

SÉRGIO AKIRA MOROOKA

INFLUÊNCIA DO TNF- α PRODUZIDO PELA ATIVAÇÃO DO TLR7 NA
CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES ULCERADAS BUCAIS EM
CAMUNDONGOS

UNIVERSIDADE IBIRAPUERA
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SÉRGIO AKIRA MOROOKA

INFLUÊNCIA DO TNF- α PRODUZIDO PELA ATIVAÇÃO DO TLR7 NA
CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES ULCERADAS BUCAIS EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à Universidade Ibirapuera,
para obtenção do Título de Mestre, pelo Programa de
Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: BIODONTOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra.

São Paulo
2007

Catálogo na Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Universidade Ibirapuera

Morooka, Sergio Akira

Influência do TNF- α na ativação do toll like receptor 7 na cicatrização das lesões ulceradas bucais induzida em camundongos / Sergio Akira Morooka; orientador Ricardo Carneiro Borra. – São Paulo, 2007.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biodontologia) – Universidade Ibirapuera.

1. Úlcera

2. TNF- α

3. Imiquimod

CDD 617.6

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo __/__/__

Assinatura:

E-mail: sergio.morooka@gmail.com

Morooka, S. A. Influência do TNF- α produzido pela ativação "toll like receptor 7" (TLR7) na cicatrização das lesões ulceradas bucais em camundongos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2007.

São Paulo, 30/03/2007

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(s). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(s). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(s). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, **Miyuki** e **Sumino**, por tudo que me proporcionaram, sobre tudo a educação e orientações de dignidade, dedicação e determinação para com a vida.*

*Aos meus irmãos, **Jorge** e **Célio**, por estarem sempre próximos e a minha cunhada, **Maria Luiza**, pela sua compreensão.*

*À **Luciana**, que sempre me deu força com sentimentos e palavras...*

*A **Deus**, nosso poderoso arquiteto e criador do Universo.*

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra**, pela paciência, dedicação e orientação do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Getúlio Chofard**, pela oportunidade de realizar este trabalho sem nenhuma restrição, acreditando nos alunos da pós-graduação e, principalmente, no presente e no futuro desta Instituição.

À **Profa. Dra. Ana Gracinda Queluz**, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pela coordenação e organização do curso.

Ao **Prof. Dr. Sigmar de Melo Rode**, coordenador do curso de Odontologia, pela oportunidade de realizar este curso nesta Instituição.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Pannuti**, coordenador da Pós-Graduação, pelo empenho em agregar alunos e professores, todos com o mesmo intuito de realizar e finalizar este trabalho.

A todos os **Professores do Mestrado**, que colaboraram na realização deste curso, especialmente à **Profa. Dra. Miriam Rubio Faria**, sempre nos orientando dentro do laboratório e também à **Profa. Dra. Sônia Maria Gaglioti**, pela colaboração e elaboração deste trabalho.

Aos funcionários; **Adriana** e **Eduardo**, sempre nos ajudando na manipulação de produtos e deixando-nos seguros dos resultados obtidos.

À **Camila**, pela sua generosidade em organizar, verificar e contribuir com o trabalho.

À **Vanessa**, **Daniela**, **Narciso** e **Juarez**, obrigado pela companhia e companheirismo. E que Deus ilumine os nossos caminhos.

Morooka, S. A. Influência do TNF- α produzido pela ativação “toll like receptor 7” (TLR7) na cicatrização das lesões ulceradas bucais em camundongos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2007.

RESUMO

A ulceração aftosa recorrente (UAR) é considerada doença inflamatória bucal crônica que acomete entre 10 a 20% da população geral, fatores que influenciam positivamente o aparecimento da ulceração aftosa recorrente (UAR), já foram relacionados com o aumento de TNF- α , e aqueles que influenciam negativamente, com a sua diminuição. A produção de TNF- α é estimulada através da indução de receptores de membrana conhecidos como *Toll like receptors* (TLRs). Existem relatos de aparecimento de lesões ulceradas semelhantes às aftas em pacientes, sem história prévia de UAR, que fizeram uso de agonista do TLR7. Provavelmente, quando o organismo apresenta nível de TNF- α elevado, o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório, o padrão de citocinas e quimiocinas secretadas no local e o processo de cicatrização de uma úlcera evolui para um quadro semelhante ao das lesões da UAR. Para confirmar essa hipótese, lesões bucais induzidas com ácido acético em camundongos C57BL/6 submetidos ou não à ação de diferentes doses do agonista do TLR7 (imiquimod), associado ou não a um inibidor de TNF- α (pentoxifilina) foram avaliadas e comparadas com o nível sanguíneo de TNF- α em diferentes períodos. Os resultados mostraram que o imiquimod não influenciou a cicatrização das lesões, porém quando associados a pentoxifilina ele piorou a cicatrização das lesões bucais. Os níveis de TNF- α diminuíram em relação ao tempo de cicatrização das lesões em todos os grupos. Conclusão: o uso de agonista do

TLR7 não influencia significativamente o processo de cicatrização em lesões bucais de camundongos C57BL/6.

Palavras chave: UAR; TNF- α ; Imiquimod; Pentoxifilina; Cicatrização; Lesão.

Morooka, S. A. Influence of the TNF- α produced for the activation of "to like receptor 7" (TLR7) in the healing of the buccal ulcer lesion in mice [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2007.

ABSTRACT

Factors positively or negatively related to outcome of the recurrent aphthous ulceration (RAU), a chronic inflammatory buccal disease with prevalence between 10 upto 20% of word population, were associated with up- and down- regulation of TNF- α respectively. The production of TNF- α is stimulated after activation of transmembran's receptors known as toll like receptors (TLRs). Lesions resembling aphthous ulceration appear as colateral effects in patients without the disease which were exposed to TLR7 agonist. Probably, elevated level of TNF- α may influence the type, the intensity, a cytokines and chemokines profiles secreted by leucocytes at inflammatory sites producing a lesion similar to aphthous ulcer. In order to confirm such hypotese, buccal lesions induced by acetic acid in C57BL/6 mice submitted to saline solution (control) or different doses of imiquimod, a TLR7 agonist, associated or not with pentoxifylline, a TNF- α inhibitor, were evaluated and compared with serum level of TNF- α in different times. The results shown the TLR7 agonist did not influenced statistically the healing of the lesions. Quite the opposite, when that substance was associated with pentoxifylline, the healing of the buccal lesion was worse than control. The serum TNF- α level decreased as the time went on independent of group analyzed. In conclusion, the TLR7 wa not able to influence significately the healing process in a buccal ulcer C57BL/6 mice model.

Keywords: RAU; TNF-ALFA; Imiquimod; Pentoxifylline; Healing; Lesion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Software Imagelab usado para calcular a área superficial do baço.....	30
Figura 2. Software Imagelab calculando o diâmetro da úlcera e a profundidade máxima do infiltrado inflamatório.....	30
Figura 3. Fotografias de línguas dos camundongos mostrando úlceras com 3(a), 4(b) e 7(c) dias de evolução, após a indução da lesão	35
Figura 4. Imagem de corte histológico das línguas dos camundongos, coradas em HE, mostrando úlceras 3(a), 4(b) e 7(c) dias de evolução, após a indução da lesão	35
Figura 5. Corte histológico do rim em HE do animal do grupo IMI250	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de Variância – Dois Fatores.....	37
Tabela 2. Descrição estatística dos dados	37
Tabela 3. Análise da Variância – Dois Fatores.....	39
Tabela 4. Descrição estatística dos dados	39
Tabela 5. Teste de Correlação de Pearson.....	41
Tabela 6. Teste estatístico de Kruskal Wallis.....	42
Tabela 7. Correlação não paramétrica avaliada pelo Teste Estatístico de Spearman Rho	42
Tabela 8. Descrição estatística dos dados	42
Tabela 9. Descrição estatística dos dados	44
Tabela 10. Teste estatístico de Kruskal Wallis.....	44
Tabela 11. Correlação não paramétrica avaliada pelo Teste Estatístico de Spearman Rho	45
Tabela 12. Teste de correlação Spearman Rho, usando como parâmetro as variáveis histológicas	46
Tabela 13. Análise da Variância de Dois Fatores.....	52
Tabela 14. Descrição estatística dos dados	53
Tabela 15. Descrição estatística dos dados	55
Tabela 16. Teste estatístico de Kruskal Wallis - Postos.....	56
Tabela 17. Teste estatístico de Kruskal Wallis.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análise do diâmetro médio das úlceras dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2	36
Gráfico 2. Análise dos pesos dos animais dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2....	38
Gráfico 3. Relação entre o peso do animal e o diâmetro da úlcera.....	40
Gráfico 4. Análise do tamanho dos baços	41
Gráfico 5. Nível sorológico de TNF- α dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2.....	43
Gráfico 6. Correlações estabelecidas pelo teste estatístico Spearman Rho, grupo SS.....	49
Gráfico 7. Correlações estabelecidas pelo teste estatístico Spearman Rho, grupo IMI250	50
Gráfico 8. Correlações estabelecidas pelo teste estatístico Spearman Rho, grupo IMI250PTX2	51
Gráfico 9. Evolução da perda média de peso dos camundongos submetidos a diferentes doses de imiquimod.....	52
Gráfico 10. Análise de diâmetro das úlceras dos camundongos submetidos a diferentes doses de imiquimod.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UAR	Ulceração Aftosa Recorrente
μ l	Microlitros
μ m	Micrometro
μ g	Micrograma
mm	Milímetro
η m	Nanômetro
g	Gramas
%	Porcentagem
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
IL2	Interleucina 2
IL4	Interleucina 4
IL10	Interleucina 10
IL1- β	Interleucina 1 beta
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
IFN- γ	Interferon gama
TLR	Toll like receptor
LPS	Lipopolissacarídeo
HE	Hematoxilina Eosina
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
cm ²	Centímetro quadrado
kg	Kilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitros
TMB	Tetrametilbenzadina
M	Molar
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
pg	Picograma
Anticorpo RBT anti-MS TNF- α	anticorpo de coelho contra TNF- α de camundongo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. PROPOSIÇÃO	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Materiais e equipamentos	24
3.2 Animais.....	25
3.3 Grupos.....	26
3.3.1 Experimento A.....	26
3.3.2 Experimento B.....	28
3.4 Metodologia de Análises	29
3.4.1 Análise do tamanho do baço.....	29
3.4.2 Análise do diâmetro da úlcera	30
3.4.3 Histomorfometria qualitativa	31
3.4.4 Quantificação do nível de TNF- α no soro.....	32
3.5 Estatística.....	33
4. Resultados	35
4.1 Análise das lesões ulceradas dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2.....	35
4.2 Análise dos pesos dos animais dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2	38
4.3 Relação entre peso do animal e diâmetro da úlcera	40
4.4 Análise do tamanho dos baços	41
4.5 Análise do peso dos camundongos em relação a diferentes doses de imiquimod	52
4.6 Análise do diâmetro das úlceras dos camundongos submetidos a diferentes doses de imiquimod.....	55

5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO	88

1. INTRODUÇÃO

Muitas doenças inflamatórias crônicas que acometem o trato gastrointestinal caracterizam-se pela perda da capacidade de tolerância imunológica periférica e conseqüente polarização da resposta imune para o tipo Th1 (Garside *et al.*, 1999). Dentre as várias citocinas e quimiocinas que caracterizam essas doenças, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem papel central na etiopatogenia. O aumento dos níveis de TNF- α já foi associado, com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas do tipo Th1, tais como: psoríase, artrite reumatóide, espondilite anquilosante e doença de Crohn (Bonifati & Ameglio, 1999; Frassanito *et al.*, 1999; Kero *et al.*, 2001; Ehrenstein *et al.*, 2002; Hamzaoui *et al.*, 2002).

Na cavidade bucal, a ulceração aftosa recorrente (UAR), condição patológica bucal comum, caracterizada pela perda do epitélio, exposição de tecido conjuntivo subjacente e intenso infiltrado inflamatório crônico misto, está associada a uma resposta imune exagerada do tipo Th1 (Buno *et al.*, 1998; Borra *et al.*, 2004; Lewkowicz *et al.*, 2005).

As manifestações clínicas da UAR variam desde discreta ulceração que cicatriza em poucos dias, até múltiplas, profundas e dolorosas úlceras que persistem por até seis semanas (Weinberger, 1997; Porter & Scully, 2003). Até o momento, não foram descobertas as principais causas que levam ao desenvolvimento da UAR, embora inúmeros fatores locais e sistêmicos têm sido a ela associados (Scully & Flint, 1998; McCartan & Sullivan, 1992; Barnadas *et al.*, 1997; Macphail & Greenspan, 1997; Lakatos, 2000; Tuzun *et al.*, 2000; Jaber *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). O diagnóstico é realizado através da história e manifestações clínicas da

doença. Não existem exames laboratoriais para confirmação da doença. Histologicamente, a afta é representada por ulceração da mucosa oral, recoberta por exsudado fibrinopurulento e infiltrado inflamatório crônico inespecífico confinado à lâmina própria. No estágio pré-ulcerativo ocorre degeneração suprabacilar do epitélio acompanhado por infiltrado mononuclear na lâmina própria, compatíveis com as etiologias viral e imunológica (Stenman G & Heyden, 1980). À medida que a lesão progride, o epitélio sofre ulceração e o infiltrado passa a ser composto, predominantemente, por neutrófilos e linfócitos, sendo que em estágios mais avançados, por monócitos e macrófagos; ocasionalmente, também por eosinófilos. Na região periférica da úlcera, a quantidade de linfócitos e macrófagos aumenta; proporcionalmente, enquanto a de neutrófilos diminui (Natah, 2001).

Recentemente, a resposta imune anormal do tipo celular tem sido apontada como a responsável pela lesão bucal na UAR. Por motivos não determinados, antígenos presentes na microbiota bucal desencadeariam uma reação imune anormal, mediada principalmente por linfócitos T citotóxicos, contra as células epiteliais. Neste processo, o desequilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias parece representar fator fundamental para evolução da lesão (Borra *et al.*, 2004; Lewkowicz *et al.*, 2005). Muitos dos fatores que influenciam positivamente o aparecimento da UAR, tais como: estresse, medicamentos (antiinflamatórios, beta-bloqueadores), alteração hormonal, doenças sistêmicas (doença de Behçet, doença Celíaca e doença de Crohn) já foram relacionados com a expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (IFN- γ), principalmente. Por outro lado, aqueles fatores que influenciam negativamente, tais como: gravidez, tabagismo, medicamentos (tetraciclina, dexametasona, pentoxifilina, dapsona, colchicina e talidomida) foram

relacionados com a diminuição das citocinas pró-inflamatórias ou aumento das citocinas antiinflamatórias interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) (Kloppenborg *et al.*, 1995; Tsuboi *et al.*, 1995; Lagrue *et al.*, 1996; Shapira *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 1998; Rowland *et al.*, 1999; Boulinguez *et al.*, 2000; Marion *et al.*, 2000; Natah *et al.*, 2000; Elenkov & Chrousos, 2002; Plevy, 2002; Scheinberg *et al.*, 2002).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α desempenha papel central na patofisiologia da doença. Estudos já demonstraram o aumento da expressão gênica do transcrito do gene TNF- α nas lesões da UAR em comparação com as úlceras traumáticas bucais (Buno *et al.*, 1998). Pacientes com UAR apresentam níveis séricos e salivares elevados de TNF- α ; principalmente, na fase aguda em relação à fase de remissão e em relação aos indivíduos sem a doença (Boras *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Os leucócitos provenientes do sangue periférico dos portadores de UAR produzem altos níveis de TNF- α em comparação com indivíduos sem a doença (Taylor *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 2000; Lewkowicz *et al.*, 2005). A porcentagem de células inflamatórias positivas para TNF- α nas lesões de afta, analisadas por imunohistoquímica, foi maior do que nas úlceras traumáticas bucais (Natah *et al.*, 2000). Medicamentos que diminuem o nível sérico de TNF- α , tais como: levamisol, pentoxifilina e talidomida apresentam um efeito positivo no controle da doença (Calabrese & Fleischer, 2000; Chandrasekhar *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2006). O uso sistêmico de etanercept, proteína sintética que se liga ao TNF- α e bloqueia especificamente sua ação, facilita a cicatrização e a diminuição do aparecimento de lesões consideradas recalcitrantes em pacientes portadores de UAR (Robison & Guitart, 2003).

O TNF- α é considerado um dos principais mediadores inflamatórios secretados por macrófagos que, entre muitas atividades, é capaz de induzir necrose

de células tumorais, quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, aumento da atividade citotóxica dos neutrófilos, produção de colagenases e indução de apoptose. Além disso, o TNF- α induz a migração das células apresentadoras de antígeno dos tecidos para os linfonodos e estimula a secreção local de citocinas e quimiocinas que atraem e ativam as células inflamatórias com perfil de resposta imune do tipo Th1. (Bonifati & Ameglio, 1999; Frassanito *et al.*, 1999; Kero *et al.*, 2001; Ehrenstein *et al.*, 2002; Hamzaoui *et al.*, 2002).

A produção de TNF- α é estimulada através da indução de receptores da membrana celular conhecidos como *Toll like receptors* (TLRs) presentes; principalmente, nas células da linhagem macrofágica. A família dos TRLs consiste em 10 membros (TRL1 – TRL10); cada qual, com capacidade de reconhecer tipos diferentes de “padrões moleculares” conservados de bactérias, vírus, fungos e, até mesmo de proteínas dos tecidos humanos. Os TLRs exercem papel essencial na ligação da resposta imune inata com a adaptativa. A interação entre os TLRs e seus respectivos ligantes é capaz de induzir: a expressão de moléculas co-estimulatórias, a secreção de citocinas inflamatórias, a fagocitose, o processamento de antígenos e a migração dos macrófagos para os centros formadores de linfócitos (Kathryn, 2000; Barton *et al.*, 2004; Takeda & Akira, 2005; Roelofs *et al.*, 2005).

Trabalhos recentes apontam para a possibilidade de envolvimento dos TLRs na patogenia da UAR. O fato da aplicação tópica de um agonista do TLR7 (imiquimod) em mucosa labial para tratamento de queilite actínica ou papiloma provocar, como efeito colateral, lesões ulceradas semelhantes às aftas em pacientes sem história prévia de UAR, corroboraria essa hipótese. O imiquimod tem a capacidade de estimular, no sítio da aplicação, a produção de citocinas inflamatórias do tipo Th1; principalmente, TNF- α e interferon alfa (IFN- α). Provavelmente, o

aumento de expressão de TNF- α mediado pela ativação do TLR7 esteja relacionado com a patogenia dessas lesões bucais (Chakrabarty *et al.*, 2005). Os aparecimentos das ulcerações bucais surgem mesmo quando o paciente aplica o medicamento na derme. Provavelmente, através da estimulação sistêmica de interleucinas pró-inflamatórias, o imiquimod é capaz de influenciar a resposta imunológica em outros locais (Zalaudek *et al.*, 2005).

O tabagismo, considerado fator protetor para a UAR (Lagrué *et al.*, 1996; Tuzun *et al.*, 2000), tem relação com produção de TNF- α e com a baixa expressão de TLR2. Células mononucleares de indivíduos fumantes expostos aos produtos de combustão do cigarro produzem quantidades inferiores de TNF- α quando estimuladas (Ryder *et al.*, 2002). Macrófagos alveolares provenientes de pacientes com doença obstrutiva crônica e indivíduos saudáveis fumantes apresentam expressão baixa de TLR2 em relação aos não fumantes (Droemann *et al.*, 2005).

A permanência de títulos altos de TNF- α tem sido relacionada com a persistência ou diminuição da velocidade de cicatrização de lesões ulceradas. Em modelos de lesão dorsal em ratos, onde foi aplicado TNF- α na forma tópica ou intraperitoneal, foi demonstrado que a força de contração das feridas cirúrgicas e a expressão dos genes relacionados com a produção de colágeno tipo 1 α diminuam (Salomon *et al.*, 1991; Maish *et al.*, 1999; Rapala *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 2000). Aplicações intraperitoneal diárias de lipopolissacárideo (LPS), agonista do TLR4, tem sido associado, de forma dose dependente, ao aumento de TNF- α e à diminuição do tempo de cicatrização de ulceração gástrica em ratos (Konturek *et al.*, 2001).

Pelo exposto acima, existem fortes indícios que na UAR a atividade do TNF- α tenha papel fundamental na origem e evolução da doença; provavelmente, algum desequilíbrio nas vias de ativação ligadas aos TLRs poderia ser

responsabilizado pela persistência (baixa tolerância) ou hiper-expressão de TNF- α nos portadores de UAR em situações nas quais os indivíduos sem a doença, não ocorreria.

Em vista disto, propomos que a diferença de evolução entre uma úlcera traumática e uma afta esteja relacionada; principalmente, com a expressão aumentada de TNF- α . Quando, por motivos diversos, o organismo se encontra em um estado onde o nível de TNF- α está elevado; o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório, o padrão de citocinas e quimiocinas secretadas no local e o processo de cicatrização de uma úlcera evoluem para um quadro semelhante ao apresentado pelas lesões da UAR.

Para confirmar essa hipótese, propomos estudar a influência do TNF- α , estimulado pela ativação do TLR7, na evolução cicatricial de lesão ulcerada bucal. Para isso, serão realizadas lesões padronizadas no dorso da língua de camundongos submetidos ou não à ação do imiquimod e associado ou não a um inibidor de TNF- α (pentoxifilina).

2. PROPOSIÇÃO

Objetivos gerais:

Estudar a influência do TNF- α produzido pela ativação do “toll like receptor 7” na cicatrização das lesões ulceradas bucais em camundongos.

Objetivos específicos:

A-) Analisar a evolução cicatricial de lesões ulceradas em dorso de língua de camundongos C57BL/6 submetidos ao: (a) tratamento com um agonista do TLR7 (imiquimod); (b) ao tratamento com imiquimod acrescido do inibidor de TNF- α (pentoxifilina) e ao tratamento com (c) solução salina a 0,9% nos períodos de 0, 3, 4 e 7 dias, após a indução da lesão. Nestes grupos pretende-se comparar o processo cicatricial, em cada um dos intervalos de tempo, analisando-se:

- 1) Diâmetro da ulceração.
- 2) Peso dos camundongos C57BL/6.
- 3) Tamanho dos baços.
- 4) Tipo e intensidade da resposta inflamatória no local da lesão através de cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina (HE).
- 5) Nível de TNF- α no soro medido pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

B-) Estudar a relação entre a dose do agonista do TLR7 e a cicatrização das úlceras bucais. Analisar durante 9 dias, os efeitos de processo de cicatrização de lesões ulceradas induzidas pelo ácido acético no dorso de língua dos camundongos C57BL/6 submetidos a duas diferentes doses de imiquimod e

compará-los com grupo controle tratado somente com solução salina a 0,9%. Nestes grupos pretende-se estudar o processo cicatricial através da análise dos pesos dos camundongos C57BL/6 e a cicatrização final das lesões através da medida do seu diâmetro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

Para realizar os experimentos, os materiais, softwares e equipamentos utilizados foram os seguintes: Imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazol[4,5-c]quinolina- amina) na forma de creme (ALDARA[®] - Schering do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), ketamina (Dopalen – Agribrands do Brasil, Paulínia, SP, Brasil), xilazina (Anasedam - Agribrands do Brasil , Paulínia, SP, Brasil), pentoxifilina 20 mg/ml (Trental[®], Aventis Pharma Ltda, São Paulo, SP, Brasil), soro fisiológico 0,9% (Aster produtos Médicos Ltda, São Paulo, São Paulo, SP, Brasil), ácido glacial acético (Synth, Labsynth, São Paulo, SP, Brasil), papel filtro, seringa de insulina (Plascalp, São Paulo, SP, Brasil), kit *mouse TNF- α CytoSetTM* (Biosource, Camarillo, CA, EUA), tetrametilbenzadina (TMB) (Sigma-Aldrich, St Louis, Lousiania, EUA), ácido clorídrico 2N (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), balança de precisão de 0,1 g da marca Plenna modelo 06290 (Plenna, São Paulo - Brasil), microcentrífuga (CT-14000R, São Paulo, Brasil), câmera digital de 7 megapixels (Sony modelo Cybershot DSC-P200), microscópio Leica modelo ATC 2000 (Leica – Buffalo, NY – EUA) acoplado a câmera digital Nikon (modelo CoolPix 5400), leitora de microplacas (BioTek ELX – 800 – BioTek Instruments, Inc. - VT, USA), software de análise e processamento de imagens ImageLab (Diracom Bio-Informática Ltda, São Paulo, SP, Brasil), software de análise estatística SPPSS versão 11.0 (Chicago, IL, EUA) e Minitab 13.0 (State College, PA, EUA).

3.2 Animais

Como não existe nenhum modelo animal de UAR descrito, foram selecionados camundongos C57BL/6 em função dessa linhagem apresentar um perfil de resposta imunológica direcionada para o tipo Th1 e possuir nível basal e capacidade de expressão de TNF- α elevadas em relação a outras linhagens (Mills *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2004). Desta forma, procurou-se simular as principais variáveis associadas com o aparecimento e evolução da UAR.

Os camundongos C57BL/6, fêmeas, com 8 a 10 semanas de vida, pesando em média 20.5g, provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-USP) foram mantidos no biotério de manutenção da Universidade Ibirapuera com alimentação (ração comercial) e água *ad libitum* em gaiolas de 65 cm² com o fundo recoberto com maravalha. As condições de temperatura, umidade e luminosidade foram mantidas constantes. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com máximo de cinco camundongos. Todos os animais foram pesados sistematicamente antes dos experimentos, usando-se uma balança de precisão de 0,1 g da marca Plenna modelo 06290 (Plenna, São Paulo - Brasil).

Aprovação do Comitê de Ética de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado em reunião pelo Subcomitê de Ética em Pesquisa com Animais vinculados ao COEPE/UNIB.

A anestesia foi induzida pela via intraperitoneal, através da aplicação com seringa de insulina, de 100 μ l de uma solução contendo 0,116 mg/ μ L de ketamina e 0,02 mg/ μ L de xilazina (Gorska P, 2000).

Para o procedimento de eutanásia, os animais foram anestesiados com

dose quatro vezes maior do que a recomendada (60 μ l de xylazina + 60 μ l de ketamina) e através de punção cardíaca, todo o sangue foi coletado (2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia). O soro foi separado dos componentes figurados do sangue e armazenado em *freezer* a -20°C . O nível de TNF- α foi quantificado através da reação de ELISA em uma única etapa após a coleta do soro de todos os animais.

3.3 Grupos

3.3.1 Experimento A

Para comparar o efeito do agonista de TLR7 na evolução cicatricial de lesões ulceradas em dorso de língua de camundongos C57BL/6, 58 camundongos foram, previamente, pesados e divididos em quatro grupos:

- 1-) Grupo IM250 = Imiquimod 250 μ g (, N=18),
- 2-) Grupo IM250PTX2 = Imiquimod 250 μ g + pentoxifilina 2 mg (N=18),
- 3-) Grupo SS = Solução salina a 0,9% (N=18),
- 4-) Grupo CT = Controle (N=4).

Quatro camundongos do grupo CT (não estimulados) foram sacrificados no início do experimento ($t=0$) para avaliar o nível basal de TNF- α no soro e o tamanho dos baços. Nos demais grupos; uma lesão ulcerada superficial, circular de aproximadamente 2 mm, foi induzida através da aplicação de ácido acético glacial (100%) no dorso da língua. Para isso, um disco de papel filtro, cortado com instrumento “*punch*” de dois milímetros, foi embebido com 10 μ l de ácido acético glacial e foi colocado, por durante um minuto, em contato com o dorso da região

mediana da língua dos animais previamente anestesiados.

Em seguida, usando-se seringa de insulina, foi aplicado no subcutâneo dorsal dos camundongos dos grupos IMI250 e IMI250PTX2, 250 μ g da solução de imiquimod diluído em 100 μ l de solução salina a 0,9%. Nos camundongos do grupo SS foi injetado, pela via subcutânea, 100 μ l da solução salina a 0,9%. Além disso, no grupo IMI250PTX2, foi aplicado por via intraperitoneal, 100 μ l de Trental® injetável (20 mg/ μ l) contendo 2 mg de pentoxifilina. Nos grupos IMI250 e SS, foi injetado via intraperitoneal, somente 100 μ l de solução salina a 0,9%. Esse esquema de aplicação foi realizado no primeiro e no quarto dia após a indução da lesão.

No dia zero, quatro camundongos do grupo CT foram sacrificados com dose quatro vezes maior que a recomendada. Após a pesagem dos animais, o baço e o sangue foram coletados para análise. No terceiro dia após a indução da lesão, 6 animais do grupo SS, 7 animais do grupo IMI250 e 6 animais do grupo IMI250PTX2 foram pesados e sacrificados com dose de anestésico e relaxante muscular quatro vezes maior que a recomendada. Em seguida, as línguas foram removidas, fixadas em formaldeído 10% em solução tampão (fosfato salina 0,1 M pH 7,4), posteriormente, foram seccionadas longitudinalmente em dois fragmentos a partir do centro da lesão. Após 24 horas da fixação, as amostras foram processadas rotineiramente para a inclusão em blocos de parafina para obtenção dos cortes histológicos.

Após meia hora da coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente, usando uma microcentrífuga. O soro livre de células foi removido e armazenado em *freezer* -20°C até a quantificação do TNF- α . No quarto dia, foram sacrificados 4 camundongos de cada grupo e realizadas novas aplicações de 250 μ g de imiquimod , 250 μ g de imiquimod

+ 2 mg de PTX e de solução salina a 0,9%, foram realizadas. No sétimo dia, foram sacrificados 8 camundongos do grupo IMI250, 7 camundongos do grupo IMI250PTX2 e 7 camundongos do grupo SS. Os animais foram pesados, o sangue coletado, a língua e os baços retirados.

3.3.2 Experimento B

Para comparar a relação entre a dose do agonista do TLR7 e a cicatrização das úlceras bucais, 30 camundongos previamente pesados foram divididos em três grupos:

- 1-) Grupo IM250 = Imiquimod 250 μ g (, N=10),
- 2-) Grupo IM12 = Imiquimod 12 μ g (N=10),
- 3-) Grupo SS = Solução salina a 0,9% (N=10),

A lesão ulcerada superficial, circular de aproximadamente 2 mm, foi induzida através da aplicação de ácido acético glacial (100%) no dorso da língua de todos os animais. Para isso, um disco de papel filtro, cortado com instrumento “*punch*” de dois milímetros, foi embebido com 10 μ l de ácido acético glacial e foi colocado, por durante um minuto, em contato com o dorso da região mediana da língua dos animais previamente anestesiados. Em seguida, usando-se seringa de insulina, foi aplicado no subcutâneo dorsal dos camundongos dos grupos IMI250, 250 μ g da solução de imiquimod diluído em 100 μ L de solução salina a 0,9%, no grupo IMI12, 12 μ g da solução de imiquimod diluído em 100 μ L de solução salina a 0,9%, e no grupo SS, somente 100 μ l de solução salina a 0,9%. Esse esquema de aplicação foi realizado uma única vez, logo após a indução das lesões. Para esse experimento, todos os animais de cada gaiola foram individualmente marcados

através de padrões diferentes de furos nas orelhas. Do dia zero até o nono dia, após a indução das lesões, todos camundongos foram sistematicamente pesados. No 9º dia os camundongos que não morreram durante o experimento foram sacrificados. O baço e a língua dos animais foram coletados para análise quantitativa. Além disso, os principais órgãos, tais como: coração, cérebro, rim, pulmão, baço e estômago de três animais: um com peso normal do grupo SS e os dois camundongos com os menores pesos do grupo IMI250 foram enviados para autópsia no setor de Patologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM).

3.4 Metodologia de Análises

3.4.1 Análise do tamanho do baço

Os baços recém removidos foram colocados no interior de uma placa petri e fotografados com câmera digital, modelo Sony de 7 megapixels, posicionada a aproximadamente 45 cm de altura. Ao lado da placa petri, uma régua milimetrada foi usada como referência. As imagens foram transferidas para o programa ImageLab e calibradas utilizando-se as medidas da régua milimetrada. Em seguida, a área da superfície do baço foi calculada.

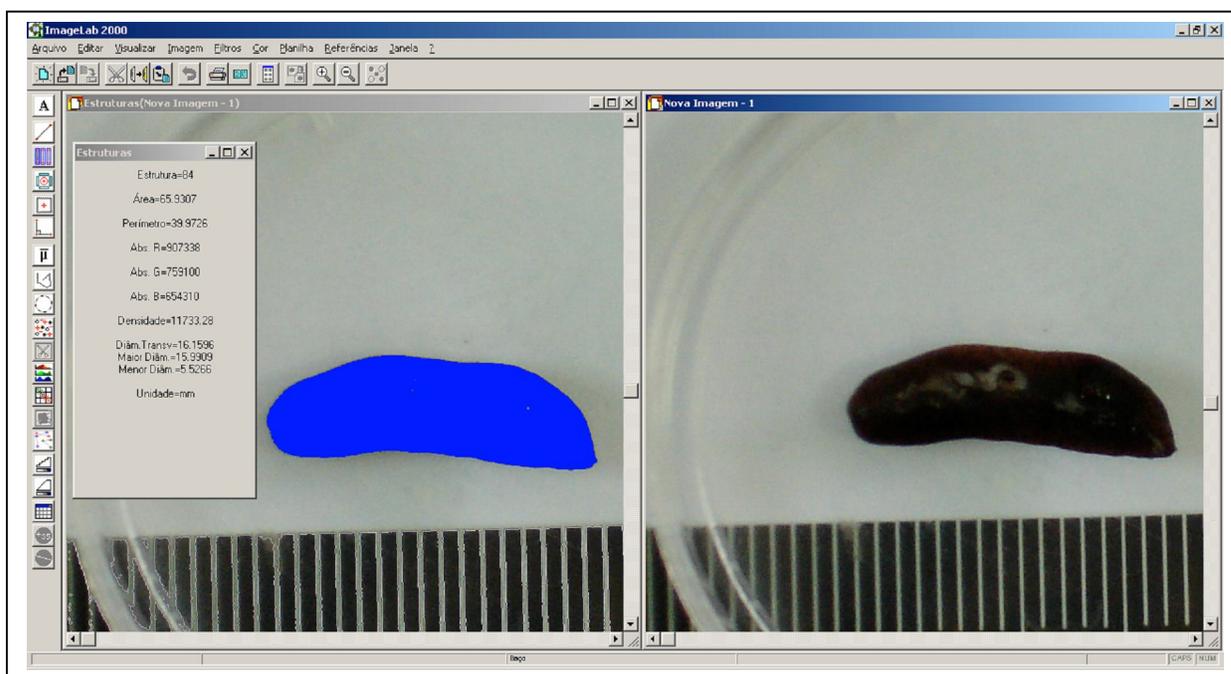


Figura 1 – Software ImageLab usado para calcular a área superficial do baço (azul).

3.4.2 Análise do diâmetro da úlcera lingual

Cinco cortes histológicos de 5 μm de espessura e corados em HE, referentes à região central de maior diâmetro das lesões ulceradas linguais, foram digitalizados usando-se o microscópio Leica, objetiva 10x, câmera digital Nikon CoolPix 5400. Para cada lâmina, uma imagem da câmera de Neubauer foi digitalizada nas mesmas condições ópticas em que as imagens das lesões foram capturadas. Após o software de análise de imagem ImageLab ter sido calibrado com as medidas da câmera de Neubauer, o diâmetro das úlceras e a profundidade do infiltrado inflamatório foram quantificados (Flanders *et al.*, 2003). Para isso, o operador assinalou na imagem as margens da úlcera e o ponto de profundidade máxima em que era possível identificar o infiltrado inflamatório. Em seguida, a média de cada lâmina foi calculada e os valores obtidos foram usados para comparação entre os grupos (Gerharz *et al.*, 2007).

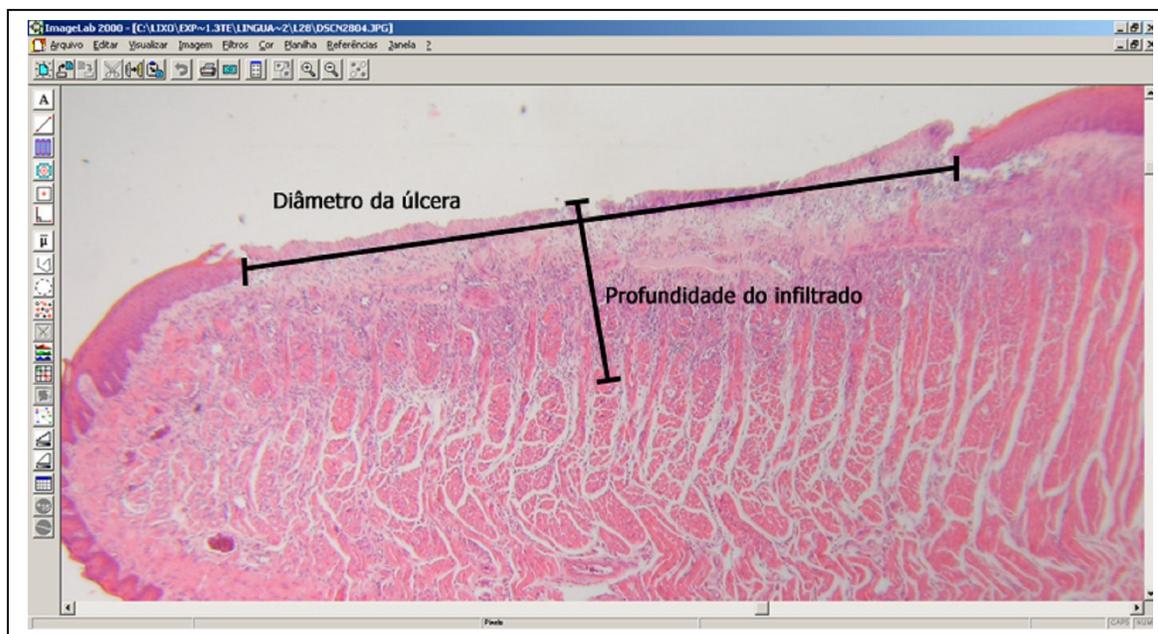


Figura 2 – Software ImageLab calculando o diâmetro da úlcera e a profundidade máxima do infiltrado inflamatório.

3.4.3 Histomorfometria qualitativa

Todos os cortes histológicos das ulcerações linguais, coradas em hematoxilina-eosina (HE), foram aleatoriamente examinados e qualificados por uma profissional especialista em histologia sem conhecimento prévio de nenhuma informação sobre a lâmina. A histologista classificou em 4 graus (0 – ausente, 1 - fraco, 2 – moderado e 3 – intenso) a intensidade do processo inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, a quantidade de vasos e fibras colágenas. Esses dados foram correlacionados, em cada um dos grupos, através do teste de estatístico Spearman Rho com: a profundidade da infiltração, o nível de TNF- α sanguíneo, o diâmetro da ulceração e o tempo (Solução salina a 0,9%, Imiquimod 250 μ g e Imiquimod 250 μ g + pentoxifilina 2 mg). As correlações, consideradas significantes, foram organizadas em tabelas e grafos, onde os vértices

representaram as variáveis, e os conectores azuis e vermelhos de diferentes larguras representaram as correlações positivas e negativas respectivamente. Os grafos dos grupos IMI250 e IMI250PTX2 foram comparados com o grafo do grupo SS. As relações que estavam presentes no grupo SS desapareceram no grupo IMI250 ou IMI250PTX, então foram representadas por linhas tracejadas. As relações que não estavam presentes no grafo SS e que apareceram em um dos dois outros grafos, foram representadas por linhas curvas.

3.4.4 Quantificação do nível de TNF- α no soro

O TNF- α foi quantificado por Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) usando-se o kit *mouse TNF- α CytoSetTM* (Biosource, Camarillo, CA, EUA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Para isso, foram preparadas as seguintes soluções tampão: Solução A (4,3 g de NaHCO₃ + 5,3 g de NaCO₃ em 1,0 L de H₂O, ajustado para pH 9,4), solução B (9,0 g NaCl + 1 mL de Tween 20 em 1 L de H₂O, ajustado para pH 7,4) e Solução C (8 g de NaCl + 1,13 g de Na₂HPO₄ + 0,2 g KCL + 5,0 g albumina bovina – fração V + 1 μ L de Tween 20 em 1 L de H₂O, ajustado para pH 7,4). A sensibilização dos poços foi realizada, diluindo-se 1,25 μ l do anticorpo RBT anti-MS TNF- α em 1 μ L da solução tampão A e adicionando-se 100 μ l dessa solução a cada poço. A placa foi incubada por 12 horas a 4°C, e após a aspiração do conteúdo, os poços foram lavados com 400 μ l da solução B. Para bloquear o sinal inespecífico, 300 μ l da solução tampão C foi adicionado aos poços e mantidos à temperatura ambiente por 1 hora. Após a remoção do bloqueador, 100 μ l das amostras desconhecidas e das soluções de TNF- α de concentrações conhecidas foram adicionadas aos poços sensibilizados. Em seguida, 50 μ l da

solução de detecção, composta por 1,0 μ l do anticorpo Hr anti-NS diluído em 1 mL da solução tampão C, foram acrescentados aos poços e deixados reagir à temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, os poços foram lavados cinco vezes com 400 μ l da solução B. Em seguida, 100 μ l da solução de estreptovidina-peroxidase, composta por 1,0 μ l de estreptovidina-peroxidase diluído em 9990 μ L da solução tampão C, foram acrescentados aos poços e deixados a reagir à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a aspiração do conteúdo e lavagem dos poços com 400 μ l da solução B por cinco vezes, 100 μ l do substrato tetrametilbenzadina (TMB) foi adicionado a cada poço e deixado reagir por 30 minutos à temperatura ambiente. Para interromper a reação de oxidação, 100 μ l da solução de HCL a 2N foi utilizada. Em seguida, os valores de absorbância, correspondente ao comprimento de onda de 450 nm, das soluções desconhecidas e das soluções de TNF- α padronizadas foram medidos em leitora de ELISA BioTek ELX – 800 . A densidade óptica foi convertida em picograma / μ L baseando-se na curva padrão das soluções de TNF- α conhecidas. Todas as amostras foram medidas em triplicata e a média foi utilizada para as comparações.

3.5 Estatística

Os testes estatísticos foram realizados usando-se os software de análise estatística SPPSS versão 11.0 (Chicago, IL, EUA) e Minitab 13.0 (State College, PA, EUA).

Para comparar as variáveis dependentes: diâmetro das úlceras, peso dos animais, tamanho dos baços em relação aos fatores grupos (SS, IMI250 e IMI250PTX2) e tempo (0, 3, 4 e 7 dias) foi utilizado o teste estatístico ANOVA de

dois fatores e teste Tukey para contraste das médias. Para as variáveis em que a normalidade dos dados (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e igualdade das variâncias (Teste de Levenes) que não puderem ser comprovadas; foi usado o teste estatístico de Kruskal Wallis.

Para correlacionar as variáveis peso e diâmetro das úlceras foi usado o gráfico de dispersão e o teste de Pearson.

As variáveis: profundidade do infiltrado inflamatório, nível de TNF- α sanguíneo, diâmetro da ulceração, profundidade da infiltração, tempo, índices representando a quantidade de células mononucleares, células polimorfonucleares, fibras colágenas e de vasos, foram correlacionadas separadamente em cada um dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2, através do teste de estatístico Spearman Rho.

4. RESULTADOS

4.1 Análise das lesões ulceradas dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2



Figura 3 – Fotografias das línguas dos camundongos mostrando úlceras com 3 (a), 4 (b) e 7 (c) dias de evolução após a indução da lesão com ácido acético.

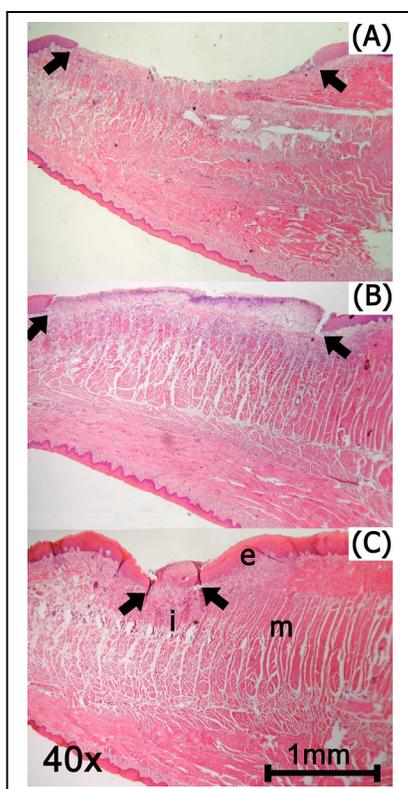


Figura 4 – Imagem de corte histológico das línguas dos camundongos, coradas em HE, mostrando úlceras com 3 (A), 4 (B) e 7 (C) dias de evolução, após a indução da lesão. Nas imagens pode-se observar região ulcerada (área entre as setas), epitélio (e), infiltrado inflamatório (i) e fibras musculares (m).

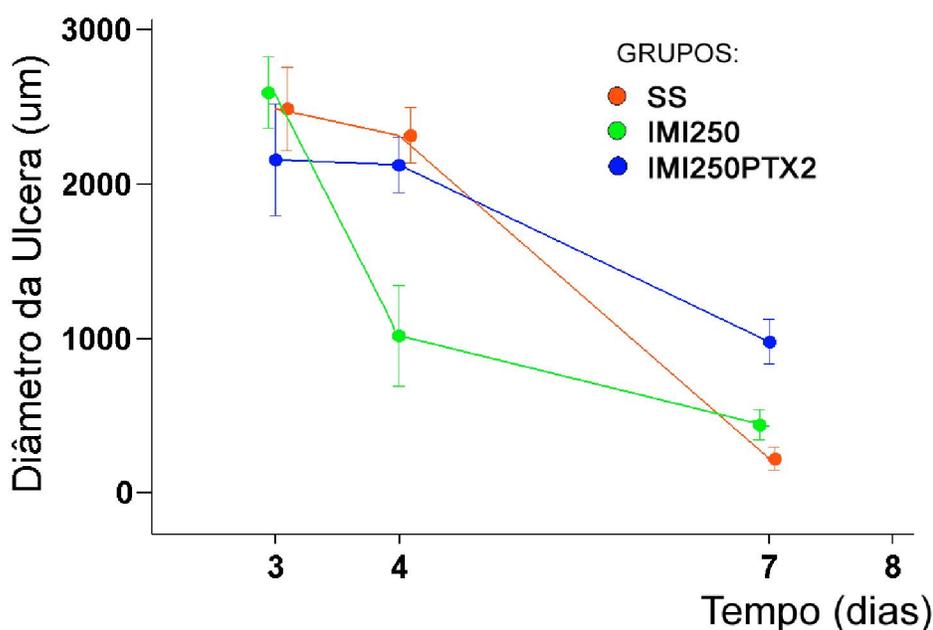


Gráfico 1 – Diâmetro médio das úlceras dos grupos SS (vermelho), IMI250 (verde) e IMI250PTX2 (azul) entre o 3^o e o 7^o dia após a indução das lesões. Cada ponto do gráfico representa a média \pm erro padrão da média.

Para a aplicação do teste ANOVA de Dois Fatores, os valores dos diâmetros das úlceras foram transformados aplicando-se a raiz quadrada. Esta transformação foi necessária para garantir a igualdade de variância entre os diversos grupos. A igualdade de variância foi testada através do teste de Levenes ($p=0,493$). Para identificar as diferenças significantes entre os diversos tratamentos em cada dia, foi usado o teste estatístico de Tukey. Foram consideradas diferenças significantes quando $p<0,05$ (*) ou muito significante quando $p<0,01$ (**).

Tabela 1 - Análise de Variância – Dois Fatores

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Tempo	2	8653,2	7971,7	3985,8	68,97	0,000**
Grupo	2	376,9	441,4	220,7	3,82	0,030*
Tempo*Grupo	4	1642,7	1642,7	410,7	7,11	0,000**
Erro	43	2485,1	2485,1	57,8		
Total	51	13157,9				

Tabela 2 – Descrição estatística dos dados

Grupos	Parâmetros (diâmetro da úlcera)	Tempo (dias)		
		3	4	7
SS	Média	2486,1	2311,8	220,3
	Desvio Padrão	660,3	359,1	209,4
	n	6	4	8
	Erro Pad. da Média	269,6	179,5	74,0
IMI250	Média	2578,3	1016,7 ^{a*,b}	428,0
	Desvio Padrão	611,1	655,6	258,4
	n	7	4	7
	Erro Pad. da Média	231,0	327,8	97,7
IMI250PTX2	Média	2156,0	2122,8 ^c	976,6 ^{c**,d}
	Desvio Padrão	883,1	361,6	358,2
	n	6	4	6 ⁺
	Erro Pad. da Média	360,5	180,8	146,2

+: 1 óbito durante o experimento;

Pelo teste estatístico de Tukey:

- a diferença entre IMI250 e SS é significativa, $p < 0,05$.
- a diferença entre IMI250 e IMI250PTX2 não é significativa, $p = 0,09$.
- a diferença entre IMI250PTX2 e SS é significativa, $p < 0,01$.
- a diferença entre entre IMI250PTX2 e IMI250 não é significativa, $p = 0,20$.

Os diâmetros das úlceras diminuíram, consistentemente, a partir do 3º dia até o 7º dia ($p < 0,01$). Houve diferença na velocidade de cicatrização entre os diversos grupos ($p < 0,05$), essa diferença foi influenciada pelo fator tempo ($p < 0,01$). A velocidade de cicatrização foi acentuada no grupo IMI250 até o 4ª dia. Neste

intervalo, a velocidade de cicatrização dos grupos SS e IMI250PTX2 foram semelhantes. O diâmetro das úlceras no grupo IMI250 foi maior do que no grupo SS ($p < 0,05$) e também maior do que no grupo IMI250PTX2 ($p = 0,098$), apesar desta última comparação não ser considerada estatisticamente significativa.

A partir do 4^o dia, a velocidade de cicatrização do grupo SS foi maior do que os demais grupos. Neste período, a velocidade de cicatrização dos grupos IMI250 e IMI250PTX2 foram semelhantes. Com isso, no 7^o dia, o diâmetro da úlcera do grupo SS ($p < 0,01$) foi menor que o do grupo IMI250PTX2 ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos SS e IMI250 ($p = 0,659$), e entre este e o grupo IMI250PTX2 ($p = 0,20$).

4.2 Análise dos pesos dos animais dos grupos SS, IMI250 e IMI250PTX2

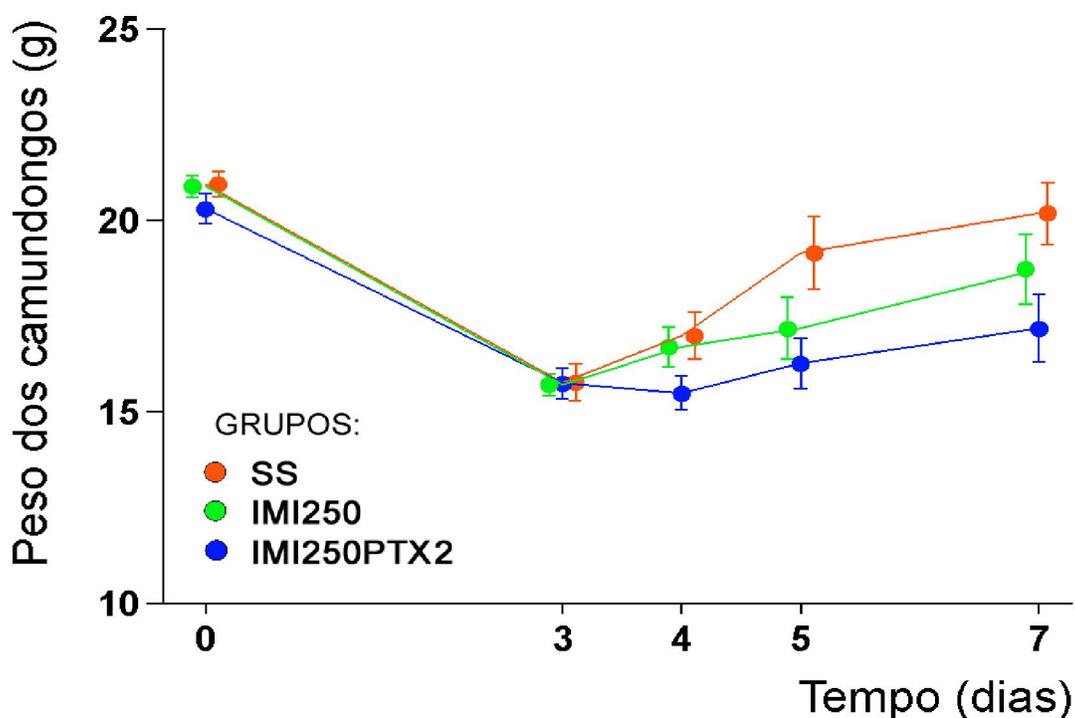


Gráfico 2 – Evolução do peso dos camundongos com lesões linguais induzidas por ácido acético e dos grupos SS (vermelho), IMI250 (verde) e IMI250PTX2 (azul).

Cada ponto do gráfico representa a média do grupo \pm Erro padrão da média.

Tabela 3 - Análise de Variância – Dois Fatores

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Tempo	4	948,45	947,08	236,77	68,99	0,000**
Grupo	2	41,73	71,80	35,90	10,46	0,000**
Tempo*Grupo	8	43,35	43,35	5,419	1,58	0,133
Erro	195	669,25	669,25	3,432		
Total	209	1702,78				

A Igualdade de variância dos grupos foi testada através do teste de Levenes

($p=0,166$).

Tabela 4 – Descrição estatística dos dados

Grupos	Parâmetros	Tempo (dias)				
		0	3	4	5	7
SS a**	Média	20,93	15,75	16,97	19,13	20,17
	Desvio Padrão	1,69	2,06	2,12	2,69	2,28
	n	27	18	12	8	8
	Erro Pad. da Média	0,32	0,48	0,61	0,95	0,80
IMI250	Média	20,88	15,69	16,68	17,17	18,71
	Desvio Padrão	1,46	1,19	1,72	2,11	2,39
	n	26	18	11	7	7
	Erro Pad. da Média	0,28	0,28	0,52	0,80	0,90
IMI250PTX2	Média	20,29	15,73	15,47	16,25	17,17
	Desvio Padrão	1,99	1,66	1,47	1,75	2,35
	n	26	17	11	7	7
	Erro Pad. da Média	0,39	0,40	0,44	0,66	0,89

a** Teste estatístico de Tukey HSD - A variação do peso médio dos camundongos do grupo tratamento SS foi considerado estatisticamente diferente do grupo IMI250PTX2 ($p<0,01$).

A análise estatística ANOVA Dois Fatores mostrou que a variação de peso é influenciada pelos fatores tempo ($p<0,01$) e grupo ($p<0,01$). Todos os grupos

apresentaram uma perda média de peso máximo em torno de 23% no terceiro dia. A partir dessa data, os pesos dos animais foram se recuperando paulatinamente. O grupo SS apresentou um ganho maior em relação ao IMI250PTX2 ($p < 0,01$). Embora os ganhos médios de peso do grupo SS fossem maiores que o do grupo IMI250, eles não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,30$). Entre o 5º e o 7º dia, após a indução da lesão, morreu um animal do grupo IMI250PTX2. O valor usado para representar o peso desse animal nas medidas subsequentes ao óbito foi estabelecido como sendo de 14,5 g – último peso do animal vivo.

4.3 Relação entre peso do animal e diâmetro da úlcera

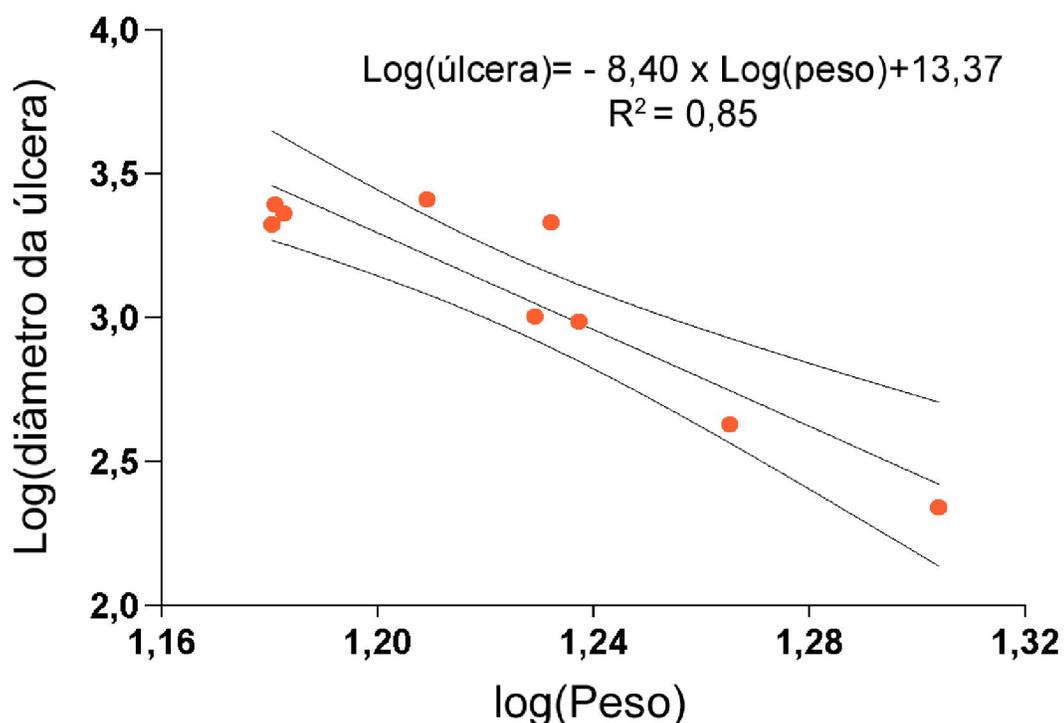


Gráfico 3 – Gráfico de dispersão mostrando a correlação do peso dos animais com o diâmetro das úlceras. Cada ponto do gráfico corresponde ao logaritmo na base 10 da média dos diâmetros das úlceras em relação ao peso, em cada grupo (SS, IMI250, IMI250PTX2), no 3º, 4º e 7º após a indução das lesões.

Tabela 5- Teste de Correlação de Pearson

	Parâmetros	Úlcera
Peso	Pearson Correlation	-0,919**
	Sig. (1-tailed)	0,000
	N	9

**Correlação significativa ao nível de 1%

O diâmetro médio das úlceras apresentou intensa correlação, inversamente proporcional, ao peso médio dos animais (Índice de correlação de Pearson = - 0,92, $p < 0,01$).

4.4 Análise do tamanho dos baços

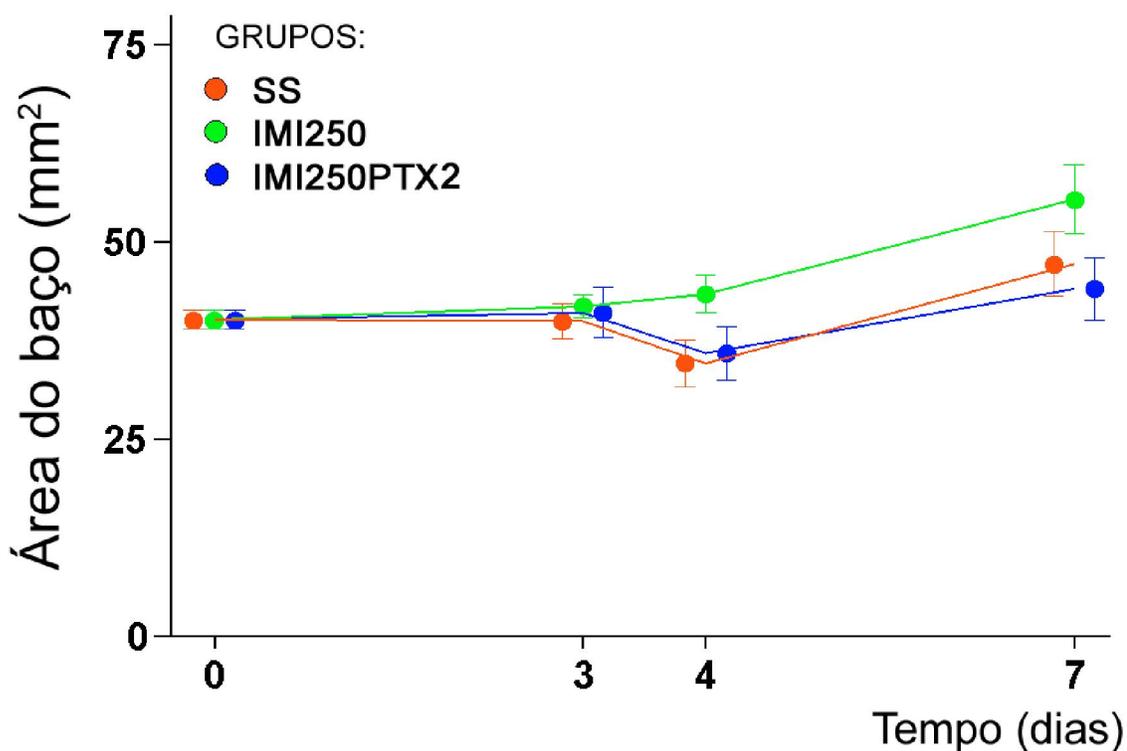


Gráfico 4 - Tamanho dos baços dos grupos SS (vermelho), IMI250 (verde) e IMI250PTX2 (azul) entre o primeiro e o 7º dia após a indução das lesões. Cada ponto do gráfico representa o tamanho médio dos baços \pm erro padrão da média, nos intervalos do experimento.

Tabela 6 – Teste estatístico de Kruskal Wallis

Grupos	Área do baço (mm²)
Qui-quadrado	3,480
Graus de liberdade	2
<i>p</i>	0,176
Tempo (dias)	Área do baço (mm²)
Qui-quadrado	13,289
Graus de liberdade	3
<i>p</i>	0,004**

Tabela 7 - Correlação não paramétrica avaliada pelo Teste Estatístico Spearman

Rho entre as variáveis Tempo (dias) x Área do baço (mm²)

Spearman's rho	Parâmetros	Área do baço (mm²)
	Coeficiente de correlação	0,315**
Tempo (dias)	<i>p</i>	0,008
	N	70

** A correlação é significativa ao nível de 0,01.

Tabela 8 – Descrição estatística dos dados

Grupos	Parâmetros (Área do baço)	Tempo (dias)			
		0	3	4	7
SS	Média	40,07	39,87	34,53	47,13
	Desvio Padrão	2,79	5,55	6,03	11,54
	<i>n</i>	6	6	4	8
	Erro Pad. da Média	1,14	2,27	3,01	4,08
IMI250	Média	40,07	41,75	43,30	55,32
	Desvio Padrão	2,79	3,93	4,77	11,66
	<i>n</i>	6	7	4	7
	Erro Pad. da Média	1,14	1,48	2,38	4,41
IMI250PTX2	Média	40,07	40,91	35,82	43,97
	Desvio Padrão	2,79	7,85	6,84	9,85
	<i>n</i>	6	6	4	6 ⁺
	Erro Pad. da Média	1,14	3,20	3,42	4,02

+: 1 óbito durante o experimento;

O peso médio dos baços apresentou uma correlação positiva com variável tempo ($p < 0,01$). O peso aumentou do dia zero até o 7º dia ($p < 0,01$). Apesar de não ser considerado significativo ($p = 0,176$), o peso médio dos baços dos camundongos submetidos ao IMI250 foi maior que os dos grupos SS ou IMI250PTX2.

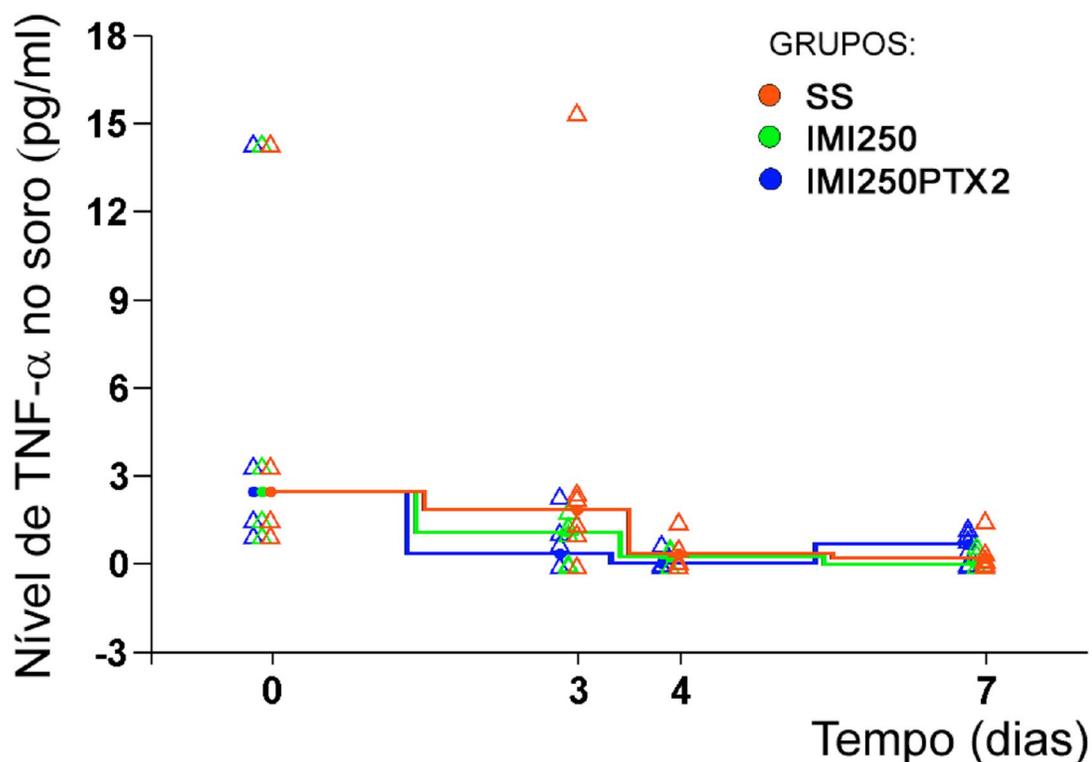


Gráfico 5 – Nível sorológico de TNF- α dos grupos SS (vermelho), IMI250 (verde) e IMI250PTX2 (azul) entre o primeiro e o 7ª dia após a indução das lesões. Os triângulos do gráfico representam as medidas de TNF- α dos camundongos realizadas individualmente nos intervalos do experimento. Cada ponto do gráfico representa a mediana dos grupos em cada um dos dias.

Tabela 9 – Descrição estatística dos dados

GRUPOS	Nível de TNF- α	Tempo (dias)			
		0	3	4	7
SS	N	4	6	4	8
	MÉDIA	5,08	3,78	0,55	0,33
	Mediana	2,47	1,85	0,36	0,20
	Erro Pad. da Média	3,13	2,36	0,34	0,18
	Desvio Padrão	6,27	5,78	0,67	0,51
IMI250	N	4	7	4	7
	MÉDIA	5,08	0,96	0,27	0,15
	Mediana	2,47	1,07	0,25	0,00
	Erro Pad. da Média	3,13	0,26	0,16	0,10
	Desvio Padrão	6,27	0,68	0,31	0,26
IMI250PTX2	N	4	6	4	6+
	MÉDIA	5,08	0,70	0,20	0,63
	Mediana	2,47	0,36	0,04	0,68
	Erro Pad. da Média	3,13	0,38	0,17	0,22
	Desvio Padrão	6,27	0,94	0,34	0,53

+: 1 óbito durante o experimento;

Tabela 10 -Teste Estatístico de Kruskal Wallis

	Tempo (dias)**	N	Mean Rank	<i>p</i>
TNF- α	0	12	52,75	0,000
	3	19	36,74	
	4	12	22,25	
	7	21	22,95	
	Total	64		
TNF- α	SS	22	35,98	0,529
	IMI250	22	29,93	
	IMI250PTX2	20	31,50	
	Total	64		

** Diferença significativa ao nível de 0,01.

Tabela 11 - Correlação não paramétrica avaliada pelo Teste Estatístico Spearman
Rho entre as variáveis Tempo (dias) x Nível de TNF- α (pg/ μ l)

Spearman Rho	Parâmetros	TNF-α (pg/ml)
Tempo (dias)	Coeficiente de correlação	-,582**
	ρ	0,000
	N	64

** A correlação é significativa ao nível de 0,01.

Os valores médios de TNF- α variaram de forma significativa e inversamente proporcional em relação à evolução da lesão ($p < 0,01$). Os níveis médios de TNF- α entre os grupos estudados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 12 – Teste de correlação Spearman Rho usando como parâmetros as variáveis histológicas: quantidade de células mononucleares, polimorfonucleares, vasos, fibras colágenas, tempo, diâmetro da úlcera, nível de TNF- α e profundidade do infiltrado inflamatório.

		Cels. Monon.	Cels. Polimorf.	Colágeno	Vasos	Tempo	Diâmetro úlcera	TNF- α	Prof. Infiltração	
Cels. Monon.	SS	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	1,000	0,299	0,580*	0,527*	0,286	0,015	-0,073	-0,065
		p	0,0	0,228	0,012	0,025	0,249	0,954	0,775	0,799
	IMI250	N	18	18	18	18	18	18	18	18
		Coef. Correlação	1,000	0,394	0,547*	0,484*	0,360	-0,146	0,063	-0,376
		p	0,0	0,106	0,019	0,042	0,142	0,562	0,804	0,124
IMI250P TX2	N	18	18	18	18	18	18	18	18	
	Coef. Correlação	1,000	-0,270	0,276	0,608*	-0,025	-0,112	0,131	-0,029	
	p	0,0	0,312	0,301	0,012	0,928	0,678	0,630	0,914	
Cels. Polimorf.	SS	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	0,299	1,000	0,228	-0,283	-0,603**	0,720**	0,402	0,759**
		p	0,228	0,0	0,362	0,255	0,008	0,001	0,099	0,000
	IMI250	N	18	18	18	18	18	18	18	18
		Coef. Correlação	0,394	1,000	0,169	0,170	-0,278	0,554*	0,321	0,235
		p	0,106	0,0	0,501	0,501	0,265	0,017	0,194	0,349
IMI250P TX2	N	18	18	18	18	18	18	18	18	
	Coef. Correlação	-0,270	1,000	0,138	-0,347	0,186	-0,094	0,016	-0,198	
	p	0,312	0,0	0,611	0,188	0,491	0,730	0,952	0,462	
Colágeno	SS	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	0,580*	0,228	1,000	0,548*	0,241	-0,130	-0,176	0,003
		p	0,012	0,362	0,0	0,019	0,336	0,607	0,486	0,989
	IMI250	N	18	18	18	18	18	18	18	18
		Coef. Correlação	0,547*	0,169	1,000	0,923**	0,694**	-0,499*	-0,222	-0,606**
		p	0,019	0,501	0,	0,000	0,001	0,035	0,376	0,008
IMI250P TX2	N	16	16	16	16	16	16	16	16	
	Coef. Correlação	0,276	0,138	1,000	0,766**	0,611*	-0,610*	0,375	-0,646**	
	p	0,301	0,611	0,0	0,001	0,012	0,012	0,153	0,007	

Continuação da Tabela 12

		Cels. Mononuclear	Cels. Polimorf.	Colágeno	Vasos	Tempo	Diâmetro úlceras	TNF- α	Profundid. Infiltração	
Vasos	SS	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	0,527*	-0,283	0,548*	1,000	0,728**	-0,554*	-0,515*	-0,492*
		p	0,025	0,255	0,019	0,0	0,001	0,017	0,029	0,038
	IMI250	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	0,484*	0,170	0,923**	1,000	0,659**	-0,456	-0,200	-0,579*
		p	0,042	0,501	0,000	0,0	0,003	0,057	0,427	0,012
IMI250PT X2	N	16	16	16	16	16	16	16		
	Coef. Correlação	0,608*	-0,347	0,766**	1,000	0,538*	-0,462	0,178	-0,434	
	p	0,012	0,188	0,001	,	0,032	0,072	0,509	0,093	
Tempo	SS	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	0,286	-0,603**	0,241	0,728**	1,000	-0,787**	-0,467	-0,818**
		p	0,249	0,008	0,336	0,001	0,0	0,000	0,051	0,000
	IMI250	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	0,360	-0,278	0,694**	0,659**	1,000	-0,850**	-0,610**	-0,935**
		p	0,142	0,265	0,001	0,003	0,0	0,000	0,007	0,000
IMI250PT X2	N	16	16	16	16	16	16	16		
	Coef. Correlação	-0,025	0,186	0,611*	0,538*	1,000	-0,658**	0,145	-0,814**	
	p	0,928	0,491	0,012	0,032	0,0	0,006	0,592	0,000	
Diâmetro úlceras	SS	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	0,015	0,720**	-0,130	-0,554*	-0,787**	1,000	0,343	0,675**
		p	0,954	0,001	0,607	0,017	0,000	0,0	0,164	0,002
	IMI250	N	18	18	18	18	18	18	18	
		Coef. Correlação	-0,146	0,554*	-0,499*	-0,456	-0,850**	1,000	0,533*	0,794**
		p	0,562	0,017	0,035	0,057	0,000	0,0	0,023	0,000
IMI250PT X2	N	16	16	16	16	16	16	16		
	Coef. Correlação	-0,112	-0,094	-0,610*	-0,462	-0,658*	1,000	-0,426	0,871**	
	p	0,678	0,730	0,012	0,072	0,006	0,0	0,099	0,000	

Continuação da Tabela 12

		Cels. Monon.	Cels. Polimorf.	Colágeno	Vasos	Tempo	Diâmetro úlcera	TNF- α	Prof. Infiltração
SS	N	18	18	18	18	18	18	18	18
	Coef. Correlação	-0,073	0,402	-0,176	-0,515*	-0,467	0,343	1,000	0,427
	p	0,775	0,099	0,486	0,029	0,051	0,164	0,0	0,078
TNF-α	N	18	18	18	18	18	18	18	18
	Coef. Correlação	0,063	0,321	-0,222	-0,200	-0,610**	0,533*	1,000	0,551*
	p	0,804	0,194	0,376	0,427	0,007	0,023	0,0	0,018
IMI250 PTX2	N	16	16	16	16	16	16	16	16
	Coef. Correlação	0,131	0,016	0,375	0,178	0,145	-0,426	1,000	-0,395
	p	0,630	0,952	0,153	0,509	0,592	0,099	0,0	0,130
SS	N	18	18	18	18	18	18	18	18
	Coef. Correlação	-0,065	0,759**	0,003	-0,492*	-0,818**	0,675**	0,427	1,000
	p	0,799	0,000	0,989	0,038	0,000	0,002	0,078	0,0
Prof. Infiltração	N	18	18	18	18	18	18	18	18
	Coef. Correlação	-0,376	0,235	-0,606**	-0,579*	-0,935**	0,794**	0,551*	1,000
	p	0,124	0,349	0,008	0,012	0,000	0,000	0,018	0,0
IMI250 PTX2	N	16	16	16	16	16	16	16	16
	Coef. Correlação	-0,029	-0,198	-0,646**	-0,434	-0,814**	0,871**	-0,395	1,000
	p	0,914	0,462	0,007	0,093	0,000	0,000	0,130	0,0

Legenda: Cels. Monon – Quantidade de Células Mononucleares; Colágeno – Quantidade de Colágeno; Cels. Polimorf – Quantidade de Células Polimorfonucleares; Vasos – Quantidade de vasos; Tempo – Período após a indução da lesão; Diâmetro Úlcera – Medida da extensão da ulceração; TNF- α – Nível de TNF- α no soro dos camundongos; Prof. Infiltração – Profundidade de Infiltração do Processo Inflamatório. * Correlação é significativa ao nível de 0,05 (bicaudal), ** Correlação é significativa ao nível de 0,01 (2- bicaudal).

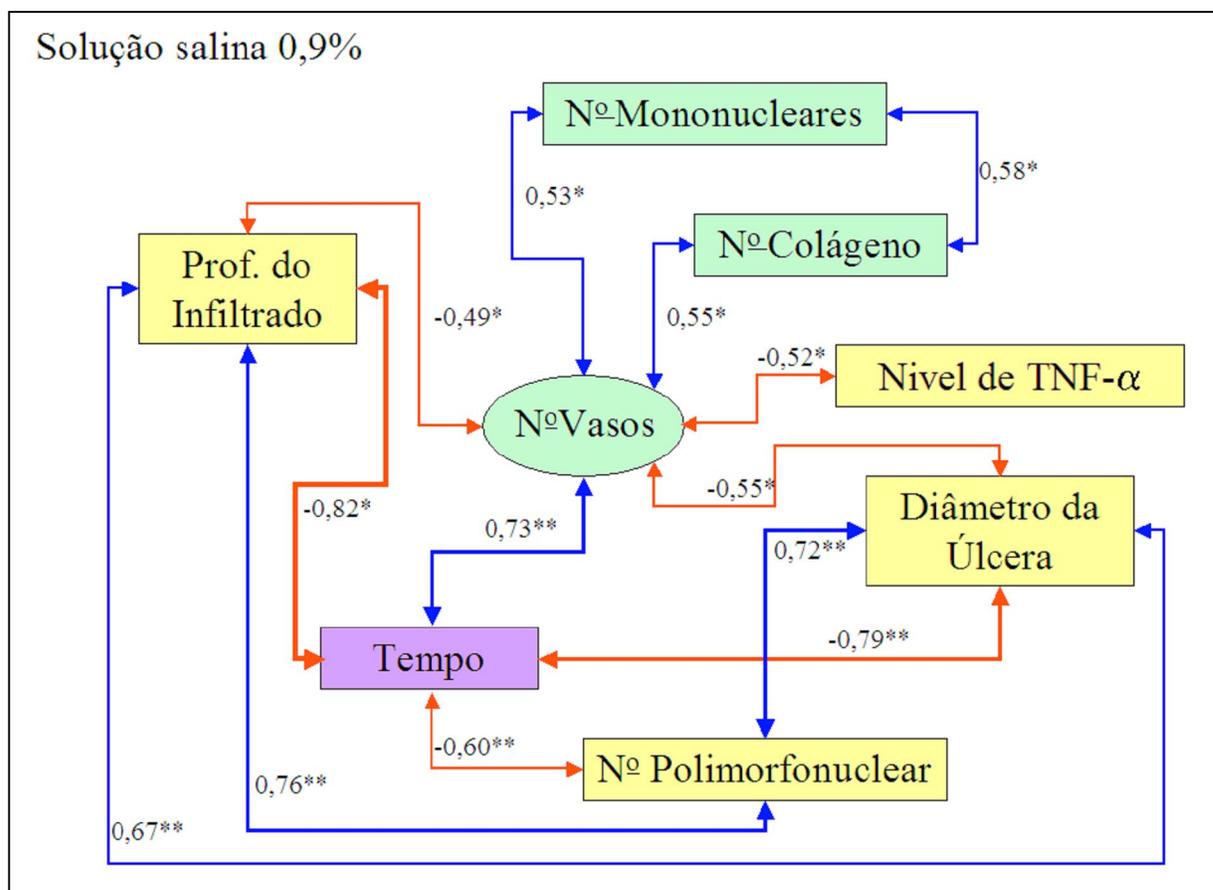


Gráfico 6 – Correlações estabelecidas pelo teste estatístico Spearman Rho entre os parâmetros medidos nos cortes histológicos do grupo SS nos 3º, 4º e 7º dias após a indução da lesão. Conectores azuis indicam correlação positiva e conectores vermelhos, correlação negativa. O número ao lado dos conectores indica o grau de correlação e o número de asteriscos a sua significância (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os parâmetros pertencentes ao subgrupo eventos agudos estão assinalados em cor amarela e os crônicos em verde. O parâmetro Nivel de TNF- α não foi classificado em crônico ou agudo.

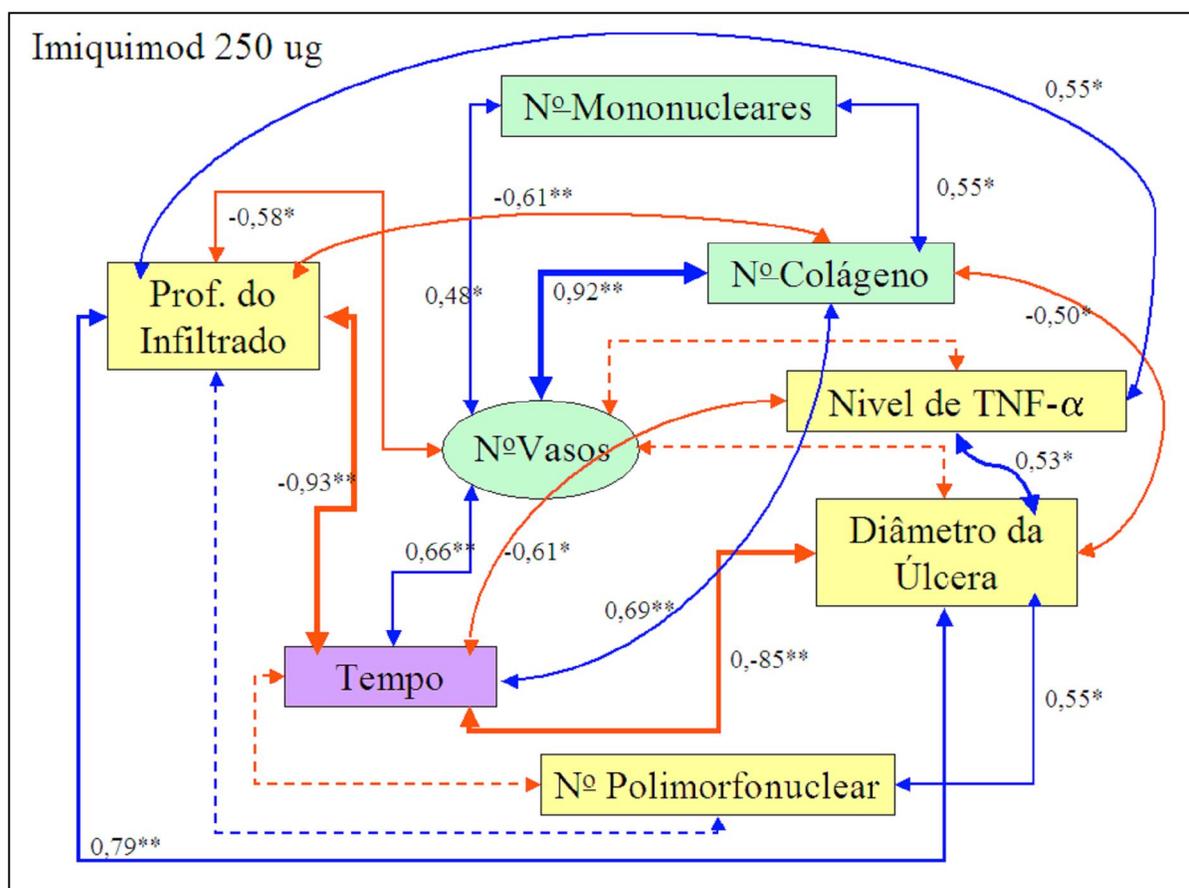


Gráfico 7 – Correlações estabelecidas pelo teste estatístico Spearman Rho entre os parâmetros medidos nos cortes histológicos do grupo IMI250 nos 3º, 4º e 7º dias após a indução da lesão. Conectores azuis indicam correlação positiva e conectores vermelhos, correlação negativa. O número ao lado dos conectores indica o grau de correlação e o número de asteriscos a sua significância (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os conectores tracejados indicam perda de correlação em relação ao grupo solução salina a 0,9%. Os parâmetros pertencentes ao subgrupo eventos agudos estão assinalados em cor amarela e os crônicos em verde.

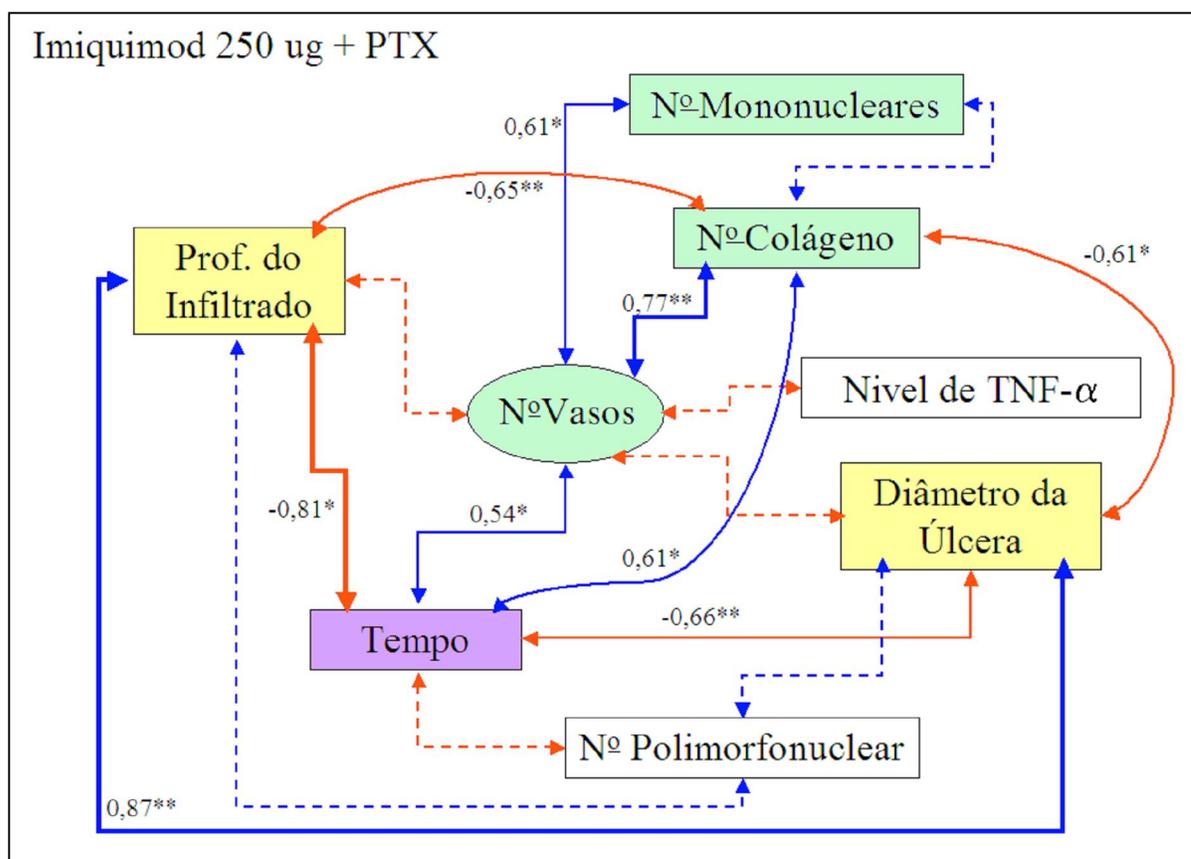


Gráfico 8 – Correlações estabelecidas pelo teste estatístico Spearman Rho entre os parâmetros medidos nos cortes histológicos do grupo IMI250PTX2 nos 3º, 4º e 7º dias após a indução da lesão. Conectores azuis indicam correlação positiva e conectores vermelhos, correlação negativa. O número ao lado dos conectores indica o grau de correlação e o número de asteriscos a sua significância (* p<0,05 e ** p<0,01). Os conectores tracejados indicam perda de correlação em relação ao grupo solução salina a 0,9%. Os parâmetros pertencentes ao subgrupo eventos agudos estão assinalados em cor amarela e os crônicos em verde.

4.5 Análise do peso dos camundongos em relação a diferentes doses de Imiquimod

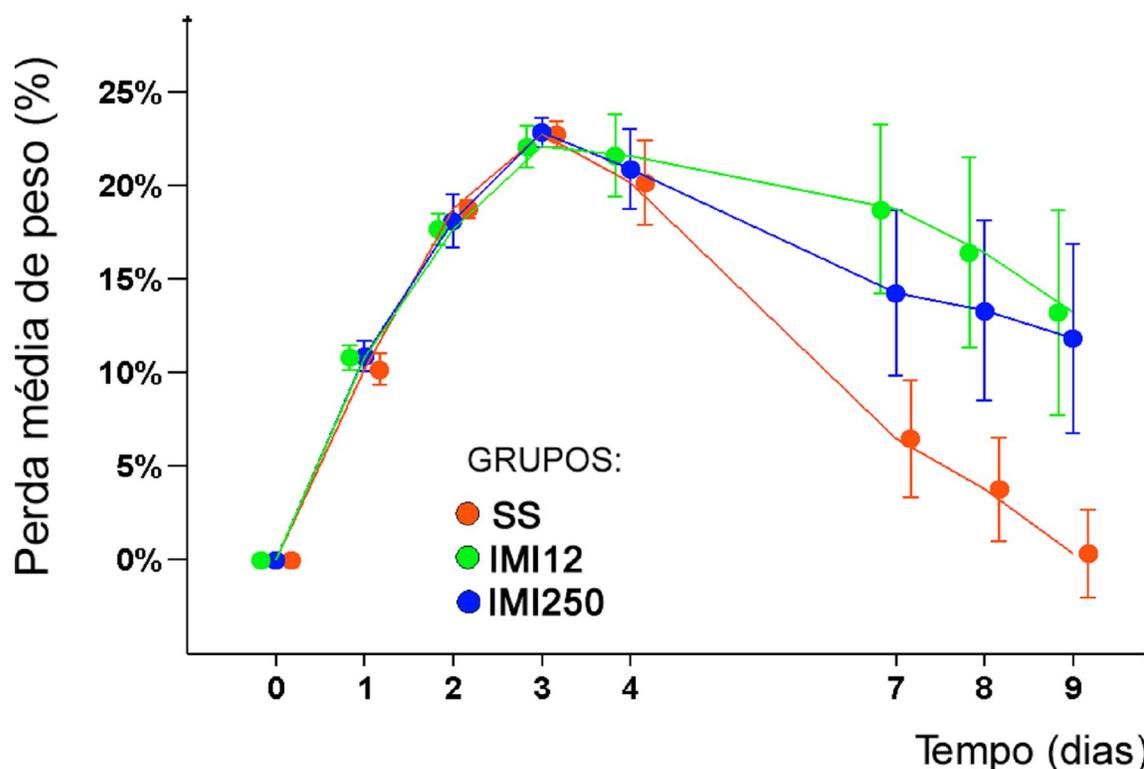


Gráfico 9 – Evolução da perda média de peso dos grupos submetidos à injeção subcutânea de solução salina a 0,9% (vermelho), 12 mg de imiquimod (verde) e 250 mg de imiquimod (azul) acompanhados por 10 dias. Cada ponto do gráfico representa a perda média do grupo no dia \pm erro padrão da média.

Tabela 13 - Análise de Variância de dois Fatores

Fonte	DF	SS	MS	F	p
Tempo	7	11343,4	1620,4	526,8575	0,000**
Grupo	2	998,5	499,2	20,6698	0,0021**
Tempo*Grupo	14	1658,4	118,4	6,3681	0,1086
Erro	216	16934,2	78,4	1,5110	
Total	239	30934,6			

Tabela 14 – Descrição estatística dos dados

Grupos	Parâmetros	Tempo (dias)							
		0	1	2	3	4	7	8	9
SS^{a*}	% Média da perda de peso	0	10,17	18,75	22,73	20,14	6,47	3,78	0,33
	Desvio Padrão	0	2,69	1,52	2,16	7,17	9,91	8,75	7,42
	n	10	10	10	10	10	10	10	10
	Erro Pad. da Média	0	0,85	0,48	0,68	2,26	3,13	2,76	2,34
IMI12	% Média da perda de peso	0	10,79	17,65	22,07	21,55	18,72	16,39	13,21
	Desvio Padrão	0	2,06	2,64	3,50	6,94	14,21	16,03	17,27
	n	10	10	10	10	10	10	10	10
	Erro Pad. da Média	0	0,65	0,83	1,10	2,19	4,49	5,06	5,46
IMI250	% Média da perda de peso	0	10,88	18,08	22,83	20,86	14,25	13,31	11,82
	Desvio Padrão	0	2,63	4,49	2,5	6,69	13,92	15,16	15,94
	n	10	10	10	10	10	10	10	10
	Erro Pad. da Média	0	0,83	1,42	0,79	2,11	4,40	4,79	5,04

a* Teste de estatístico de Tukey HSD - A perda média de peso do grupo Solução salina a 0,9% foi considerada estatisticamente diferente em relação a perda dos grupos IMI12 ($p < 0,01$) e IMI250 ($p < 0,05$).

Todos os grupos apresentaram uma perda máxima média de peso em torno de 22% no terceiro dia. A partir dessa data, os pesos dos animais foram recuperados, sendo que o grupo SS apresentou ganho mais acentuado, seguido pelos grupos IMI250 e IMI12, respectivamente. No grupo IMI12 morreu um camundongo entre o quinto e o sexto dia, o outro no oitavo dia.

Para impedir que a média do grupo fosse erroneamente elevada, caso não fosse levado em consideração, a morte dos camundongos, os pesos dos camundongos mortos foram definidos por extrapolação. O peso para o primeiro camundongo foi definido como sendo aquele que ele teria no 5º dia, e para o segundo, o que ele teria no 8º dia. Isso foi feito, determinando-se a equação linear de peso x dia para cada camundongo e calculando por extrapolação, o peso que o camundongo teria no dia seguinte ao seu óbito. As equações determinadas para ambos os camundongos apresentaram $R^2 > 0,9$, e o valor encontrado para ambos os camundongos foi de aproximadamente 9 g. Para comparar, o menor peso obtido entre todos os camundongos vivos foi de 10 g. Dessa forma, nós usamos o valor de 9 g para representar o peso dos camundongos mortos nas medidas realizadas após os óbitos.

4.6 Análise do diâmetro das úlceras dos camundongos submetidos a diferentes doses de Imiquimod

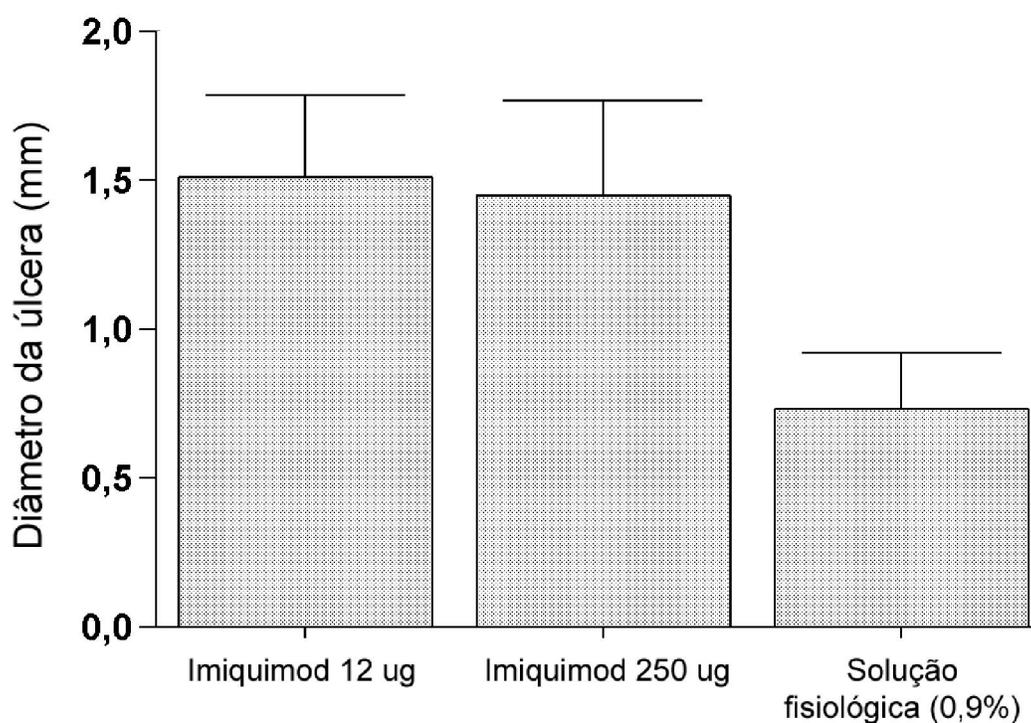


Gráfico 10 – Gráfico de barras mostrando o diâmetro médio das úlceras dos grupos IMI12, IMI250 e SS no 9º dia após a indução das lesões. Cada barra do gráfico representa a média \pm erro padrão da média.

Tabela 15 – Descrição estatística dos dados

Tratamentos	Parâmetros (diâmetro da úlcera)	Valores
SS	Média	0,73
	Desvio Padrão	0,59
	n	10
	Erro Pad. da Média	0,19
IMI250	Média	1,45
	Desvio Padrão	1,00
	n	10
	Erro Pad. da Média	0,32
IMI12	Média	1,51
	Desvio Padrão	0,77
	n	8
	Erro Pad. da Média	0,27

Tabela 16 - Teste estatístico de Kruskal Wallis - Postos

	Grupos	N	Posto médio
Diâmetro da úlcera	SS	10	9,65
	IMI12	8	18,25
	IMI120	10	16,35
	Total	28	

Tabela 17 - Teste estatístico de Kruskal Wallis

Diâmetro da úlcera	
Qui-quadrado	5,648
Graus de liberdade	2
<i>p</i>	0,059

Não houve diferença estatística entre o diâmetro médio das úlceras dos grupos SS, IMI12 e IMI250 ($p=0,059$).

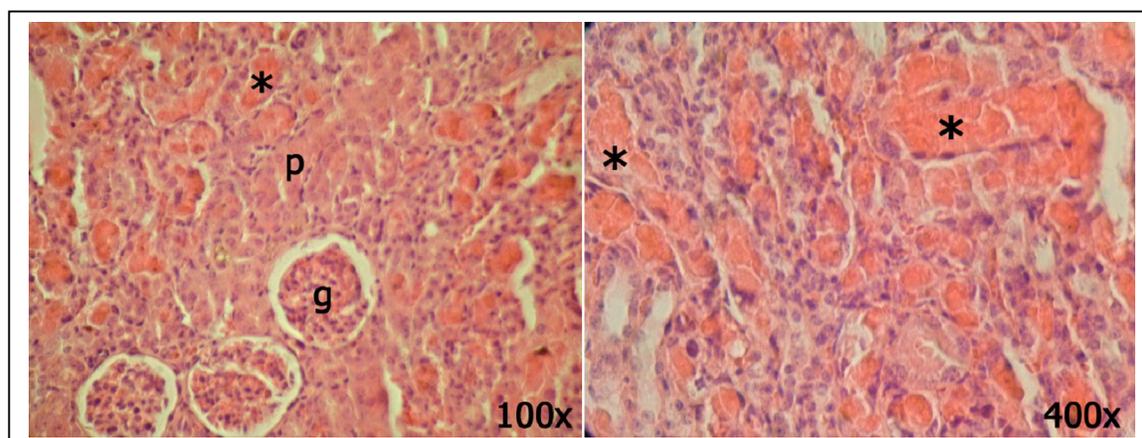


Figura 5 – Corte histológico do rim corado em HE do animal do grupo IMI250 cujo peso foi de apenas 10,0 g no momento da eutanásia. As imagens mostram comprometimento dos túbulos contornados proximais (**p**) preenchidos com material necrótico (*) e glomérulos sem grandes alterações (**g**).

5. DISCUSSÃO

Os princípios de funcionamento do Sistema Imune foram baseados na idéia de que o organismo tolera as estruturas do organismo e reage contra o que não é próprio. Entretanto, certos tecidos ou microorganismos considerados estranhos, como fetos ou bactérias do trato intestinal, não estimulam qualquer resposta do Sistema Imunológico. Esses e outros exemplos fizeram com que este paradigma fosse substituído pelo conceito do sinal de perigo, onde a reação imunológica é induzida sempre que fatores internos ou externos representem perigo para o organismo. Esse sinal pode ser desencadeado por moléculas endógenas, provenientes do próprio organismo durante processo de destruição tecidual (HSP70, fibronectina, heparan sulfato, defensinas e etc) ou exógenas de origem externa, liberadas por microorganismos ou partículas durante o processo infeccioso (LPS, zimosan, ssRNA, dsDNA, flagelina e etc). Esses sinais são reconhecidos pelos receptores identificadores de padrões; principalmente os TLRs, presentes nos diversos tipos celulares, tais como: macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T, queratinócitos, células NK, neutrófilos entre outros. A ativação específica das células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e o linfócito B) estimularia o processo de diferenciação, ativação da resposta imune adaptativa e atração de células inflamatórias para o local da reação (Anders *et. al*, 2004).

A ulceração aftosa recorrente (UAR) tem sido associada a uma resposta imune Th1 exagerada. Vários fatores que influenciam positivamente o aparecimento da UAR já foram relacionados com o aumento de TNF- α e aqueles que influenciam negativamente, com a sua diminuição (Kloppenborg *et al.*, 1995; Tsuboi *et al.*, 1995; Lagrue *et al.*, 1996; Shapira *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 1998; Rowland *et al.*, 1999;

Boulingue *et al.*, 2000; Marion *et al.*, 2000; Natah *et al.*, 2000; Elenkov & Chrousos, 2002; Plevy, 2002; Scheinberg *et al.*, 2002). A produção de TNF- α é estimulada através da indução de TLRs. Trabalhos recentes apontam para a possibilidade de envolvimento dos TLRs na patogenia da UAR. Existem relatos de aparecimento de lesões ulceradas semelhantes às aftas em pacientes, sem história prévia de UAR, e que fizeram uso de Imiquimod, medicamento agonista do TLR7. O imiquimod tem a capacidade de estimular, no sítio da aplicação, a produção de citocinas inflamatórias do tipo Th1, principalmente de TNF- α e de IFN- α . Provavelmente, o aumento de expressão de TNF- α mediado pela ativação do TLR7 esteja relacionado com a patogenia dessas lesões bucais (Chakrabarty *et al.*, 2005, ZALAUDEK *et al.*, 2005).

O Aldara[®] é um medicamento que se apresenta na forma de creme e contém como princípio ativo 12,5 mg de Imiquimod. A atividade do Imiquimod baseia-se na estimulação de uma reação inflamatória mediada pela ativação do TLR7. Em cultura de macrófagos, o Imiquimod foi capaz de induzir a produção IFN- α , TNF- α , interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 beta (IL1- β) dentro das primeiras 8 horas após a exposição. O efeito agonista do Imiquimod parece ser dose dependente, queratinócitos expostos a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aumentam a expressão dos transcritos dos genes de IL-6 e de interleucina 8 (IL-8), e quando expostos a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, diminuem a expressão dos mRNAs dessas citocinas (Sidky *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1995; Testerman *et al.*, 1995). O Imiquimod é capaz de induzir a proliferação e diferenciação de linfócitos B no baço e aumentar a proliferação de linfócitos T em resposta a mitógenos (Tomai *et al.*, 2000). Além da ação direta, o imiquimod pode induzir a secreção de citocinas que afetam outras células do sistema de imune, como; por exemplo, ativando células “natural killers” (NK) pela produção de interferons (Hart *et al.*, 2005) ou atraindo e ativando neutrófilos no sítio da

inflamação através da secreção de IL-8 produzida por macrófagos e queratinócitos em resposta ao Imiquimod (Kono *et al.*, 1994; Testerman *et al.*, 1995). Além dos efeitos pró-inflamatórios, o Imiquimod pode, seletivamente, estimular a apoptose de linhagens de células tumorais (Meyer *et al.*, 2003, Schon *et al.*, 2003).

O TNF- α , polipeptídeo de 17kd, é considerado um dos principais mediadores inflamatórios secretado por macrófagos após a ativação dos TLRs que, entre muitas atividades, é capaz de induzir necrose de células tumorais, quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, aumento da atividade citotóxica dos neutrófilos, produção de collagenases e indução de apoptose. (Bonifati & Ameglio, 1999; Frassanito *et al.*, 1999; Kero *et al.*, 2001; Ehrenstein *et al.*, 2002; Hamzaoui *et al.*, 2002).

O TNF- α , também, é capaz de inibir a produção de colágeno, influenciando negativamente o processo de cicatrização. O aumento de TNF- α , após a ingestão de aspirina, foi relacionada com o retardamento da cicatrização de úlceras bucais em ratos (Slomiany *et al.*, 2000). A aplicação local de TNF- α sobre ferida cirúrgica ou a inoculação sistêmica promovem a diminuição da resistência ao estiramento da cicatriz e a expressão de genes relacionados à produção de colágeno tipo I. Provavelmente, o TNF- α interfere com o processo de cicatrização, inibindo a síntese de colágeno. Doenças onde existe elevada expressão de TNF- α , tais como: choque tóxico por infecção gram negativa, AIDS, meningococcemia, cancer entre outras apresentam diminuição do processo de cicatrização das feridas (Salomon *et al.*, 1991). Além disso, o TNF- α tem a capacidade de influenciar a resposta imune para o tipo Th1 (Bonifati & Ameglio, 1999; Frassanito *et al.*, 1999; Kero *et al.*, 2001; Ehrenstein *et al.*, 2002; Hamzaoui *et al.*, 2002).

A pentoxifilina (PTX) é um medicamento membro do grupo das metilxantinas indicado para o tratamento das desordens circulatórias periféricas.

Além dessa atividade, as pentoxifilinas apresentam, como importante propriedade, a capacidade de inibir a síntese de TNF- α produzido durante diferentes doenças inflamatórias. A transcrição e a produção de TNF- α é inibida quando a pentoxifilina diminui a atividade da enzima fosfodiesterase não específica provocando o aumento da concentração de AMP cíclico intracelular (AMPC) (MacDonald, 1997; Colson *et al.*, 2003). Esse aumento de AMPC, através da inibição de fatores de transcrição inibe a expressão de diversos genes inflamatórios, tais como: TNF- α , IL-10 e IL1- β (Reimund *et al.*, 1997; Colson *et al.*, 2003).

Em vista disto, sugerimos que a diferença na evolução entre úlceras traumáticas e aftas esteja relacionada à expressão sistêmica aumentada de TNF- α . Quando, por motivos diversos, o organismo se encontra em um estado onde, o nível de TNF- α é alto, os padrões do infiltrado inflamatório, das citocinas e das quimiocinas secretadas no local e a evolução do processo de cicatrização das lesões ulceradas se modificam, evoluindo para um quadro semelhante ao apresentado pelas aftas.

A ulceração aftosa recorrente apesar de ser conhecida desde tempos de Hipócrates (460 a 370 AC), ainda apresenta etiopatogenia desconhecida e tratamento insatisfatório. Pode ter contribuído para essa situação, o fato de não existir modelos animais para o estudo dessa doença. Não existem registros de animais que desenvolvam úlceras bucais de forma espontânea e recorrente, tal como, ocorre nos portadores de UAR humanos. Modelos animais de UAR ainda não foram descobertos ou desenvolvidos. Provavelmente, a falta de informação para caracterizar precisamente a etiopatogenia da UAR e as dificuldades de se analisar a mucosa de animais tão pequenos como ratos e camundongos, preferidos pela facilidade do manuseio, contribuíram para essa ausência.

O desenvolvimento de modelos animais é fundamental para a aquisição de conhecimentos relacionados principalmente a etiopatogenia e ao tratamento das doenças. Os modelos animais permitem avanços significativos no campo da investigação em termos de tempo e procedimentos que, se planejados em humanos, não seriam possíveis. A seleção de modelos animais apropriados é fundamental para a obtenção de informações relevantes. O modelo selecionado deve ter comportamento clínico parecido com o quadro da doença a qual se deseja comparar. Quanto mais parecido em termos de patogenia e evolução, maior a probabilidade da informação obtida ser extrapolada para os seres humanos.

Camundongos representam um dos grupos de animais mais utilizados em experimentos de Imunologia. Apesar das duas espécies, homem e mulher, estarem separadas na escala evolutiva por 65 a 75 milhões de anos, elas diferem em apenas 300 genes. Existe boa conservação dos fenômenos biológicos entre as duas espécies, porém a extrapolação de resultados deve ser cautelosa, pois diferenças nos estilos de vida, nichos ecológicos, no tamanho e nos microorganismos patogênicos a que estão expostos podem influenciar diferentemente o fenômeno biológico estudado (Mestas & Hughes, 2004).

Os modelos de lesões traumáticas em mucosa de camundongo ou ratos representam o mais próximo que chegamos de modelos de UAR. Mesmo assim, poucos são os relatos de trabalhos científicos que fizeram uso de camundongos para estudar a cicatrização de ulcerações bucais (Slomiany *et al.*, 2002, Lomiany *et al.*, 2005). Em função disso, os modelos de ulceração gástrica e duodenal acabam servindo como fonte de informação relevante, uma vez que, ambas as doenças acometem mucosas do sistema digestivo e se manifestam como ulcerações crônicas.

Vários dos modelos desenvolvidos para simular a úlcera gástrica (Okabe & Amagase, 2005) ou úlceras bucais em ratos (Slomiany *et al.*, 2002, Lomiany *et al.*, 2005) empregam o ácido acético para produzir lesão na mucosa. Relatos da sua utilização datam desde 1969 e o seu amplo uso deve-se ao fato da simplicidade do método, da consistência no tamanho das lesões produzidas e da severidade e incidência (100%) das lesões.

Ulcerações em mucosa duodenal podem ser obtidas pela aplicação focal de ácido acético 100% na superfície mucosa por 30 a 60 segundos. A produção deste tipo de úlcera é precedida pela alteração na vasculatura e microvasculatura provocada pela injúria química. Posteriormente, na área agredida, se desenvolve necrose isquêmica que evolui para ulceração que regride em torno de 2 semanas. O ácido acético já foi utilizado para produzir ulceração bucal em ratos. A lesão produzida neste modelo surge em dois dias como resultado da necrose epitelial e cicatriza em torno de 10 dias (Slomiany *et al.*, 2002; Okabe & Amagase, 2005).

Vários fatores estão envolvidos na cicatrização dessas lesões: contração da área ulcerada, reepitelização, formação de tecido de granulação e angiogênese. A contração da área ulcerada e a reepitelização, a partir das margens da úlcera constituem eventos cruciais. Miofibroblastos já foram identificados nas bases das úlceras induzidas por ácido acético. Medicamentos, tais como: indometacina e corticosteróide, através da inibição da liberação de prostaglandinas, podem atrasar a cicatrização interferindo com a contração. Estimulação da angiogênese e proliferação epitelial promovem o aumento de velocidade de cicatrização. Fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento fibroblástico (BFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VGEF) aumentam a velocidade e a qualidade da cicatrização. Eventos de remodelação da matriz

extracelular são importantes na cicatrização, onde a produção de fibronectina, fibras colágenas tipos I, II e IV, da colagenase metaloproteinase 2 (MMP-2) e do seu inibidor, a proteína inibidora de metaproteinase tecidual tipo 1 (TIMP-1), influenciam as cicatrizações das úlceras ácido acético induzidas (Okabe & Amagase, 2005).

A linhagem de camundongos C57BL/6 é conhecida por apresentar um perfil de resposta imunológica adaptativa direcionada para o tipo Th1. Células T de camundongos C57BL/6 produzem preferencialmente interferon gama (IFN- γ) e pouca interleucina tipo 4 (IL-4). Macrófagos provenientes dessa linhagem estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) produzem grande quantidade de TNF- α e interleucina 12 (IL-12) (Watanabe *et al.*, 2004, Mills *et al.*, 2000). Sendo assim, para estudar a influência do TNF- α produzido pela ativação do “toll like receptor 7” na cicatrização das lesões ulceradas bucais, selecionamos camundongos C57BL/6 e produzimos lesão ulcerada em dorso de língua com ácido acético.

A aplicação de ácido acético 100% por 60 segundos produziu, após 2 dias, lesão ulcerada regular e superficial (Fig. 1 e 2). A variabilidade do tamanho das ulcerações foi pequena em função do ácido ser colocado em contato com a mucosa do animal usando papel de filtro de forma (circular) e tamanho (2 mm) padronizados.

Imediatamente após a aplicação do ácido sobre o dorso das línguas, dois grupos de animais foram tratados com 100 μ l de uma solução contendo 250 μ g de Imiquimod (via de aplicação subcutânea) e outro grupo com 100 μ l de solução salina a 0,9% (subcutânea). Um dos grupos tratados com Imiquimod recebeu, pela via intra-peritoneal, 200 μ l de uma solução contendo 4 mg de pentoxifilina. Os outros dois grupos receberam, pela mesma via, 200 μ l de solução salina. Esses procedimentos foram repetidos no 4^o dia após a indução da lesão. Analisando a relação entre o processo de cicatrização das úlceras linguais induzidas e a

estimulação do TLR7, observamos que a evolução cicatricial média das lesões dos grupos SS foi melhor que a do grupo IMI250PTX2. O grupo IMI250 ficou em posição intermediária.

Até o 4^o dia, o grupo IMI250 teve uma evolução cicatricial muito melhor que os demais grupos, mas por motivos desconhecidos, a partir dessa data a diminuição da ulceração não foi mais tão acentuada (Gráfico 1, Tabelas 1 e 2). Existem algumas hipóteses que poderiam ter contribuído para esse resultado: a re-aplicações de 250 µg de imiquimod (subcutâneo) e solução salina (intraperitoneal) nos camundongos restantes podem ter interferido com a cicatrização no grupo IMI250. Até o 4^o dia, a dose de imiquimod usada (250 µg) poderia estar inibindo a secreção de citocinas inflamatórias e assim melhorando o processo cicatricial, mas com a nova reaplicação, esse fenômeno pode ter sido invertido.

Animais submetidos à aplicação de doses entre 200 e 2000 µg de imiquimod, pela via oral produzem, após duas horas, pico de secreção de IFN- α . Após 24 horas, a secreção de IFN- α , praticamente, volta ao normal. A cinética da produção de TNF- α é ligeiramente diferente, em 1 hora após o estímulo, os animais secretam a maior quantidade de TNF- α , e após 4 horas, os níveis praticamente retornaram ao normal. A aplicação de doses diárias de 600 µg por cinco dias consecutivos inibe, completamente, a produção de IFN- α . Esse fenômeno de hiporesponsividade associado ao aumento da dose de Imiquimod acontece também com outros agonistas dos TLRs, tais como: LPS e complexos de poliribonucleotídeos (Poly I:C) (Reiter *et al.*, 1994).

A intenção inicial, ao utilizar pentoxifilina, foi neutralizar o TNF- α que o imiquimod estaria induzindo através da estimulação do TLR7 e assim permitir um processo de reparação da lesão semelhante ao do grupo não estimulado (solução

salina a 0,9%). Entretanto, a aplicação concomitante de 2 mg de pentoxifilina e 250 µg de imiquimod piorou o processo de cicatrização.

Especulamos que a pentoxifilina diminua o TNF- α (gráfico 4, tabela 6), principalmente até o 4º dia, mas não altere a expressão das outras citocinas pró-inflamatórias; pelo contrário, potencialize as suas ações. Este fenômeno tem explicação no fato de que o excesso de TNF- α ativa mecanismos de “*feedback*” negativos; como por exemplo, estimulando a produção de citocinas antiinflamatória IL-10, que seria responsável por diminuir a intensidade do processo inflamatório (de Waal Malefyt et al., 1991; Wanidworanun et al., 1993; Sato et al., 2003). Sem uma quantidade suficiente de IL10 para controlar a resposta inflamatória, as cicatrizações das ulcerações ficariam comprometidas. A utilização de pentoxifilina já foi associada à inibição de TNF- α e de IL-10 (Van Furth et al., 1997; Marcinkiewicz et al., 2000; Demir et al., 2006). A produção das citocinas TNF- α e IL-10 produzidas por leucócitos humanos estimulados com LPS e bactérias gram negativas mortas pelo calor diminuíram em culturas tratadas com pentoxifilina (Van Furth et al., 1997). Macrófagos de camundongos tratados com pentoxifilina produzem menor quantidade de TNF- α e IL-10 quando estimulados com LPS (Marcinkiewicz et al., 2000). Pacientes transplantados renais que foram tratados com pentoxifilina, além da medicação supressora convencional, apresentaram menor nível sanguíneo de TNF- α e IL-10 em relação ao outro grupo de pacientes tratados somente com a medicação convencional (Demir et al., 2006).

O nosso resultado foi contrário aos apresentados por Cooper et. al em 1998, que induziram colite mediada por TNF- α em camundongos da linhagem Swiss Webster e trataram com 100 mg/kg de pentoxifilina por via oral diariamente por aproximadamente 49 dias. Os autores correlacionaram a melhora da colite ao

tratamento com pentoxifilina. O tipo de resposta inflamatória neste animal é uma mistura de Th1 e Th2. Entretanto neste trabalho, o tipo de animal, o local da lesão, a dose do medicamento e a via de administração podem ter influenciado a resposta positiva da pentoxifilina. Esse fenômeno demonstra que a escolha do tipo de linhagem animal pode influenciar os resultados (Dohi *et al.*, 2000). Melgar *et. al* em 2005, mostrou que a colite desenvolvida por camundongo C57BL/6 é muito mais agressiva do que a colite da linhagem BALB/C de camundongo que apresenta uma resposta imune voltada para o tipo Th2.

Analisando a evolução dos pesos dos animais durante o experimento, observamos que os animais tiveram perda máxima de peso até o 3^o dia e após este período, ganharam peso. O grupo SS aumentou mais rapidamente de peso do que o grupo IMI250PTX2. O grupo IMI250 ficou em posição intermediária (Gráfico 2, Tabela 4). Comparando esses resultados com a evolução cicatricial das lesões ulceradas, houve grande correlação (Gráfico 3) entre essas duas variáveis (Tabela 5). Esse fenômeno; provavelmente, acontece porque a presença da lesão causa dor durante a alimentação e, provavelmente, os animais não se alimentam adequadamente neste período. À medida que a lesão cicatriza, os animais passam a se alimentar melhor e ganham peso.

A evolução do nível de $TNF\alpha$ foi avaliada durante todo o experimento, os resultados mostraram que o nível de $TNF\alpha$ tende a diminuir durante o processo de cicatrização, provavelmente em função do aumento de citocinas antiinflamatórias, tais como: a IL-10. Lesões provocadas por “punch” em língua de camundongos apresentaram um aumento de mRNA de IL-10 24 horas após o trauma, permanecendo elevado por pelo menos 3 dias. Os níveis de fator de crescimento tumoral tipo beta ($TGF-\beta$), citocina antiinflamatória, permaneceu constante no

período de 0 a 72 h em que foram quantificados. Isso demonstra que, provavelmente, a IL-10 responde pela atividade antiinflamatória da úlcera bucal, ao contrário do que acontece na pele onde o TGF- β tem papel preponderante (Szpaderska *et al.*, 2003). A quantificação da imunoexpressão de IL-10 em lesões de pele mostrou que grande parte da IL-10 presente aparece após 24 horas e é produzida por macrófagos (Zhang *et al.*, 2004). Provavelmente, essa característica se repita nas lesões da cavidade bucal.

Apesar de não haver diferenças significantes, o grupo tratado com solução salina a 0,9% apresentou os maiores valores de TNF- α e o grupo tratado com 2 mg de pentoxifilina; os menores, pelo menos até o 4^o dia. Geralmente, os valores ficaram abaixo de 6 pg/ml, com exceção de um caso do grupo SS que apresentou ao 3^o dia aproximadamente 15 pg/ml de TNF- α no soro. As maiores flutuações sanguíneas de TNF α ; provavelmente, acontecem nas primeiras 24h após o estímulo (Reiter *et al.*, 1994). Em contraste, níveis elevados de TNF α nos tecidos persistem por até uma semana após o estímulo. Esse fato explica a pouca variação observada no nível de TNF α no soro dos camundongos. A quantificação do nível de TNF α diretamente na lesão poderia trazer mais informações relevantes.

A medida do tamanho dos baços dos animais submetidos aos diversos tratamentos pode servir como parâmetro de resposta imunológica. O baço normalmente aumenta de tamanho em função da proliferação de células T e B. Após a indução da úlcera, os baços dos animais aumentaram de tamanho até o 7^o dia da análise. Observando o peso dos baços, percebemos uma tendência do grupo IMI250 em apresentar os maiores valores em comparação com os outros dois. Se esta impressão se confirmar, provavelmente a pentoxifilina inibiu o efeito estimulador do imiquimod sobre o baço.

A análise do grafo do grupo SS mostrou um padrão de inter-relações compatíveis com um processo de cicatrização normal para as condições do experimento. Neste grafo, podemos observar que existem dois tipos de eventos que se correlacionam com a variável tempo de maneira positiva ou negativa e que foram denominados de eventos crônicos e agudos, respectivamente. Os eventos agudos são representados pelos parâmetros: profundidade da infiltração, quantidade de células polimorfonucleares, diâmetro da úlcera e nível sanguíneo de TNF- α ; e os crônicos, por células mononucleares, número de colágeno e número de vasos. A divisão desses parâmetros corresponde ao que se espera de um processo de cicatrização. Numa primeira etapa, quando a lesão é induzida, existe grande quantidade de neutrófilos infiltrando a lesão e à medida que a cicatrização evolui, o diâmetro da úlcera regride, a produção de colágeno aumenta, novos vasos vão surgindo e o infiltrado neutrofílico vai sendo substituído por células mononucleares (linfócitos e monócitos) (Robins *et al.*, 2000).

Nesta análise, chama a atenção o fato da variável vaso ser o parâmetro com maior número de correlações. Este fato está em acordo com a afirmação de Okabe & Amagase, 2005 que diz que a angiogênese é um evento crucial na cicatrização dessas lesões. Provavelmente, qualquer fator que interfira positivamente ou negativamente na produção de vasos poderia retardar ou acelerar a cicatrização mais do que a interferência com os parâmetros da inflamação. O uso de inibidores de angiogênese é capaz de diminuir o processo de cicatrizações de lesões em dorso de ratos. Porém, essa inibição pode ser revertida pela aplicação de um medicamento indutor de angiogênese (Michaels *et al.*, 2005). Um indício deste fenômeno pode ser visto analisando o número de vasos nos três grupos. A quantidade de vasos aumenta de forma semelhante entre os 3 grupos até o 4^o dia.

No 7º dia, a quantidade de vasos no grupo IMI250PTX é estatisticamente, menor do que nos dois outros grupos (Teste de Kruskal Wallis; $p < 0,05$) e neste grupo, o processo de cicatrização foi pior.

Analisando-se o grafo do IMI250, observa-se que o número de células polimorfonucleares perdeu a sua correlação com o tempo e a profundidade da lesão. Isso aconteceu porque o número de polimorfonucleares manteve-se alto durante todo o processo. Provavelmente, o imiquimod aumentou a quantidade do infiltrado neutrofílico na área da lesão independente da fase da cicatrização. Os grupos que receberam imiquimod (IMI250 e IMI250PTX2) apresentaram maior número de polimorfonucleares no 7º dia em comparação com grupo SS (Teste de Kruskal Wallis; $p = 0,06$). Além disso, este aumento foi independente do tamanho da úlcera, uma vez que o grupo IMI250 não mostrou diferença significativa em relação ao grupo SS (Teste de Tukey, $p = 0,330$). A profundidade do infiltrado foi maior no grupo IMI250 no 3º dia em relação ao grupo SS (Teste de Kruskal Wallis; $p < 0,05$).

Analisando-se o grafo do IMI250PTX2, observa-se que a grande parte das correlações foram perdidas. Existe uma tendência desse grupo em apresentar níveis maiores de polimorfonucleares na fase crônica (Teste de Kruskal Wallis, $p = 0,06$), quantidade menor de vasos (Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$) e diâmetro maior da úlcera (Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,01$) no 7º dia em relação aos outros grupos.

Para verificar se a dose do imiquimod poderia interferir diferentemente na cicatrização das úlceras linguais, nós induzimos a lesão nos animais e comparamos o processo de recuperação, analisando individualmente os pesos dos camundogos tratados com a dose inicial de Imiquimod proposta (250 µg), tratados com uma dose 20 vezes menor de imiquimod (12 µg) e tratados somente com solução salina a

0,9%. Neste experimento, a medicação foi somente aplicada no dia da indução das lesões. As análises mostraram resultados semelhantes ao do primeiro experimento. Todos os grupos tiveram uma perda máxima média de peso até o terceiro dia. A partir daí, os animais de todos os grupos recuperam gradativamente os pesos. O grupo SS (solução salina a 0,9%) ganhou peso mais rapidamente que os demais (Gráfico 7, Tabela 10 e 11). Em relação ao padrão de ganho de peso, apesar do grupo IMI12 não ser considerado estatisticamente diferente do grupo IMI250, neste grupo morreram dois camundongos. O que chama a atenção é o fato da dose do medicamento ter sido diminuída 20 vezes, e mesmo assim, o efeito biológico se manifestar com maior intensidade. Isso indica que 250 µg é uma dose alta. Este nível de imiquimod poderia até mesmo estar inibindo a secreção de citocinas inflamatórias (Reiter *et al.*, 1994).

A análise do diâmetro das úlceras mostrou uma tendência acentuada do diâmetro das lesões do grupo solução salina a 0,9% ($p=0,059$) serem menores do que os dois grupos tratados com imiquimod no 9º dia após a indução das lesões (Gráfico 8, Tabela 12 e 13).

No grupo IMI250, os principais órgãos: coração, pulmão, sistema nervoso central, estômago e rins; de dois animais que aparentava estado debilitado e cujo peso eram 10,0 g e 13,2 g, e de um camundongo, aparentemente saudável, do grupo solução salina a 0,9%, cujo peso foi de 16,3 g, foram examinados por patologista médico experiente (Dr. Marcello Franco – UNIFESP/EPM). A autópsia dos animais comprometidos mostrou lesões nos rins classificadas como necrose tubular aguda do tipo tóxica (Figura 4) e a autópsia do animal usado como controle não mostrou nenhuma alteração nos órgãos examinados.

Apesar de não haver relatos na literatura sobre a toxicidade do Imiquimod, a dose de 250 μg aparentemente foi suficiente para provocar lesão renal em alguns camundongos. Células dos túbulos renais expressam constitutivamente pelo menos, os TLR1, 2, 3, 4 e 6. Existe a hipótese de que a ativação desses receptores nessas células poderia levar a secreção de citocinas inflamatórias que propiciaria ao surgimento de deficiência renal aguda (Anders *et al.*, 2004). Em endotoxemia, trabalhos indicam que a deficiência renal aguda, mediada por necrose tubular, pode ser causada pela hiperexpressão de TNF- α , e a administração de inibidores de TNF- α , tais como pentoxifilina nesta situação, poderia proteger o organismo do colapso do sistema renal (Cunningham *et al.*, 2002; Ramesh & Reeves *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2006). Em função dessas informações; provavelmente, a necrose tubular aguda, diagnosticada nos animais debilitados, pode ter sido induzida pela produção elevada de TNF- α nos rins.

6. CONCLUSÕES

1. A pentoxifilina (2 mg / animal) associada ao medicamento Aldara[®] (250 ug / animal) inibe o processo de cicatrização de úlceras bucais de camundongos C57BL/6.
2. A aplicação subcutânea de 12 ou 250 µg/animal de Aldara[®] não interfere significativamente com a velocidade de cicatrização das úlceras bucais de camundongos C57BL/6.
3. Os níveis de TNF- α diminuem à medida que o processo de cicatrização de úlceras bucais em camundongos C57BL/6 evolui.
4. O peso dos camundongos é preditor do processo de cicatrização de úlceras bucais de 2 mm induzidas com ácido acético em camundongos C57BL/6.

REFERÊNCIAS

Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004 Apr;15(4):854-67.

Barnadas MA, Remacha A, Condomines J, DE Moragas JM. Hematologic deficiencies in patients with recurrent oral aphthae. *Med Clin (Barc)* 1997;109(3):85-7.

Barton, GM And Medzhitov, R. Toll Signaling: RIPing off the TNF pathway 2004;5(5):472-474.

Bonifati C, Ameglio F. Cytokines in psoriasis. *Int J Dermatol* 1999;38(4):241-51.

Boras VV, Lukac J, Brailo V, Picek P, Kordic D, Zilic IA. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2006;35(4):241-3.

Borra RC, Andrade PM, Silva ID, Morgun A, Weckx LL, Smirnova AS, Franco M. The Th1 /Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med* 2004;33(3):140-6.

Boulinguez S, Reix S, Bedane C, Debrock C, *et al.* Role of drug exposure in aphthous ulcers: a case-control study. *Br J Dermatol* 2000;143(6):1261-5.

Buno IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol* 1998;134(7):827-31.

Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med* 2000;108(6):487-95.

Chakrabarty AK, Mraz S, Geisse JK, Anderson NJ. Aphthous ulcers associated with imiquimod and the treatment of actinic cheilitis. *Am Acad Dermatol* 2005;52(2 Suppl 1):35-7.

Chandrasekhar J, Liem AA, Cox NH, Paterson AW. Oxypentifylline in the management of recurrent aphthous oral ulcers: an open clinical trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;87(5):564-7.

Charles D. Mills, Kristi Kincaid, Jennifer M. Alt, Michelle J. Heilman, and Annette M. Hill. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology* 2000, 164: 6166–6173.

Colson A, Willems B, Thissen JP. Inhibition of TNF-alpha production by pentoxifylline does not prevent endotoxin-induced decrease in serum IGF-I. *J Endocrinol.* 2003 Jul;178(1):101-9.

Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000; 46-49.

Cunningham PN, Dyanov HM, Park P, Wang J, Newell KA, Quigg RJ. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J Immunol* 2002 Jun 1;168(11):5817-23.

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991 Nov 1;174(5):1209-20.

Demir E, Paydas S, Balal M, Kurt C, Sertdemir Y, Erken U. Effects of pentoxifylline on the cytokines that may play a role in rejection and resistive index in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2006 Nov;38(9):2883-6.

Dohi T, Fujihashi K, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterology* 2000 Sep;119(3):724-33.

Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005;6(1):68.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200(3):277-85.

Elenkov IJ & Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:290-303.

Flanders KC, Major CD, Arabshahi A, Aburime EE, Okada MH, Fujii M, Blalock TD, Schultz GS, Sowers A, Anzano MA, Mitchell JB, Russo A, Robertes AB. Interference with transforming growth factor-beta/ Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am J Pathol* 2003;163(6):2247-57.

Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F. Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. *Arthritis Rheum* 1999;42(9):1967-74.

Garside P, Mowat AM, Khoruts A. Oral tolerance in disease. *Gut* 1999;44(1):137-42.

Gary D Salomon, M.D, Attan Kasid, Ph.D, Douglas T Cromack, M.D, Elaine Director, B.S, Thomas L. Talbot, M.S, Anthony Sank, M.D, and Jeffrey A. Norton, M.D. The Local Effects of Cachectin/Tumor Necrosis Factor on Wound Healing. *Ann Surg* 1991 August; 214(2):175-180.

Gerharz M, Baranowsky A, Siebolts U, Eming S, Nischt R, Krieg T, Wickenhauser C. Morphometric analysis of murine skin wound healing: Standardization of experimental procedures and impact of an advanced multitissue array technique. *Wound Repair Regen* 2007 Jan-Feb;15(1):105-12.

Gorska P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. *Med Sci Monit* 2000;6(1):171-80.

Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K. Cytokine profile in Behcet's disease patients. Relationship with disease activity. *Scand J Rheumatol* 2002;31(4):205-10.

Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 2005 Aug 1;175(3):1636-42.

Hiroyuki Watanabe, Kousuke Numata, Takaaki Ito, Katsumasa Takagi, and Akihiro Matsukawa. Innate immune response in th1 - and th2 - dominant mouse strains. *Shock*, Vol. 22, No. 5, pp. 460–466, 2004.

Jaber L, Weinberger A, Klein T, Yaniv I, Mukamel M. Close association of HLA-B52 and HLA-B44 antigens in Israeli Arab adolescents with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127(2):184-7.

Javier Mestas and Christopher C. W. Hughes. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* 2004, 172: 2731–2738.

Kathryn AV. Toll signaling in the innate immune response. *Current Opinion in Immunology* 2000, 12:13-19.

Kero J, Gissler M, Hemminki E, Isolauri E. Could TH1 and TH2 diseases coexist? Evaluation of asthma incidence in children with coeliac disease, type 1 diabetes, or rheumatoid arthritis: a register study. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(5):781-3.

Kloppenburg M, Verweij CL, Miltenburg AM, Verhoeven AJ, Daha MR, Dijkmans BA, Breedveld FC. The influence of tetracyclines on T cell activation. *Clin Exp Immunol* 1995;102(3):635-41.

Kono T, Kondo S, Pastore S, et al. Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; 13:71-76.

Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Dembinski A, Hahn EG. Influence of bacterial lipopolysaccharide on healing of chronic experimental ulcer in rat. *Scand J Gastroenterol* 2001;36(12):1239-47.

Lagrue G, Cormier S, Liger C. Recurrent buccal aphthosis after smoking cessation *Presse Med* 1996;25(40):2043.

Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases. *Acta Physiol Hung* 2000;87(4):355-72.

Lewkowicz N, Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A, Tchorzewski H. Predominance of Type 1 cytokines and decreased number of CD4(+)CD25(+high) T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunol Lett* 2005;99(1):57-62.

MacDonald TT. Oxpentifylline, tumour necrosis factor-alpha and Crohn's disease. *Gut*. 1997 Apr;40(4):559.

Macphail LA, Greenspan JS. Oral ulceration in HIV infection: investigation and pathogenesis. *Oral Dis* 1997;3 Suppl 1:S190-3.

Maish GO 3RD, Shumate ML, Ehrlich HP, Vary TC, Cooney RN. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates tumor necrosis factor-induced alterations in wound breaking strength. *J Trauma* 1999;47(3):533-7.

Marcinkiewicz J, Grabowska A, Lauterbach R, Bobek M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. *Immunopharmacology* 2000 Sep;49(3):335-43.

Marion U. Goebel, Msc, Paul J. Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Production After Acute Psychological Stress, Exercise, and Infused Isoproterenol: Differential Effects and Pathways. *Psychosomatic Medicine* 2000;62:591-598.

McCartan BE & Sullivan A. The association of menstrual cycle, pregnancy, and menopause with recurrent oral aphthous stomatitis: a review and critique. *Obstet Gynecol* 1992;80:455-8.

Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 Jun;288(6):G1328-38.

Meyer T, Nindl I, Schmook T, Ulrich C, Sterry W, Stockfleth E. Induction of apoptosis by Toll-like receptor-7 agonist in tissue cultures. *Br J Dermatol* 2003 Nov;149 Suppl 66:9-14.

Michaels J 5th, Dobryansky M, Galiano RD, Bhatt KA, Ashinoff R, Ceradini DJ, Gurtner GC. Topical vascular endothelial growth factor reverses delayed wound healing secondary to angiogenesis inhibitor administration. *Wound Repair Regen* 2005 Sep-Oct;13(5):506-12.

Miller R, Birmachu W, Gerster J, et al. Imiquimod: cytokine induction and antiviral activity. *Int Antiviral News* 1995;3:111-113.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;164(12):6166-73.

Murthy S, Cooper HS, Yoshitake H, Meyer C, Meyer CJ, Murthy NS. Combination therapy of pentoxifylline and TNFalpha monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999 Feb;13(2):251-60.

Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 1997;204(2):205-8.

Natah SS, Hayrinen-Immonen R, Hietanen J, Malmstrom M, Konttinen YT. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions (RAU). *J Oral Pathol Med* 2000;29(1):19-25.

Natah SS. RECURRENT APHTHOUS ULCERATION: Immuno-pathological aspects [tese online]. Helsinki : Helsinki University; 2001.[citado 2001 Jun 7]. Disponível em URL: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/kliin/vk/natah/>

Ogura M, Yamamoto T, Morita M, Watanabe T. A case-control study on food intake of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(1):45-9.

Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31(1):77-92.

Porter S, Scully C. Aphthous ulcers recurrent. *Clin Evid* 2003;(10):1610-6.

Ramesh G, Reeves WB. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl* 2004 Oct;(91):S56-61.

Rapala K, Peltonen J, Heino J, Kujari H, Pujol JP, Niinikoski J, Laato M. Tumour necrosis factor-alpha selectivity modulates expression of collagen genes in rat granulation tissue. *Eur J Surg* 1997;163(3):207-14.

Reimund JM, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Kedinger M, Baumann R, Poindron P, Duclos B. In vitro effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997 Apr;40(4):475-80.

Reiter MJ, Testerman TL, Miller RL, Weeks CE, Tomai MA. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *J Leukoc Biol* 1994 Feb;55(2):234-40.

Robinson and, Guitart J. Recalcitrant, recurrent aphthous stomatitis treated with etanercept. *Arch Dermatol* 2003 Oct;139(10):1259-62.

Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Van Lieshout AW, Sprong T, Van Den Hoogen FH, Van Den Berg WB, Radstake TR. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation

of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005;52(8):2313-22.

Ryder MI, Saghizadeh M, Ding Y, Nguyen N, Soskolne A. Effects of tobacco smoke on the secretion of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta from peripheral blood mononuclear cells. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(6):331-6.

Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, Norton JA. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg* 1991 Aug;214(2):175-80.

Sanders J.E, Goldstein B.S, Leotta D.F, Richards K.A. Image processing techniques for quantitative analysis of skin structures. *Computer Methods Program Biomed* 1999 Jun; 59(3): 167-80.

Sato TA, Keelan JA, Mitchell MD. Critical paracrine interactions between TNF-alpha and IL-10 regulate lipopolysaccharide-stimulated human choriodecidual cytokine and prostaglandin E2 production. *J Immunol* 2003 Jan 1;170(1):158-66.

Scheinberg MA. Treatment of recurrent oral aphthous ulcers with etanercept. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20(5):733-4.

Schon M, Bong AB, Drewniok C, Herz J, Geilen CC, Reifenberger J, Benninghoff B, Slade HB, Gollnick H, Schon MP. Tumor-selective induction of apoptosis and

the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* 2003 Aug 6;95(15):1138-49.

Scully C, Flint S. Hematologic status in recurrent aphthous stomatitis compared with other oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;66(1):41-4.

Shapira L, Soskolne AW, Houry Y, Barak V, Halabi A, Stabholz A. Protection against Endotoxic Shock and Lipopolysaccharide-Induced Local Inflammation by Tetracycline: Correlation with Inhibition of Cytokine Secretion. *Infection and Immunity* 1996;825-828.

Shatan TA, Siegel PD, Sorenson WG, Kuschner WG, Lewis DM. A sensitive new bioassay for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 1994;175(2):181-7.

Shimizu N, Watanabe T, Arakama T, Fujiwara Y, Higuchi K, Kuroki T. Pentoxifylline accelerates gastric ulcer healing in rats: roles of tumor necrosis factor alpha and neutrophils during the early phase of ulcer healing. *Digestion* 2000;61(3):157-64.

Sidky YA, Borden EC, Weeks CE, Reiter MJ, Hatcher JF, Bryan GT. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. *Cancer Res* 1992;52:3528-3533.

Slomiany BL, Slomiany A. Role of endothelin-1-dependent up-regulation of leptin in oral mucosal repair. *J Physiol Pharmacol* 2005 Dec;56(4):531-41.

Slomiany BL, Slomiany A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase during oral mucosal ulcer healing. *J Physiol Pharmacol* 2002 Jun;53(2):159-69.

Slomiany BL, Slomiany A. Aspirin ingestion impairs oral mucosal ulcer healing by inducing membrane-bound tumor necrosis factor-alpha release. *IUBMB Life* 2000 Dec;50(6):391-5.

Stenman G & Heyden G. Premonitory stages of recurrent aphthous stomatitis. I. Histological and enzyme histochemical investigations. *J Oral Pathol* 1980;9(3):155-62.

Sun A, Chu CT, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Chiang CP. Expression of interleukin-2 receptor by activated peripheral blood lymphocytes upregulated by the plasma level of interleukin-2 in patients with recurrent aphthous ulcers. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2000;24(3):116-22.

Sun A, Wang JT, Chia JS, Chiang CP. Levamisole can modulate the serum tumor necrosis factor-alpha level in patients with recurrent aphthous ulcerations. *J Oral Pathol Med* 2006;35(2):111-6.

Susumu OKABE & Kikuko AMAGASE. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models - The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. *Biol. Pharm. Bull* 28(8) 1321—1341 (2005).

Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res* 2003 Aug;82(8):621-6.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17(1):1-14.

Taylor LJ, Bagg J, Walker DM, Peters TJ. Increased production of tumour necrosis factor by peripheral blood leukocytes in patients with recurrent oral aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1992;21(1):21.

Testerman TL, Gerster JF, Imbertson LM, et al. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leukoc Biol* 1995; 58:365-372.

Tomai MA, Imbertson LM, Stanczak TL, Tygrett LT, Waldschmidt TJ. The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cell Immunol* 2000 Jul 10;203(1):55-65.

Tsuboi I, Tanaka H, Nakao M, Shichijo S, Itoh K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production in human lymphocytes: up-regulation of TNF, IFN-gamma and IL-2, in contrast to down-regulation of IL-6 production. *Cytokine* 1995;7(4):372-9.

Tuzun B, Wolf R, Tuzun Y, Serdaroglu S. Recurrent aphthous stomatitis and smoking. *Int J Dermatol* 2000;39(5):358-60.

Van Furth AM, Verhard-Seijmonsbergen EM, Van Furth R, Langermans JA. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF-alpha, IL-1 beta IL-10 by human leucocytes. *Immunology* 1997 Jun;91(2):193-6.

Wan B, Hao L, Qiu Y, Sun Z, Cao Q, Zhang Y, Zhu T, Wang H, Zhang Y. Blocking tumor necrosis factor-alpha inhibits folic acid-induced acute renal failure. *Exp Mol Pathol* 2006 Dec;81(3):211-6.

Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993 Dec 15;151(12):6853-61.

Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004;22(5):460-6.

Weinberger A. Human lymphocyte antigen (HLA) B51 is more frequent in patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS) *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(1):118-9.

Zalaudek I, Petrillo G, Argenziano G. Aphthous ulcers and imiquimod. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(2):360-1.

Zhang H, Zhu SH, Qin QS. [Immunohistochemical and morphometrical study on the expression of interleukin-10 (IL-10) in different expressive parts during cutaneous wound healing in mice] *Fa Yi Xue Za Zhi* 2004;20(2):70-2.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)