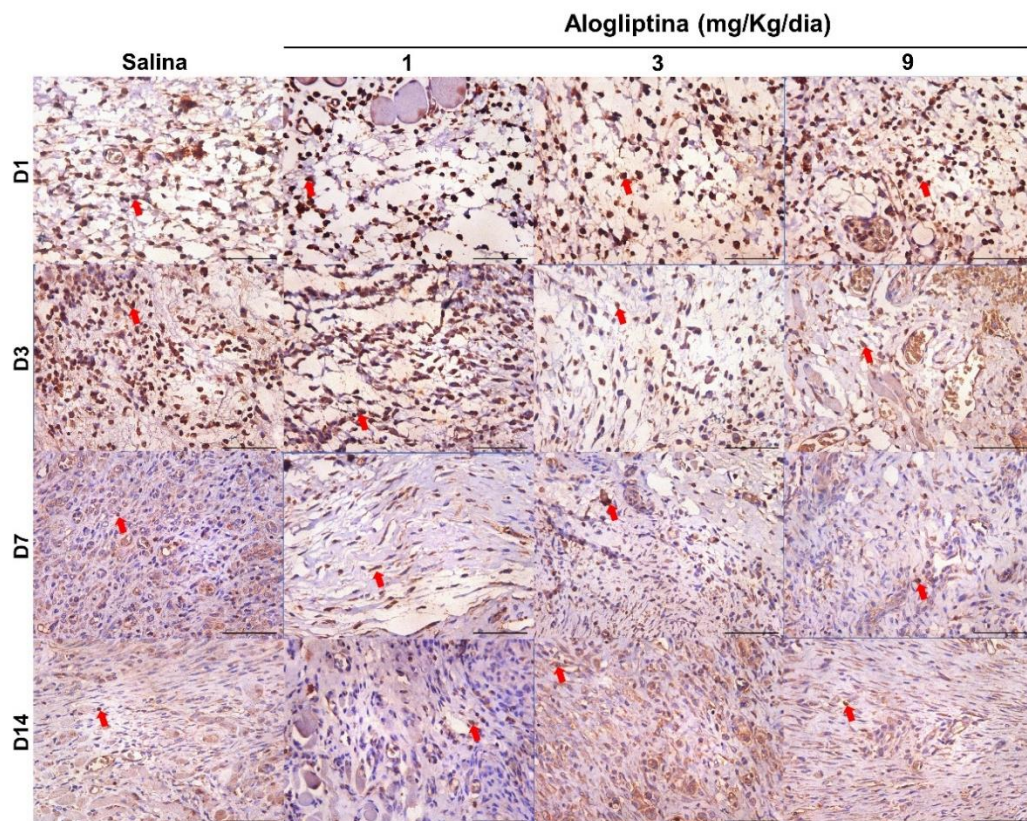


Fonte: Elaborada pela autora. Coloração = *Picrosirius Red*; Aumento = 200x; Barra: 100 μ m; Caixa em azul: Área de colagênese.

Análise imunohistoquímica

O pico de expressão de TLR4 foi observado no 1^a dia após a ulceração em quase todos os grupos, exceto GTA1, que ocorreu no 3^o dia. Também no mesmo dia, os grupos GTA3 (332,0±114,2) e GTA9 (404,7±129,4) apresentaram imunoexpressão média para TLR4 significativamente inferior, quando comparados ao grupo controle (697,0±115,2) (p=0,001) (Figura 8).

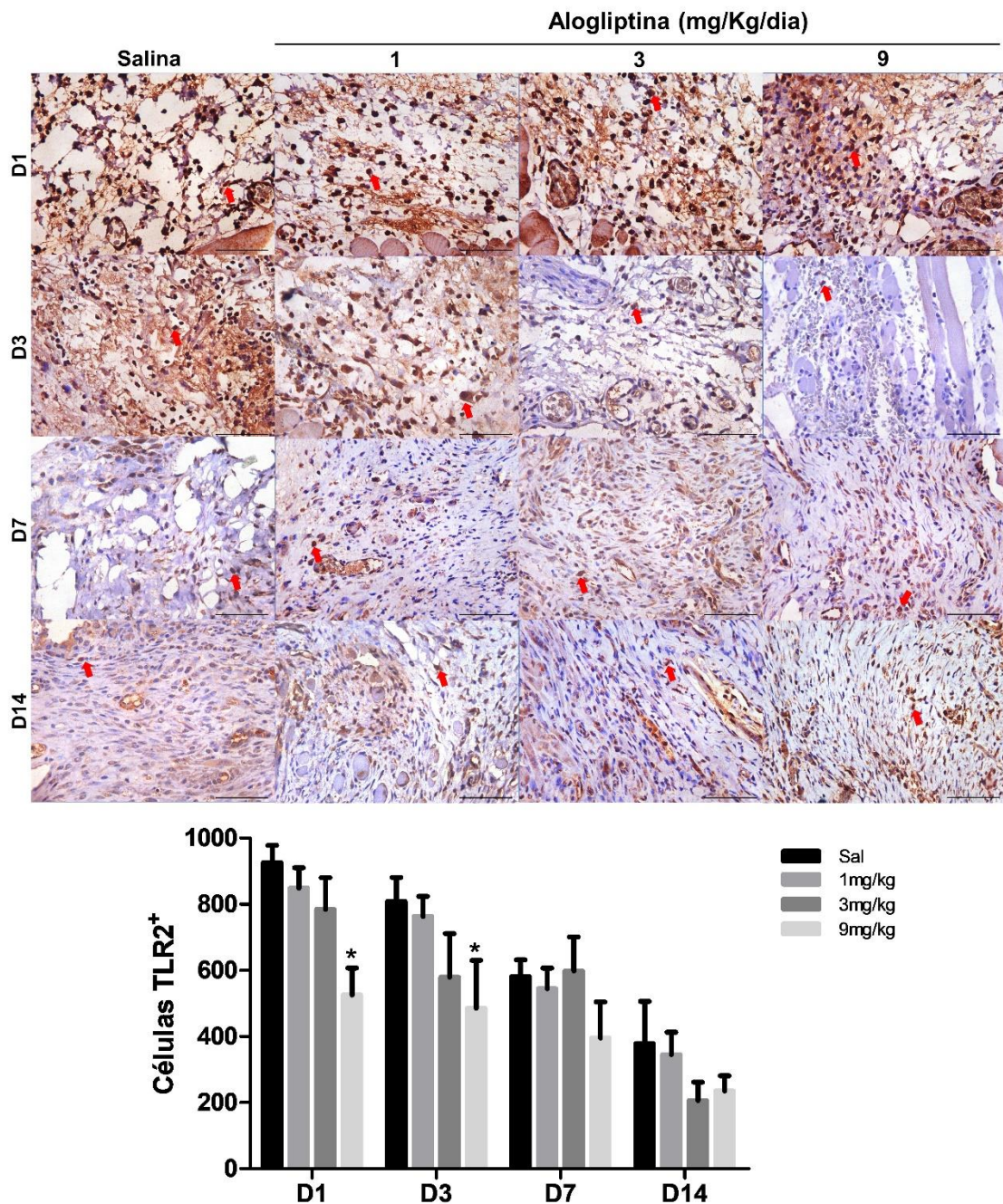
Figura 8 – Imunoexpressão para TLR4 em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina



Fonte: Elaborada pela autora. Coloração = imunohistoquímica; Aumento = 400x; Barra: 50 µm. Seta vermelha: célula imunomarcada.

O pico de expressão de TLR2 foi observado no 1^a dia após a ulceração em todos os grupos. Nos 1^o e 3^o dias o grupo GTA9 (525,4±82,0 e 485,0±145,6, respectivamente) apresentou imunoposição média para TLR2 significativamente inferior quando comparado ao grupo salina nos mesmos dias (926,5±51,0 e 808,5±73,0, respectivamente) ($p=0,001$) (Figura 9).

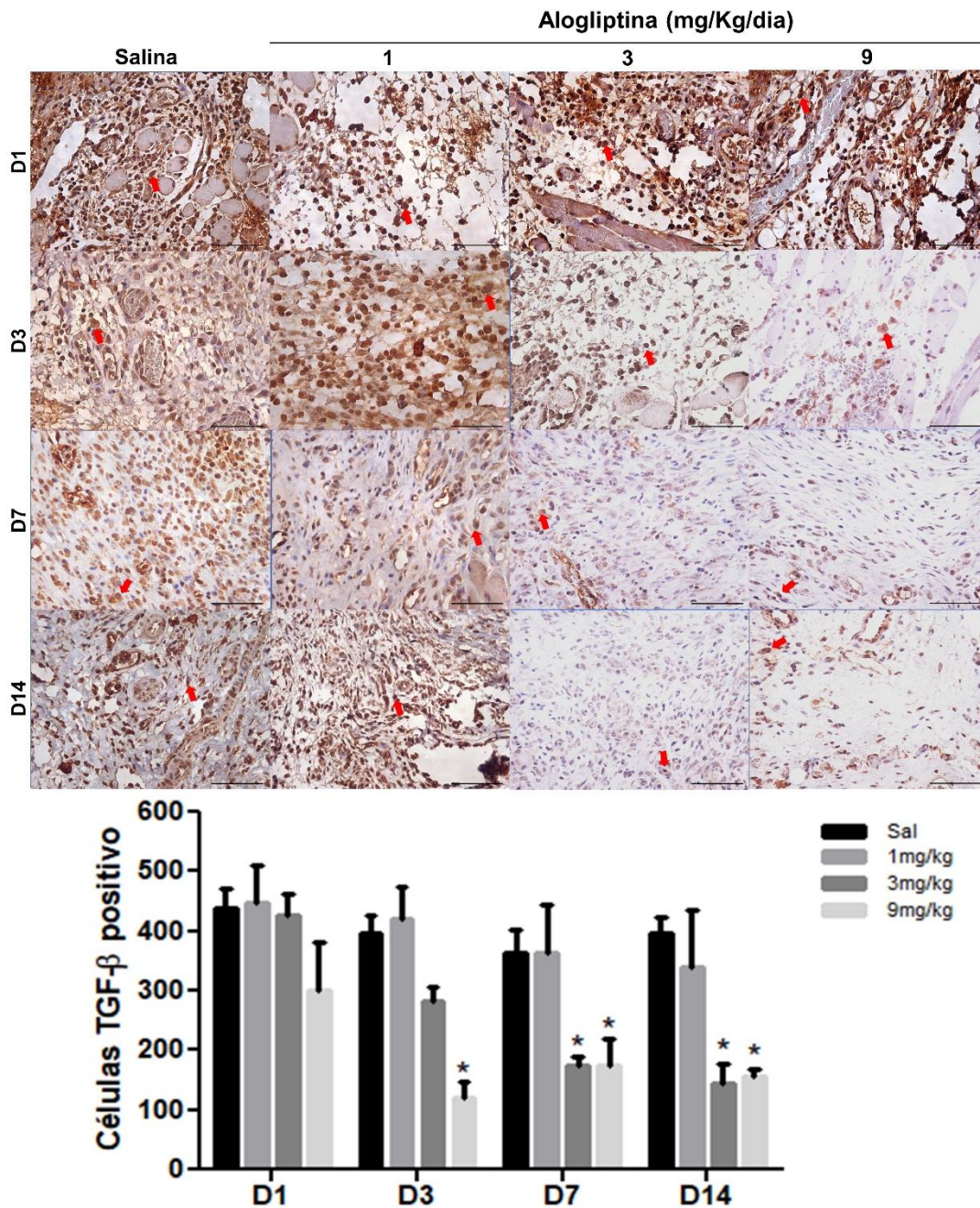
Figura 9 – Imunoexpressão para TLR2 em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina



Fonte: Elaborada pela autora. Coloração = imunohistoquímica; Aumento = 400x; Barra: 50 µm. Seta vermelha: célula imunomarcada.

O pico de imunexpressão de TGF- β foi observado no 1^a dia após a ulceração em todos os grupos. No 3^o dia, o grupo GTA9 (121,2 \pm 25,3) apresentou imunexpressão para TGF- β significativamente inferior quando comparado ao grupo salina (397,3 \pm 30,0). No 7^o e no 14^o dia, GTA3 (173,5 \pm 16,1 e 175,5 \pm 43,6, respectivamente) e GTA9 (145,0 \pm 33,4 e 155,0 \pm 14,9, respectivamente) permaneceram com imunexpressão média significativamente inferior em relação ao grupo controle (362,4 \pm 39,0 e 395,7 \pm 26,5, respectivamente) ($p < 0,001$) (Figura 10).

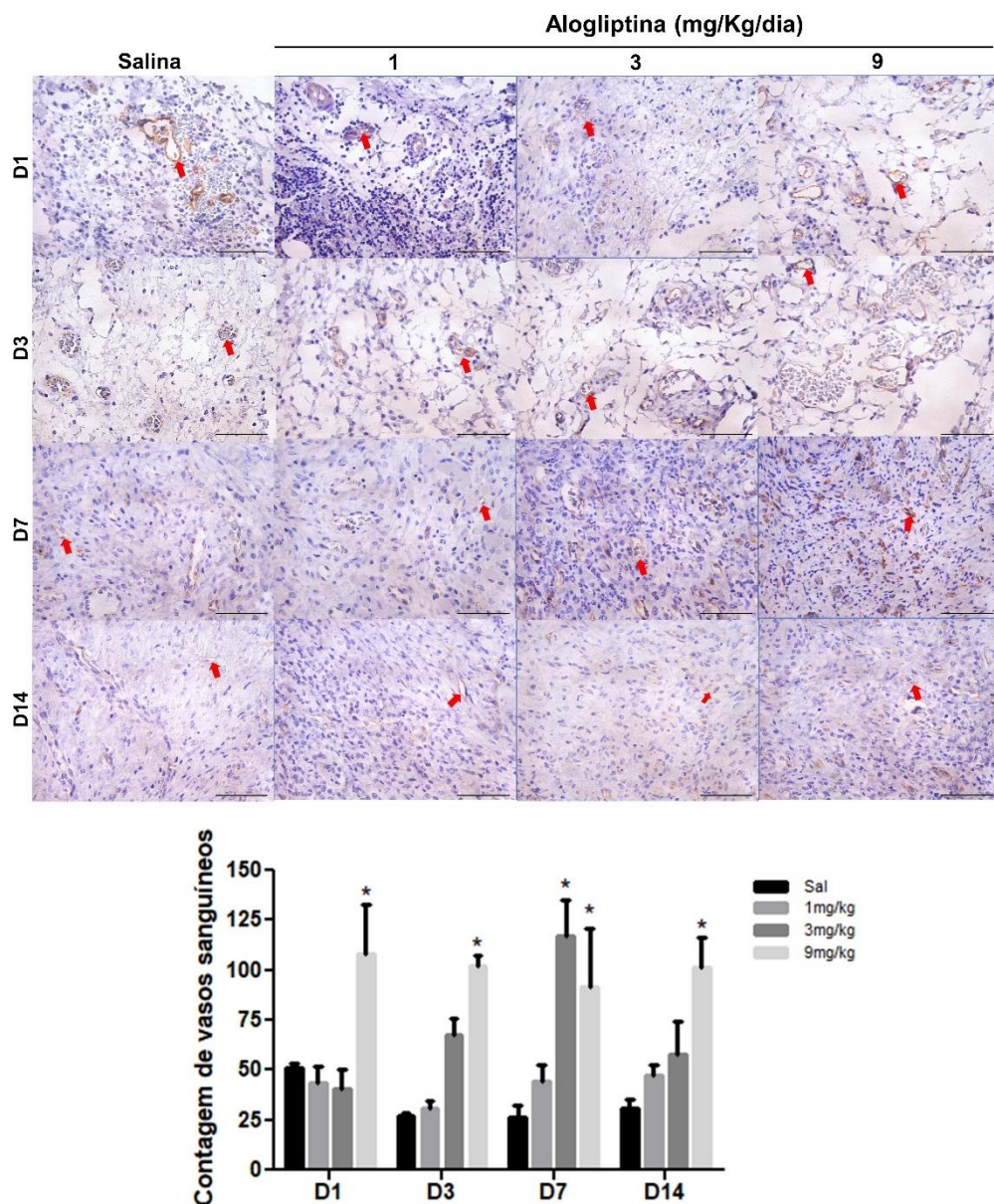
Figura 10 – Imunexpressão para TGF- β em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina



Fonte: Elaborada pela autora. Coloração = imunohistoquímica; Aumento = 400x; Barra: 50 μ m. Seta vermelha: célula imunomarcada.

O pico de imunoposição para CD31 foi observado no 1º dia para os grupos controle e GTA9, no 14º dia para o grupo GTA1 e no 7º dia para o grupo GTA3. O grupo GTA9 apresentou imunoposição para CD31 significativamente superior no 1º ($107,8 \pm 25,0$), 3º ($102,0 \pm 5,7$), 7º ($91,6 \pm 29,2$) e 14º dia ($101,7 \pm 14,6$) quando comparados ao grupo salina ($51,0 \pm 2,7$; $26,8 \pm 2,0$; $26,3 \pm 5,8$ e $31,2 \pm 4,1$, respectivamente). Ainda, o grupo GTA3 apresentou imunoposição para CD31 significativamente superior no 7º ($117,3 \pm 18,1$) em relação ao grupo controle ($26,3 \pm 5,8$) ($p < 0,001$) (Figura 11).

Figura 11 – Imunoposição para CD31 em mucosa jugal ulcerada de ratos Wistar tratados com Alogliptina



Fonte: Elaborada pela autora. Coloração = imunohistoquímica; Aumento = 400x; Barra: 50 µm. Seta vermelha: vaso imunomarcado.

8 DISCUSSÃO

Os TLR4 fazem parte da resposta imune inata, primeira linha de defesa do organismo frente a danos (FERRAZ *et al.*, 2011). Em feridas, quando há invasão bacteriana, a principal função do sistema imune inato é reconhecer esses microrganismos potencialmente patogênicos e impedir que colonizem a superfície da ferida e iniciem o processo infeccioso que, sabidamente, prejudica o processo de cicatrização (OLIVEIRA; DIAS, 2012; WAGNER *et al.*, 2017). Ta *et al.* (2010) observaram que a Alogliptina, contudo, parece interferir nos mecanismos de ativação do TLR4, prejudicando a resposta inflamatória mediada por ele. No presente estudo os resultados mostram que a interferência da Alogliptina nas vias ativadas pelo TLR4 está associada à hipoexpressão desse receptor. Esse resultado também esteve associado à hipoexpressão do TLR2 no grupo tratado com maior dose, demonstrando que o fármaco atua na hipoexpressão do complexo receptor de LPS, TLR4-CD14/TLR2, prejudicando assim o reconhecimento da endotoxina e inibindo a resposta do hospedeiro contra as bactérias gram-negativas que colonizam a superfície da úlcera.

Quando realizada a análise macroscópica, a área de úlcera foi significativamente superior no grupo de maior dose de Alogliptina a partir do 3º dia e isso se manteve até o 7º dia após ulceração, quando também foi observada média superior no grupo de dose intermediária em relação ao grupo controle. Esse mesmo achado é reforçado pela análise microscópica, em que o grupo GTA9 também apresentou escores significativamente superiores no 7º dia em relação ao grupo controle. Esses resultados apontam para um atraso da cicatrização, e esse prejuízo pode estar associado à dificuldade de resposta da imunidade inata aos microrganismos que colonizam a superfície da úlcera.

Os macrófagos residentes ou teciduais são a principal célula da imunidade inata na resposta a bactérias patogênicas. São ativados pela interação com os LPS bacterianos, através da ligação dessas moléculas bacterianas com os TLR4 presentes em sua superfície celular. Frente a um desafio microbiano, após sua ativação, os macrófagos liberam citocinas e mediadores importantes para a migração de outras células fagocitárias, como a IL-8, fator quimiotático para neutrófilos, recrutando estas células fagocitárias para o local da lesão, dando início, assim, ao combate aos microrganismos patogênicos (CARVALHO; NUDELMAN; CARNEIRO-SAMPAIO, 1998; CRUVINEL *et al.*, 2010; LORENZ *et al.*, 2002). Contudo, Ta *et al.* (2010) demonstraram, *in vitro*, que a Alogliptina é capaz de inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares U937 (macrófagos) (PRASAD *et al.*, 2020). Resultado semelhante foi observado em outro estudo utilizando a Sitagliptina, também inibidor

da DPP-4, onde o fármaco suprimiu a expressão de TLR-4 em macrófagos humanos (DAI *et al.*, 2014). Sabe-se que a inibição dos macrófagos residentes leva a um prejuízo na produção de citocinas e na quimiotaxia de neutrófilos (DAVIES *et al.*, 2013).

Neste trabalho houve uma diminuição da imunexpressão de TLR4 nos grupos que receberam as maiores doses de Alogliptina já no terceiro dia de protocolo, bem como do TLR2 no grupo de maior dose. Tal resultado culminou com uma diminuição, ao longo do protocolo experimental, na quimiotaxia dos neutrófilos, sendo significativa no sétimo dia de experimento, onde o grupo tratado com a maior dose do medicamento apresentou uma contagem significativamente inferior de células polimorfonucleares em relação ao grupo salina. A menor expressão de TLR4, através da Alogliptina, pode estar associada a diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias quimiotáticas para os neutrófilos pelos macrófagos teciduais, impedindo a chegada dos polimorfonucleares ao local da úlcera.

Os neutrófilos são uma das células mais importantes no combate às infecções bacterianas e são as primeiras células recrutadas após uma injúria tecidual. Inicialmente, são recrutados pela presença dos Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), e, posteriormente, sua quimiotaxia é amplificada em resposta aos PAMPs. Sua principal função é realizar o desbridamento da ferida, removendo células mortas e fagocitando bactérias (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Sabe-se que a neutropenia leva à maior susceptibilidade às infecções (WANG, 2018), reforçando o papel dessas células no combate a microrganismos patogênicos.

A ação dos neutrófilos no controle de infecções e na cicatrização de feridas ainda é alvo de muitos estudos e, mais recentemente, tem sido debatida na literatura a NETose, um tipo de morte celular dos neutrófilos, em que são formadas as chamadas NETs (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos). Nesse mecanismo, os neutrófilos liberam sua cromatina, além de proteínas antimicrobianas derivadas dos grânulos presentes nessas células. Os microrganismos são então expostos a essas proteínas e posteriormente eliminados. Estudos anteriores observaram que nos animais cuja formação das NETs é prejudicada, maiores são as chances de disseminação bacteriana (KOVTON *et al.*, 2018; MORTAZ *et al.*, 2018; WANG, 2018).

Tendo em vista a função primária dos neutrófilos, quando estes não conseguem debelar a colonização bacteriana e combater os microrganismos ali presentes, outras células fagocitárias são recrutadas da corrente sanguínea, como os monócitos, que irão se tornar

macrófagos inflamatórios a fim de impedir o avanço do quadro infeccioso (SILVA, 2010). Normalmente, esses macrófagos inflamatórios migram para o local da ferida logo após os neutrófilos, sendo também recrutados por PAMPs e DAMPs, e exercem a função de fagocitose de microrganismos e neutrófilos apoptóticos (HESKETH *et al.*, 2017; SORG *et al.*, 2016). No presente trabalho, as células mononucleares mostraram um aumento no 3º dia pós ulceração nos grupos tratados com as maiores doses de Alogliptina em relação ao grupo controle. Provavelmente, em virtude da menor atividade dos macrófagos teciduais e consequente diminuição da migração de neutrófilos nesses grupos, rapidamente começaram a ser recrutadas pelas demais células residentes teciduais (mastócitos, células dendríticas e células do estroma) outras células fagocíticas como os macrófagos inflamatórios, no intuito de compensar a função fagocitária que não foi realizada de forma inicial pelos neutrófilos (DAVIES *et al.*, 2013). Contudo, a ativação desses macrófagos depende também do reconhecimento do LPS pelos TLR4 (MOGHADAMM *et al.*, 2018). Uma vez que a administração de Alogliptina levou a hipoeexpressão desses receptores, a ativação dos macrófagos que migraram para o local da lesão pode ter sido também prejudicada.

Assim, a grande deficiência fagocítica pode ter contribuído para que, desde o 1º dia após a ulceração, o grupo tratado com a maior dose de alogliptina apresentasse contagem microbiológica significativamente superior na superfície da úlcera, mantendo-se até o 3º dia pós ulceração, quando o grupo de dose intermediária também apresentou maior contagem de UFC/mL em relação ao grupo não tratado.

Aparentemente, com a deficiência na quantidade de neutrófilos induzida pelo fármaco, e a consequente dificuldade em debelar os microrganismos existentes na superfície da úlcera, a lesão pode ter adquirido um caráter crônico. A colonização bacteriana exacerbada é um dos fatores que leva a um comprometimento do processo usual de cicatrização de feridas, contribuindo para a cronicidade, impedindo que se avance para as fases seguintes, de proliferação e remodelação, marcadas pela atividade e proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (DIEGELMANN; EVANS, 2004; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a; HAN; CEILLEY, 2017).

Os macrófagos ativados são uma das principais células responsáveis pela migração de fibroblastos e expressão de fatores pró-fibróticos na área da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006b; SMIGIEL; PARKS, 2018). Contudo, para que ocorra a expressão de fatores de crescimento, é preciso que os macrófagos sejam ativados e transitem para o fenótipo anti-inflamatório e pró-reparativo, sofrendo conversão para o tipo M2. Macrófagos M2

participam ativamente no processo de resolução da lesão, sendo os responsáveis pela liberação do TGF- β , que é fundamental para a migração de fibroblastos para o local da ferida (DIEGELMANN; EVANS, 2004), além de estimular a síntese de prolina, um aminoácido essencial para a produção de colágeno (SMIGIEL; PARKS, 2018). Entretanto, a inibição do TLR4 influencia na ativação dos macrófagos e consequente liberação de TGF- β por essas células. No estudo de Suga *et al.* (2014), foi demonstrado que camundongos deficientes para TLR4 apresentaram um menor número de macrófagos com expressão de TGF- β em ferida de pele. Em outro trabalho, observou-se que a inibição de TLR4 regulou negativamente a expressão de TGF- β em modelo de cicatriz hipertrófica em camundongos (LI *et al.*, 2019). Tais resultados corroboram com os achados do presente estudo, no qual o grupo que recebeu a administração da maior dose de Alogliptina mostrou uma diminuição significativa da imunoposição de TGF- β desde o 3º dia de experimento, e o grupo de dose intermediária desde o 7º dia, mantendo-se até o último dia de protocolo. O TGF- β é o principal responsável pela expressão de colágeno, de modo que a deficiência desse fator interfere de forma direta na colagênese (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Como observado neste estudo, o grupo que recebeu a maior dose do medicamento demonstrou menor deposição de colágeno, quando comparado ao grupo controle, no último dia de protocolo.

No grupo que recebeu administração da maior dose de Alogliptina foi observada maior imunoposição de CD31 desde o 1º dia após a ulceração até o último dia de experimento. Contudo, o aumento da densidade vascular, no presente estudo, não parece estar associado a um benefício concreto no processo de cicatrização da mucosa oral, tendo em vista o retardo apresentado nos grupos experimentais. Já foi demonstrado que a Alogliptina, assim como outros inibidores da DPP-4, aumenta a densidade vascular no músculo cardíaco, embora as vias envolvidas nesse processo ainda não tenham sido completamente elucidadas na literatura atual (YAMAMOTO *et al.*, 2015; LEI *et al.*, 2017). Além disso, os macrófagos ativados exercem papel importante na regulação da angiogênese, fazendo a regulação negativa desse processo. Para tanto, secretam fatores antiangiogênicos, como a endostatina, impedindo que ocorra vascularização em excesso (DU CHEYNE; TAY; SPIEGELAERE, 2019, WILKINSON; HARDMAN, 2020). A Alogliptina, portanto, pode ter contribuído para o aumento da expressão de CD31 em todos os grupos tratados em virtude do prejuízo causado à ativação dos macrófagos, interferindo na atividade regulatória dessas células.

O uso único da Alogliptina é um tratamento que não provoca hipoglicemia, como observado no presente trabalho, nem alterações significativas massa corpórea (KEATING,

2015). Porém, neste estudo, no 14º dia, os animais dos grupos que receberam as maiores doses de Alogliptina apresentaram menor ganho de massa corpórea no último dia de protocolo, em relação ao grupo tratado com solução salina. Úlceras orais são lesões extremamente dolorosas, que podem levar a um quadro de disfagia, prejudicando a ingestão alimentar (LIM *et al.*, 2015; KLEIN *et al.*, 2018). Os achados deste estudo sugerem que houve um atraso da cicatrização nos animais nos grupos de maior dose, o que culminou clinicamente em uma maior área de mucosa jugal lesionada. Assim, sugere-se que, devido à dificuldade de ingestão alimentar, houve redução da massa corpórea. Além disso, os animais do grupo tratado com a maior dose do medicamento apresentaram maiores níveis de desconforto, o que pode estar diretamente associado ao estímulo doloroso causado pela lesão intra-oral.

Finalmente, como demonstrado, o prejuízo da cicatrização das úlceras esteve associado à colonização bacteriana na superfície da ferida. Sabe-se, que nos humanos, a microbiota da cavidade oral é representada, principalmente, por bactérias do gênero *Streptococcus* (ARWEILER; NETUSCHIL, 2016; GERMANO *et al.*, 2018). Em roedores, também, são vistas bactérias dos gêneros *Streptococcus*, além de *Staphylococcus* e uma grande quantidade de outros cocos gram-positivos e gram-negativos (RODRIGUES *et al.*, 2022).

No entanto, no presente estudo, não foram realizadas metodologias detalhadas que possibilitassem a determinação do perfil microbiológico presente na superfície das úlceras bucais dos animais, configurando uma limitação desse estudo.

Pretende-se dar seguimento a esta linha de pesquisa através de trabalhos experimentais nos quais a identificação microbiana seja contemplada como também a condução de possíveis estudos observacionais.

9 CONCLUSÃO

O tratamento com Alogliptina está associado ao retardo da cicatrização de úlceras orais, provavelmente, devido menor expressão dos receptores TLR4 e TLR2 e, conseqüentemente, aumento da densidade microbiológica na superfície da úlcera de forma dose-dependente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. P. N. N. *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Goiânia, v. 14, n. 3, p.203-210, jul. 2015.
- KABEL A. M.; ARAB, H. H.; ELMAABOUD, M. A. A. Attenuation of diethyl nitrosamine-induced hepatocellular carcinoma by taxifolin and/or alogliptin: the interplay between toll-like receptor 4, transforming growth factor beta-1, and apoptosis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 10, p. 1710-1720, 12 abr. 2021.
- ANVISA. **Aprovado medicamento novo para diabetes**. 2016. Disponível em: encurtador.com.br/gjST0. Acesso em: 20 maio 2020.
- ARWEILER, N. B.; NETUSCHIL, L. The Oral Microbiota. **Microbiota of The Human Body**, p. 45-60, 2016.
- AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, O. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. **DNA and Cell Biology**, v. 28, n. 8, p.405-411, ago. 2009.
- BAO, W. *et al.* Orally administered dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (alogliptin) prevents abdominal aortic aneurysm formation through an antioxidant effect in rats. **Journal of Vascular Surgery**, v. 59, n. 4, p.1098-1108, abr. 2014.
- BASCONES-MARTÍNEZ, A.; FIGUERO-RUIZ, E.; ESPARZA-GÓMEZ, G. C. Úlceras orales. **Medicina Clínica**, v. 125, n. 15, p. 590-597, out. 2005.
- BRIZENO, L. A. C. *et al.* Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of TNF- α , IL-1 β and FGF-2. **Life Sciences**, v. 155, p.36-47, jun. 2016.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. S12-S34, jun. 2006a.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound Healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, jun. 2006b.
- CARVALHO, B. T. C.; NUDELMAN, V.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Mecanismos de defesa contra infecções. **Jornal de Pediatria**, v. 74, n. 1, p. S3-S11, 1998.
- CAVALCANTE, G. M. *et al.* Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 3, p.227-234, jun. 2011.
- CHEN, L. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Has an Essential Role in Early Skin Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 1, p. 258-267, jan. 2013.
- COCHET, F.; PERI, F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2318, 3 nov. 2017.
- CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema imunitário: parte i. fundamentos da imunidade inata

com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, ago. 2010.

DAGISTAN, S. *et al.* Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, Candida, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p.266-271, maio 2009.

DAI, Y. *et al.* DPP-4 Inhibitors Repress NLRP3 Inflammasome and Interleukin-1beta via GLP-1 Receptor in Macrophages Through Protein Kinase C Pathway. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 28, n. 5, p. 425-432, 15 jul. 2014.

DAVIES, L. *et al.* Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 986-995, 18 set. 2013.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1-3, p. 283, 2004.

DUCHEYNE, C.; TAY, H.; SPIEGELAERE, W. de. The complex TIE between macrophages and angiogenesis. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, p. 1-12, 27 nov. 2019.

EL-SAHAR, A. E. *et al.* Alogliptin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Mice Through Modulation of TLR4/MYD88/NF- κ B and miRNA-155/SOCS-1 Signaling Pathways. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 158-169, 30 out. 2020.

FERRAZ, E. G. *et al.* Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, n. 3, p.483-490, jul. 2011.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing: Histology and Physiology of Wound Healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 1, p. 85-97, jan. 2012.

GERMANO, V. E. *et al.* Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: Revisão de literatura. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 16, n. 2, p.91-99, out. 2018.

GONZALEZ, A. C. O. *et al.* Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614-620, out. 2016.

GUO, S.; DIPIETRO, L. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 5 fev. 2010.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: a review of current management and treatments. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 21 jan. 2017.

HESKETH, M. *et al.* Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1545, 17 jul. 2017.

JARVIS, C. I.; CABRERA, A.; CHARRON, D. Alogliptin. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 47, n. 11, p. 1532-1539, nov. 2013.

KEATING, G. M. Alogliptin: a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus: A Review of Its Use in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**, v. 75, n. 7, p. 777-796, 9 abr. 2015.

KILKENNY, C. *et al.* Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1577-1579, jul. 2010.

KLEIN, M. *et al.* Effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, on oral wound healing process in rats: clinical and histological evaluation. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 11, p. 2275-2281, 8 ago. 2018.

KLUNE, C. B. *et al.* Comparing the Rat Grimace Scale and a composite behaviour score in rats. **Plos One**, v. 14, n. 5, p. e0209467, maio 2019.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 25 fev. 2013.

KOVTUN, A. *et al.* Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: two sides of the same coin. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

LEI, Y. *et al.* Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibition for the Treatment of Cardiovascular Disease-Recent Insights Focusing on Angiogenesis and Neovascularization. **Circulation Journal**, v. 81, n. 6, p. 770-776, 2017.

LI, X.-P. *et al.* LPS induces activation of the TLR4 pathway in fibroblasts and promotes skin scar formation through collagen I and TGF- β in skin lesions. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 12, n. 6, p. 2121-2129, 1 jun. 2019.

LIM, Y. *et al.* Enhanced mucosal healing with curcumin in animal oral ulcer model. **The Laryngoscope**, v. 126, n. 2, p. E68-E73, 29 set. 2015.

LORENZ, E. *et al.* Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Murine Macrophage Cell Line as an In Vitro Assay System to Show TLR4-Independent Signaling of Bacteroides fragilis Lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4892-4896, set. 2002.

LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

MARINO, A. B.; COLE, S. W. Alogliptin. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 28, n. 1, p. 99-106, 13 fev. 2014.

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. **Life Sciences**, v. 243, p. 117243, fev. 2020.

MOGHADDAM, A. S. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, mar. 2018.

- MOLTENI, M.; GEMMA, S.; ROSSETTI, C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p.1-9, maio 2016.
- MORTAZ, E. *et al.* Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-4, 2 out. 2018.
- NEAL, M. D. *et al.* Discovery and Validation of a New Class of Small Molecule Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Inhibitors. **Plos One**, v. 8, n. 6, p.1-10, jun. 2013.
- NEVES, S. M. P. *et al.* **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: Fcf-Iq/usp, 2013. 234 p. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2020.
- OLCZYK, P.; MENCNER, L.; KOMOSINSKA-VASSEV, K. The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-8, 2014.
- OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, out. 2012.
- PERCIVAL, S. L.; FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Low-level laser therapy as an antimicrobial and antibiofilm technology and its relevance to wound healing. **Future Microbiology**, v. 10, n. 2, p.255-272, fev. 2015.
- PEREIRA, P. M. B.; SOUZA, S. R. B.; BITENCOURT, R. M. Prevalência e caracterização da infecção do trato urinário inferior em mulheres atendidas na atenção primária de saúde. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 9, n. 1, p.37-42, jan. 2019.
- PORTO, S. M. M. S. *et al.* Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 6, p.625-632, nov. 2007.
- PORTOU, M. J. *et al.* The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 31-36, ago. 2015.
- PRASAD, A. *et al.* Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 1-7, 15 out. 2020.
- RAHMAN, S. O. *et al.* Alogliptin reversed hippocampal insulin resistance in an amyloid-beta fibrils induced animal model of Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 889, 2020.
- RODRIGUES, M. I. Q. *et al.* Polymicrobial oral conventionalization model in mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, 4 mar. 2022.
- ROSSOL, M. *et al.* LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and

Macrophages. **Critical Reviews™ In Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011.

SAISHO, Y. Alogliptin benzoate for management of type 2 diabetes. **Vascular Health and Risk Management**, p. 229, abr. 2015.

SANTOS, W. B. *et al.* Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Revista Sobecc**, v. 21, n. 1, p. 46-51, 8 jun. 2016.

SCHEEN, A. J. Safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treating type 2 diabetes. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 4, p.505-524, jan. 2015.

SCHEMEL-SUÁREZ, M.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.; CHIMENOS-KÜSTNER, E. Úlceras orales: diagnóstico diferencial y tratamiento. **Medicina Clínica**, v. 145, n. 11, p. 499-503, dez. 2015.

SILVA, M T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 805-813, 28 jan. 2010.

SMIGIEL, K. S.; PARKS, W. C. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: recent insights. **Current Rheumatology Reports**, v. 20, n. 4, 17 mar. 2018.

SORG, H. *et al.* Skin Wound Healing: an update on the current knowledge and concepts: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1-2, p. 81-94, 15 dez. 2016.

STRBO, N.; YIN, N.; STOJADINOVIC, O. Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 492-501, jul. 2014.

SUGA, H. *et al.* TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF- β and CCL5 expression. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, n. 2, p. 117-124, fev. 2014.

TA, N. N. *et al.* DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits TLR4-mediated ERK activation and ERK-dependent MMP-1 expression by U937 histiocytes. **Atherosclerosis**, v. 213, n. 2, p.429-435, dez. 2010.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like Receptors. **Current Protocols in Immunology**, v. 109, n. 1, p. 14.12.1-14.12.10, abr. 2015.

TAKEUCHI, O. *et al.* Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443-451, out. 1999.

TEÓFILO, C. R. *et al.* Mast Cells and Blood Vessels Profile in Oral Carcinogenesis: an immunohistochemistry study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 4, p. 1097-1102, 1 abr. 2020.

WAGNER, V. P. *et al.* Effects of Copaiba Oil Topical Administration on Oral Wound Healing. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 8, p.1283-1288, jun. 2017.

WANG, J. Neutrophils in tissue injury and repair. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 531-539, 30 jan. 2018.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open Biology**, v. 10, n. 9, p. 200223, set. 2020.

XU, Y. *et al.* Discovery of novel small molecule TLR4 inhibitors as potent anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 154, p.253-266, jun. 2018.

YABE, D.; SEINO, Y. Alogliptin for the treatment of type 2 diabetes: a drug safety evaluation: a drug safety evaluation. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 15, n. 2, p. 249-264, fev. 2016.

YAMAMOTO, T. *et al.* Alogliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, regulates the atrial arrhythmogenic substrate in rabbits. **Heart Rhythm**, v. 12, n. 6, p. 1362-1369, jun. 2015.

YUAN, X. *et al.* Cinnamaldehyde accelerates wound healing by promoting angiogenesis via up-regulation of PI3K and MAPK signaling pathways. **Laboratory Investigation**, v. 98, n. 6, p. 783-798, 20 fev. 2018.

ZHAN, X.; STAMOVA, B.; SHARP, F. R. Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: a review. **Frontiers In Aging Neuroscience**, v. 10, p. 1-2, 22 fev. 2018.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DO RECEPTOR TOLL-LIKE 4 (TLR4) NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS ORAIS EM MUCOSA JUGAL DE RATAS", protocolada sob o CEUA nº 9982290120 (0001558), sob a responsabilidade de **Paulo Goberlânio de Barros Silva e equipe; Maria Imaculada de Queiroz Rodrigues; Paulo Goberlânio de Barros Silva; Manuela da Silva Moreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 08/04/2020.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF TOLL-LIKE 4 (TLR4) RECEIVER INHIBITION ON THE HEALING PROCESS OF ORAL TRAUMATIC ULCERS IN MOUSE JUGAL", utilizing 96 Heterogenics rats (96 females), protocol number CEUA 9982290120 (0001558), under the responsibility of **Paulo Goberlânio de Barros Silva and team; Maria Imaculada de Queiroz Rodrigues; Paulo Goberlânio de Barros Silva; Manuela da Silva Moreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/08/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2020** a **12/2021**

Área: **Departamento de Clínica Odontológica**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **04 a 08 semanas**

N: **96**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **180 a 220 g**

Local do experimento: **Laboratório de Patologia Bucodental da Universidade Federal do Ceará Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF)**

Fortaleza, 08 de abril de 2020

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

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