



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

LIA VILA REAL LIMA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM RITUXIMABE NA PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

FORTALEZA

2023

LIA VILA REAL LIMA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM RITUXIMABE NA PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Ciências
Odontológicas do Centro Universitário
Christus, como um dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jiovanne Rabelo
Neri

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo
Goberlânio de Barros Silva

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Centro Universitário Christus - Unichristus
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732i Lima, Lia Vila Real.
Influência do tratamento com rituximabe na perda óssea alveolar
induzida por ligadura em ratos / Lia Vila Real Lima. - 2023.
38 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus -
Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Jiovanne Rabelo Neri.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.
Área de concentração: Ciências Odontológicas.

1. Rituximabe. 2. Doença Periodontal. 3. Perda Óssea Alveolar. I.
Título.

CDD 617.6

LIA VILA REAL LIMA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM RITUXIMABE NA PERDA ÓSSA
ALVEOLAR INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus, como requisito para a obtenção do título de mestre em Odontologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Giovanne Rabelo Neri (orientador)
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Profa. Dra. Talita Arrais Daniel Mendes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

À todos que plantaram em mim a semente
da transmissão de conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus**, meu guia, por ter me permitido vivenciar cada etapa da Pós-Graduação, ensinando-me sobre confiança, fé e, principalmente, fazendo-me vencer mais uma etapa dessa longa jornada.

Aos meus pais, **Marcos Antonio Lima da Silva e Germana Vila Real Lima**, por serem meus exemplos de amor incondicional, família, união, dedicação e paciência, e por sempre acreditarem que posso ir além. Amo vocês.

Ao meu irmão, **Marcos Bruno**, por ter me apresentado a Odontologia e ser essencial para que hoje eu estivesse formada no que amo.

Aos meus pequenos, **Mateus, Miguel e Pedro**, que me fazem ver a vida de forma mais leve e aproveitar cada momento.

Ao meu companheiro de vida, **Bruno Rocha da Silva**, que acompanha meus passos desde a graduação e me mostra que sempre serei capaz de conseguir o que eu quiser, basta ter dedicação e vontade de fazer valer aquilo que sonhei. Obrigada por sempre me incentivar, apoiar, ter paciência e me amar. Você me traz paz na correria de cada etapa.

À minha pequena filhota animal, **Amora**, que embora não tivesse conhecimento do que estava acontecendo, mas iluminou de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos.

À minha amiga e dupla pra vida, **Dayrine Silveira de Paula**, por sempre estar presente nas minhas vitórias e derrotas, me fazendo persistir pelo que quero.

À minha amiga, **Talita Arrais**, por me compreender e apoiar minhas decisões, estando ao meu lado independente da situação.

Ao meu orientador, **Jiovane Rabelo Neri**, que me incentivou em momentos diversos. Agradeço seus ensinamentos, compreensão, conselhos e paciência com minhas deficiências, os quais foram imprescindíveis na conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador, **Paulo Goberlânio de Barros Silva**, por dividir comigo seus conhecimentos, por acreditar que daria certo, por ser tão solícito nos momentos que

precisei. Obrigada por me ajudar de forma tão humilde algo que era novo pra mim, por me incentivar a gostar da docência e da pesquisa.

Aos professores do Curso de Mestrado por todo conhecimento compartilhado, além de serem presentes e solícitos para conosco.

Aos alunos de Iniciação Científica, **Reverton Ribeiro, Gabriella Julião, Giulianna Barreto e Alexandre Coelho**, pela ajuda com todos os experimentos realizados. Vocês são alunos diferenciados e sou grata pela indescritível contribuição.

Aos colegas da turma V do Mestrado em Ciências Odontológica, pelas horas de estudos, troca de conhecimento, conversas e alegrias.

Ao Centro Universitário Christus, por me proporcionar um ambiente agradável, motivador e repleto de oportunidades.

Aos funcionários do biotério do Centro Universitário Christus pela paciência, cuidado, dedicação e suporte durante o processo de realização da pesquisa.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

(Cora Coralina)

RESUMO

O rituximabe é um anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, usado no tratamento de condições autoimunes e inflamações crônicas, o qual interfere no funcionamento dos linfócitos B, impedindo a diferenciação em plasmócitos e podendo estimular a liberação de citocinas e danos teciduais. Com isso, essas observações sugerem que o impacto da terapia com células B na doença periodontal, caracterizada por uma alteração imunoinflamatória, pode ser digno de uma investigação. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do tratamento com rituximabe na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. Para este fim, 35 ratos machos (180-220g) Wistar (*Rattus norvegicus*) foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, a saber: um grupo sham, tratado com solução salina e não submetido ao modelo experimental de ligadura; um grupo controle negativo tratado com solução salina; e três grupos tratados com rituximabe em doses diferentes (R2.5 = rituximabe 2.5 mg / kg; R10 = rituximabe 10 mg / kg; R40 = rituximabe 40 mg / kg) por via subcutânea 24 horas antes da indução da DP por ligadura. Os animais foram pesados e acondicionados em sala escura com luz vermelha, aplicando, assim, a escala Grimace, para avaliação de desconforto e sofrimento durante o estudo. Posteriormente, os animais foram eutanasiados após 11 dias. No dia da eutanásia realizou-se a contagem total de leucócitos e a mensuração de variação de massa corpórea, sendo as hemimaxilas removidas subsequente para análise radiográfica. O grupo rituximabe apresentou perda de peso estatisticamente significativa de forma dose dependente durante ao longo dos 11 dias – R10 e R40 ($p=0,016$). O grupo R40 apresentou elevados escores de Grimace quando comparado ao grupo salina e grupo sham ($p=0,044$). Do ponto de vista hematológico, os animais submetidos ao modelo de ligadura e tratados com salina apresentaram aumento do número de leucócitos circulantes em comparação com o grupo Sham (4588 ± 116 células/mm³), e os grupos R2.5 e R10 dispuseram de redução significativa desse parâmetro, mas os animais do grupo R40 registraram um aumento significativo ($p<0,001$). Sob análise radiográfica foi verificado um efeito dose dependente do rituximabe acentuando a perda óssea alveolar em comparação aos grupos salina e sham, corroborando com os achados histológicos de perda óssea alveolar. Portanto, é possível concluir que as dosagens utilizadas do anticorpo monoclonal rituximabe, acentuaram a perda óssea induzida por ligadura em ratos, além de potencializarem uma resposta de dor nesses animais.

Palavras-chave: Rituximabe; Doença Periodontal; Perda Óssea Alveolar

ABSTRACT

Rituximab is a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody, used in the treatment of autoimmune conditions and chronic inflammation, which interferes with the functioning of B lymphocytes, preventing differentiation into plasmocytes and possibly stimulating the release of cytokines and tissue damage. Thus, these observations suggest that the impact of B-cell therapy on periodontal disease, characterized by an immunoinflammatory alteration, may be worthy of investigation. The aim of the present study was to evaluate the influence of rituximab treatment on ligation-induced alveolar bone loss in rats. For this purpose, 35 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (180-220g) were randomly divided into 5 groups, namely: a sham group, treated with saline solution and not submitted to the experimental model of ligation; a negative control group treated with saline; and three groups treated with rituximab at different doses (R2.5 = rituximab 2.5 mg / kg; R10 = rituximab 10 mg / kg; R40 = rituximab 40 mg / kg) subcutaneously 24 hours before PD induction by ligation. The animals were weighed and placed in a dark room with red light, thus applying the Grimace scale to assess discomfort and suffering during the study. Subsequently, the animals were euthanized after 11 days. On the day of euthanasia, the total leukocyte count and the measurement of body mass variation were performed, and the hemimaxillas were subsequently removed for radiographic analysis. The rituximab group showed statistically significant weight loss in a dose-dependent manner over the 11 days – R10 and R40 ($p=0.016$). The R40 group showed high Grimace scores when compared to the saline and sham groups ($p=0.044$). From the hematological point of view, the animals submitted to the ligation model and treated with saline showed an increase in the number of circulating leukocytes compared to the Sham group (4588 ± 116 cells/mm³), and the R2.5 and R10 groups had a reduction significant increase in this parameter, but the animals in the R40 group showed a significant increase ($p<0.001$). Under radiographic analysis, a dose-dependent effect of rituximab was verified, accentuating alveolar bone loss compared to the saline and sham groups, corroborating the histological findings of alveolar bone loss. Therefore, it is possible to conclude that the used dosages of the monoclonal antibody rituximab accentuated the bone loss induced by ligation in rats, in addition to potentiating a pain response in these animals.

Keywords: Rituximab; Periodontal Disease; Alveolar Bone Loss

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Abordagem ética e cálculo do tamanho da amostra.....	17
4.2 Grupos experimentais	17
4.3. Indução de perda óssea, parâmetros clínicos e eutanásia.....	18
4.4. Análise hematológica.....	19
4.5. Análise radiográfica	21
4.6. Processamento histológico e avaliação histomorfométrica.....	21
4.7. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
ANEXOS.....	38

1. INTRODUÇÃO

O rituximabe (RTX) é um anticorpo monoclonal quimérico direcionado contra moléculas CD20, uma fosfoproteína situada na transmembrana a qual é expressa na maioria das células B, exceto nos plasmócitos (COAT, DEMOERSMAN e BEUZIT, 2015).

Este fármaco bloqueia a ativação da molécula CD20 que é manifestado em linfócitos B, células B de memória e células B maduras, causando destruição celular por meio da citotoxicidade dependente de anticorpo e complemento e conduzindo a apoptose dessas células (GUTIERREZ-ROELENIS et al., 2011). Com isso, seu mecanismo de ação leva, na maioria das vezes, a uma depleção seletiva das células B circulantes, impedindo a diferenciação em plasmócitos que poderiam produzir imunoglobulinas autorreativas e estimular a liberação de citocinas e dano tecidual (LESHEM et al., 2013).

No final da década de 1980, seu uso se mostrou uma opção altamente eficaz para o tratamento de malignidades hematológicas, incluindo formas indolentes e agressivas de linfoma e, atualmente, tem sido empregado para diversas condições autoimunes, como esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus, dentre outras (SALLES et al., 2017). Em geral, o recurso terapêutico desse medicamento é bem tolerado, porém um estudo observou indicativos de uma reação relacionada à primeira infusão em mais de 50% dos pacientes devido sua administração sistêmica estar associada a uma liberação de citocinas, gerando, principalmente, febre, calafrios e tremores (PEREZ-GALA et al., 2006).

Administrado, usualmente, por via intravenosa, o RTX foi a primeira imunoglobulina quimérica humana/murina glicada terapêutica a ser usada no campo da oncologia, estabelecendo uma nova classe de remédios anticâncer, tornando-se um componente padrão de tratamento para pacientes com linfoma. Além disto, uma formulação subcutânea do medicamento foi aprovada na União Europeia e nos Estados Unidos para simplificar a aplicação e encurtar o tempo de administração e, assim, melhorar a experiência do paciente ao diminuir a carga do tratamento e facilitar o acesso a este importante fármaco em locais com poucos recursos, onde a formulação intravenosa pode representar um desafio particular (MIDAGLIA, MORA e MULERO, 2018).

Nesse aspecto, essa droga vem se destacando devido manter uma posição dentro da terapêutica arsenal por estar bem estabelecido com uma longa história de

sucesso de sua eficácia e uso clínico, apesar de ainda não ser descrito na literatura os efeitos desse fármaco na doença periodontal. (SALLES et al., 2017).

Absoluto em pacientes com artrite reumatóide com fator positivo, o tratamento com rituximabe diminui a progressão da destruição das articulações e do osso subcondral, que é mediado pelo osteoclasto. Estudos comprovaram um efeito considerável no eixo RANK/RANKL/OPG, com estabilização das lesões na maioria dos doentes avaliados. Estes dados são a favor da influência do sistema imune na remodelação óssea, nomeadamente um papel importante das células B (BOUMANS et al., 2012).

Tendo em vista que a doença periodontal (DP) é caracterizada por uma alteração imunoinflamatória associada a presença de biofilmes em placas disbióticas, é de suma importância correlacionar o impacto do mecanismo de ação do rituximabe na DP. Uma vez que, modifica o eixo de homeostase óssea (KORNMAN e TONETTI et al., 2018).

Além disso, a periodontite é causada, principalmente, por bactérias gram-negativas anaeróbias, afetando, assim, na destruição de tecidos de suporte dentário, o qual inclui cimento, osso alveolar, ligamento periodontal e gengiva (KORNMAN e TONETTI et al., 2018).

As características clínicas de periodontite incluem sangramento gengival, recessão gengival, profundidades de sondagem aumentadas (indicando perda de nível de inserção clínica), perda óssea, presença e extensão de defeitos ósseos, envolvimento de furca, mobilidade dentária e possível perda dentária (SATO et al., 2017).

Considerada uma das patologias mais prevalente na cavidade oral, a periodontite está associada à desregulação imune-inflamatória, redução da qualidade de vida e disfunção mastigatória (TONETTI et al., 2015). Cerca de 90% da população é afetada por esse problema de saúde pública, sendo mais predominante em pessoas do sexo masculino e com mais de 40 anos de idade (GASNER e SCHURE, 2020; KASSEBAUM et al., 2014).

Diversos são os fatores que possibilitam seu desenvolvimento, destacando entre eles os riscos sistêmicos, baixa higiene oral, tabagismo, gravidez, além, também, da idade, hereditariedade e genética (GASNER e SHURE, 2020; JEPSEN, 2018). É definida como uma desordem de cunho multifatorial com uma resposta inicial à infecção bacteriana que leva a uma reação inflamatória local e ativa a resposta imune inata, com,

consequentemente, liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores (COCHRAN, 2008; GRAVES, 2008).

Histologicamente, quando a lesão está estabelecida e avançada existe uma mudança na resposta celular. Inicialmente há uma predominância de células T e com a progressão o perfil celular assume um fenótipo predominantemente linfócitos B. Essas células evoluem para os plasmócitos que são responsáveis pela produção de anticorpos, que ativam o sistema complemento, e altos níveis de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandina E₂ (PGE₂), com uma subsequente quebra do tecido conjuntivo e perda óssea (FIGUEREDO et al., 2019).

À medida que a fixação do tecido conjuntivo ao dente é fragmentada, ocorre proliferação e migração apical do epitélio juncional, formando a bolsa periodontal, e o prolongamento do processo inflamatório causa a destruição contínua do tecido, sendo a presença de células plasmáticas a principal característica de identificação da lesão periodontal progressiva estabelecida, que indica uma resposta imune adaptativa de células B (FIGUEREDO et al., 2019).

Uma revisão sistemática com metanálise verificou recentemente que o estado periodontal de pacientes com artrite reumatóide (AR) a receber medicamentos antirreumáticos era melhor do que o de pacientes com AR não tratada, o qual diminuiu a extensão da perda de nível de inserção clínica em comparação com pacientes sem tratamento. Esse resultado corrobora com um estudo anterior que mostra um efeito benéfico de adalimumabe, tocilizumab e rituximabe na doença periodontal clínica, conforme evidenciado por uma diminuição em índice gengival, sangramento à sondagem e inserção clínica. (MOLON et al., 2019).

Entretanto, um estudo realizado observou que a terapia anti-TNF- α sem tratamento periodontal não teve efeito significativo na condição periodontal, diferentemente do grupo que recebeu a terapia (ORTIZ et al., 2009). Portanto, essas observações sugerem que o impacto da terapia com células B na doença periodontal pode ser digno de uma investigação.

2. JUSTIFICATIVA

O rituximabe é um anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20 que direciona a perda ou redução de células B por diversos mecanismos, por até 6 meses, restringindo a capacidade de apresentação de antígenos para linfócitos T e, conseqüentemente, impedindo a resposta imunológica.

Todavia, a redução da resposta imune proporciona a imunossupressão devido a baixa liberação de citocinas que tanto ativam a síntese de anticorpos, como iniciam o processo de reparo ósseo e tecidual.

Nesse contexto, as doenças periodontais podem sofrer um impacto no tratamento com RTX, pois ao inibir a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, os anticorpos não serão produzidos podendo diminuir a ação do sistema complemento e como resultado levará a uma melhora clínica em pacientes com DP, sugerindo que o anticorpo é o principal fator causal desse problema bucal.

Em contrapartida, poderá ocorrer a ativação de vias da resposta imune Th1, intensificando o desequilíbrio entre ações de defesa e agressão sobre os tecidos de suporte e proteção do dente, levando a acreditar que essas proteínas exercem uma função mais protetora e imunomoduladora.

Dessa forma, tendo em vista que o uso progressivo desse fármaco tem apresentado efeitos promissores, reduzindo a sintomatologia de diversas patologias, é fundamental conhecer as alterações envolvidas na sua utilização na terapia periodontal para submissão de condutas clínicas preventivas e terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência do tratamento com rituximabe na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar radiograficamente a influência do tratamento com diferentes doses de rituximabe no processo na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.
- Avaliar a influência do tratamento com diferentes doses de rituximabe na escala de dor em ratos submetidos a modelo experimental de perda óssea alveolar induzida por ligadura
- Avaliar a influência do tratamento com diferentes doses de rituximabe no perfil celular de ratos submetidos a modelo experimental de perda óssea alveolar induzida por ligadura
- Avaliar a influência do tratamento com diferentes doses de rituximabe no perfil hematológico de ratos submetidos a modelo experimental de perda óssea alveolar induzida por ligadura

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Abordagem ética e cálculo do tamanho da amostra

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Unichristus com parecer de número 013/21, sendo iniciado apenas após aprovação, e para sua realização 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos foram utilizados. Os animais (180-200g) foram mantidos em número de 7 animais por caixa, com água e ração ad libitum, em ciclo claro-escuro de 12h, temperatura de 20-25°C e pesados diariamente. Todos os procedimentos foram realizados por um operador devidamente preparado e calibrado de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, conforme o guia de Princípios Internacionais de Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais.

A fim de estimar a amostra necessária nos baseamos no estudo de TAKAHASHI et al. (2017) que observou que o tratamento com rituximabe atenuou a proteinúria inflamatória induzida por ADN após 21 dias de indução da lesão renal quando comparado ao grupo controle não tratado (Média±DP = 102±56 versus 23±23 mg/dia), estimou-se necessário sete animais por grupo de estudo (teste t de Student).

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais:

- **Grupo Sham:** Tratado com solução salina (0,1 ml / kg) e não submetido ao modelo experimental de ligadura;
- **Grupo Controle Negativo:** Tratado com solução salina (0,1 ml / kg) e submetido ao modelo experimental de ligadura;
- **Grupo R 2.5:** Tratado com rituximabe 2,5 mg / kg diluído em solução salina (0,1 ml / kg) e submetido ao modelo experimental de ligadura (KAGAN et al, 2014);
- **Grupo R 10:** Tratado com rituximabe 10 mg / kg diluído em solução salina (0,1 ml / kg) e submetido ao modelo experimental de ligadura (KAGAN et al, 2014);
- **Grupo R 40:** Tratado com rituximabe 40 mg / kg diluído em solução salina (0,1 ml / kg) e submetido ao modelo experimental de ligadura (KAGAN et al, 2014).

A via de administração escolhida foi a subcutânea, e tendo em vista que esse método de aplicação desse fármaco no dorso de ratos e camundongos atinge pico de concentração sérica após 24h e fornece uma longa meia vida (entre 12 e 14 dias), os animais receberam uma dose única 24h antes da indução da doença periodontal de solução salina ou rituximabe nas concentrações acima descritas (KAGAN et al, 2014).

4.3. Indução de perda óssea, parâmetros clínicos e eutanásia

Sucedeu-se o protocolo para indução de perda óssea por ligadura já reproduzidos com êxitos em outros estudos. Os animais foram previamente anestesiados com Cloridrato de Ketamina (70 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (5 mg/kg), por via intraperitoneal, para a colocação da ligadura. Após anestesia, houve a indução da perda óssea através da inserção de um fio de sutura de nylon 3.0, em torno do sulco gengival do primeiro molar superior da hemimaxila esquerda, e o nó cirúrgico foi realizado, voltado para a face vestibular do elemento dentário do animal e posicionados subgengivalmente nos molares para a indução de inflamação periodontal (DALCICO et al., 2013).



Figura 1: Modelo experimental de perda óssea por ligadura em molares superiores de ratos tratados cronicamente com rituximabe.

A escolha dos molares foi devido a semelhança da anatomia da junção dentogengival dos ratos com os seres humanos, tornando assim o modelo experimental

nestes animais uma ferramenta essencial (LISTGARTEN, 1975) e a duração do procedimento não ultrapassou 30 minutos, tempo necessário para a colocação da ligadura.

Após 11 dias da indução da perda óssea houve a eutanásia dos animais para coleta de material biológico por sobredose anestésica de ketamina (240 mg / kg, i. P.) e xilazina (60 mg / kg, intraperitoneal), e as hemimaxilas foram removidas, sendo a direita para análise morfométrica; e a esquerda para análise histológica.

No dia da eutanásia os animais foram pesados para avaliação da variação de massa corporal e também transcorreu a utilização da escala de Grimace (SILVA et al., 2020) para classificação do nível de desconforto e sofrimento, estabelecendo através da escala, escores de desconforto e sofrimento dos animais, de 0 (nenhum desconforto/sofrimento) a 1 (desconforto/sofrimento leve) e 2 (desconforto/sofrimento), analisados através de aperto orbital, protuberância do nariz, protuberância da bochecha, posição da orelha e mudança do bigode para ratos. Sendo a soma dos escores de cada animal (0-10) a unidade amostra.

4.4. Análise hematológica

Os animais foram anestesiados 30 minutos antes da eutanásia e utilizando tubo capilar para microhematócrito foi coletado 2 mL de sangue por via plexo retro-orbital. O sangue foi armazenado em eppendorfs contendo heparina para evitar a coagulação, e as amostras foram conservadas em temperatura ambiente. Duas horas depois foi realizado a contagem total de leucócitos (câmara de Neubauer) e contagem diferenciada de leucócitos (técnica do esfregaço) (AURBACH et al., 2019).

A contagem total de leucócitos foi realizada utilizando a câmara de Neubauer dupla melhorada espelhada (Bright-Line™) com profundidade da célula de contagem de 0,100 mm e área de contagem de 0,0025 mm². Foi utilizado o líquido de Turk para a evidenciação dos leucócitos, o líquido é composto por ácido acético (lisa as hemácias) e azul de metileno ou violeta de genciana (cora os leucócitos). Utilizando uma pipeta de precisão foi diluído em um eppendorf 380 µL do líquido de Turk para 20 µL de sangue animal, resultando no volume final de 400 µL. Fora do fluxo laminar, uma gota dessa mistura foi colocada na câmara espelhada e levado ao microscópio de para realização da contagem. As células escurecidas com formato distorcido foram desconsideradas,

enquanto que as de aspecto brilhante e formato arredondado foram contabilizadas. Foram contados os quatro quadrantes das extremidades (ZHANG et al., 2020).

Após a contagem foi realizado o cálculo com base na fórmula onde o número total de células contabilizadas contadas nos quatro quadrantes foi multiplicado por 50 (fator de correção). Através dessa fórmula é possível obtermos a quantidade aproximada de leucócitos presentes em cada animal.

A contagem diferenciada de leucócitos foi realizada pela técnica do esfregaço. Uma lâmina de vidro foi limpa com álcool 70% para remover vestígios de gordura. Utilizando uma pipeta de precisão foi colocado 20 µL de sangue animal em uma das extremidades da lâmina e com outra lâmina em um ângulo de 45° foi espalhado o sangue sobre a lâmina em um movimento leve e contínuo. Depois de completamente estendido, o sangue formou uma película sobre a lâmina de vidro. Foi esperado 1 hora para a secagem do sangue sobre a lâmina. Após isso as lâminas foram coradas utilizando o panótico rápido LB que se baseia no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky (MARTINS et al., 2016).

O panótico rápido possui 3 reagentes, 1 fixador composto por triarilmetano a 0,1% e 2 corantes compostos por xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%. As lâminas foram submersas nos 3 reagentes em sequência, seguindo um protocolo de 10 segundos (10 imersões de 1 segundo cada) e deixadas secar entre cada reagente. Após a coloração as lâminas foram lavadas com a água destilada e levadas até o microscópio para a contagem. Foi contado 50 células na parte superior e 50 células na parte inferior do esfregaço, percorrendo o esfregaço de uma borda a outra em sentido de zigue-zague, totalizando a contagem de 100 células (DURBIN et al., 2009; LAYSSOL-LAMOUR et al., 2019).

Após a contagem foi realizado o cálculo com base na fórmula onde o número contado de cada tipo celular de leucócito (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos) foi multiplicado pelo total de células contabilizadas na contagem total de leucócitos e dividido por 100. Através dessa fórmula é possível obtermos a quantidade aproximada de cada tipo celular de leucócitos presentes em cada animal: Número de leucócitos contados x 50 = Número de leucócitos

4.5. Análise radiográfica

Após a eutanásia as hemimaxilas foram removidas e fixadas em formol tamponado 10% e posteriormente foram submetidas a tomadas radiográficas (DabiAtlante®; 63Kvp, 8mA) com filme radiográfico digital e o posicionador com localizador perpendicular ao filme das maxilas, com distância (área focal – maxila) de 10cm e o tempo de exposição de 0,18 segundos em função para bateria dentária anterior superior (13-23).

As radiografias foram exportadas para o formato de imagem .jpeg e posteriormente analisadas quantitativamente por meio do software de análise de imagem ImageJ. Após aleatorização, um operador, de forma cega, mensurou em triplicata a área radiolúcida sugestiva de perda óssea através do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*) em triplicata.

4.6. Processamento histológico e avaliação histomorfométrica

Após tomadas radiográficas as hemimaxilas foram acondicionadas em formol neutro 10% por 48h e posteriormente descalcificadas em solução de EDTA 10% pH7.4 por 30-60 dias (trocas a cada 10 dias). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em séries alcoólicas graduadas, diafanizadas em xilol e impregnadas com parafina. As amostras foram cortadas em lâminas de vidro com 3 µm de espessura para serem coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

Para a análise microscópica da hemimaxila realizou-se fotomicrografias em aumento de 40x usando um microscópio óptico (BX43, Olympus® com o software Olympus Soft Imaging LCMicro software e exportado para o ImageJ®) para avaliar a perda óssea. Foi traçada uma linha paralela ao tecido ósseo ligando os sulcos cervicais dos primeiro e segundo molares e a partir daí foi medido em micrômetros a distância dessa região até a parte mais profunda do tecido ósseo. Após isso foram fotografadas 10 fotomicrografias em aumento de 40x na região de perda óssea para contagem de células inflamatória polimorfonucleares, células inflamatórias mononucleares, osteoclastos e lacunas de osteócitos viáveis e vazias. A soma dos microcampos foram consideradas como unidade amostral (BARROS SILVA et al., 2016).

4.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como os valores médios \pm SE (erro padrão) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparações de dados paramétricos foi realizado o teste 1-way-ANOVA/Bonferroni e para comparação dos dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis/Dunn. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

Os animais tratados com rituximabe apresentaram perda de peso estatisticamente significante de forma dose dependente ao longo dos 11 dias de experimento. Enquanto os animais do grupo salina apresentou um ganho de massa corporal de $105,3\pm 0,91\%$ os animais do grupo R10 ($105,3\pm 0,91\%$) e R40 ($95,27\pm 2,72\%$) apresentaram perda de massa corporal ($p=0,016$)

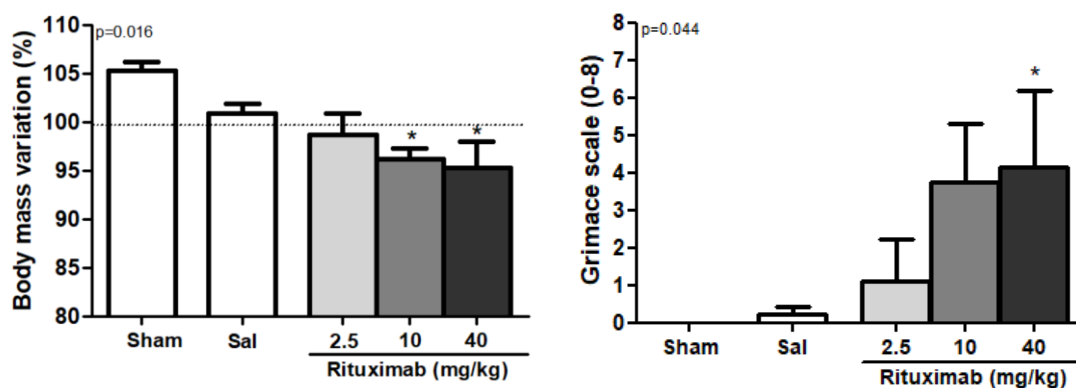


Figura 2: Análise de massa corporal e escores de sofrimento de Grimace em animais submetidos a modelo experimental de perda óssea por ligadura e tratados com diferentes doses de rituximabe.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM).

Com relação ao somatório das escalas de Grimace, por sua vez, todos os animais do grupo sham apresentaram escore e o grupo tratado com salina apresentou apenas discreto aumento nos sinais de sofrimento ($0,22\pm 0,22$), mas os animais do grupo R40 ($4,17\pm 2,01$) apresentaram escores de Grimace significativamente maiores que esses dois grupos ($p=0,044$) (Figura 2).

De um ponto de vista hematológico pôde-se observar que os animais submetidos ao modelo de ligadura e tratados com salina (7125 ± 2166 células/ mm^3) apresentaram aumento do número de leucócitos circulantes em comparação com o grupo Sham (4588 ± 116 células/ mm^3). Os grupos tratados com rituximabe apresentaram redução significativa desse parâmetro, mas os animais do grupo R40 (5619 ± 175 células/ mm^3) apresentaram aumento significativo em relação aos grupos R10 (4644 ± 137 células/ mm^3) e R2,5 (4686 ± 194 células/ mm^3) ($p < 0,001$) (Figura 3).

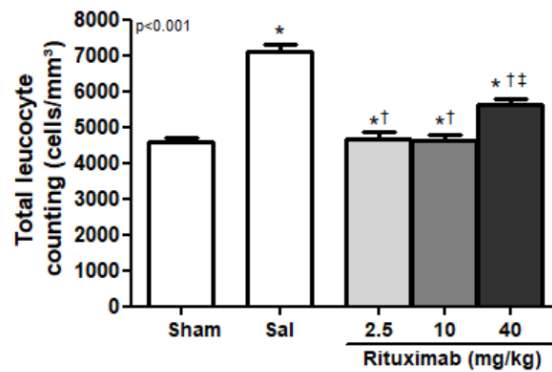


Figura 3: Contagem total de leucócitos em animais submetidos a modelo experimental de perda óssea por ligadura e tratados com diferentes doses de rituximabe.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, † $p < 0,05$ versus grupo salina, ‡ $p < 0,05$ versus R2,5 e R10; teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM).

A contagem de neutrófilos circulantes também foi similar. Os animais submetidos ao modelo de ligadura e tratados com salina (2114 ± 183 células/mm³) apresentaram aumento do número de neutrófilos circulantes em comparação com o grupo Sham (1067 ± 45 células/mm³). Os grupos tratados com rituximabe apresentaram redução significativa desse parâmetro, mas os animais do grupo R40 (1756 ± 165 células/mm³) apresentaram aumento significativo em relação aos grupos R10 (1384 ± 122 células/mm³) e R2,5 (1118 ± 89 células/mm³) ($p < 0,001$) (Figura 4).

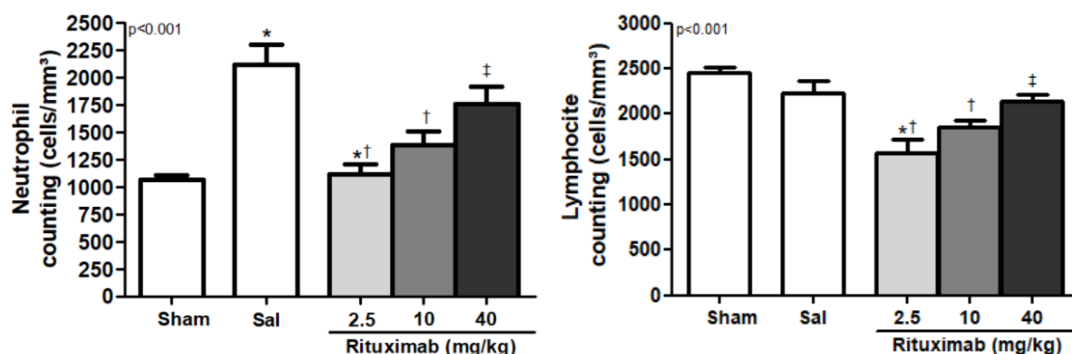


Figura 4: Contagem total de neutrófilos e linfócitos circulantes em animais submetidos a modelo experimental de perda óssea por ligadura e tratados com diferentes doses de rituximabe.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, † $p < 0,05$ versus grupo salina, ‡ $p < 0,05$ versus R2,5 e R10; teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM).

Durante contagem de linfócitos circulantes não houve diferença entre os grupos Sham (2453 ± 55 células/ mm^3) e salina (2232 ± 134 células/ mm^3). Os animais do grupo R2,5 (1563 ± 163 células/ mm^3) apresentaram redução significativa no número de linfócitos circulantes, mas houve aumento desse parâmetro de forma dose dependente nos animais dos grupos R10 (1859 ± 66 células/ mm^3) e R40 (2146 ± 75 células/ mm^3) ($p<0,001$) (Figura 4).

Por sua vez, a contagem de monócitos circulantes demonstrou redução significativa nos grupos R10 (73 ± 20 células/ mm^3) e R40 (49 ± 20 células/ mm^3) quando comparados aos grupos salina (410 ± 68 células/ mm^3) e sham (445 ± 32 células/ mm^3) ($p<0,001$) (Figura 5).

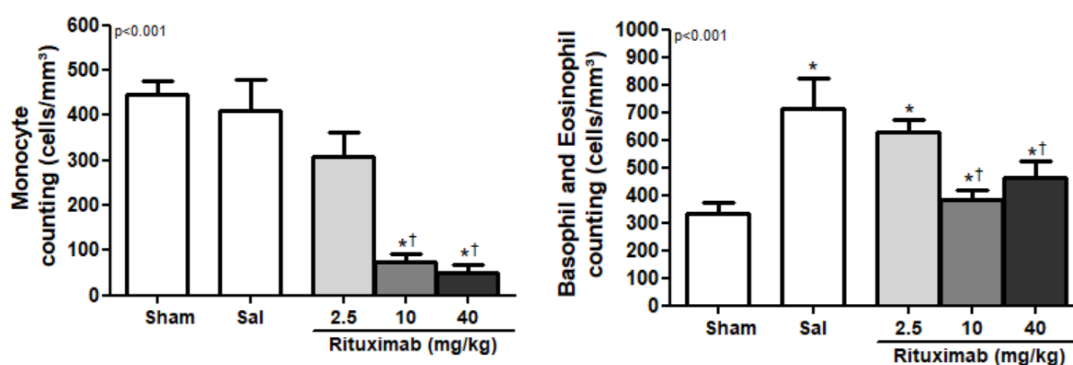


Figura 5: Contagem total de monócitos e eosinófilos/basófilos circulantes em animais submetidos a modelo experimental de perda óssea por ligadura e tratados com diferentes doses de rituximabe.

* $p<0,05$ versus grupo Sham, † $p<0,05$ versus grupo salina, ‡ $p<0,05$ versus R2,5 e R10; teste ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM).

A contagem de eosinófilos/basófilos circulantes demonstrou aumento no grupo salina (715 ± 109 células/ mm^3) comparado ao grupo Sham (334 ± 40 células/ mm^3) e redução significativa nos grupos R10 (385 ± 33 células/ mm^3) e R40 (462 ± 59 células/ mm^3) ($p<0,001$) (Figura 5).

A análise radiográfica demonstrou aumento significativo da área de perda óssea do grupo salina (1.75 ± 0.22 mm^2) comparado ao grupo Sham (0.87 ± 0.28 mm^2) e a partir daí o aumento ocorreu de forma dose dependente atingindo valores máximos nos grupos R10 (2.53 ± 0.14 mm^2) e R40 (2.61 ± 0.16 mm^2) ($p<0,001$) (Figura 6).

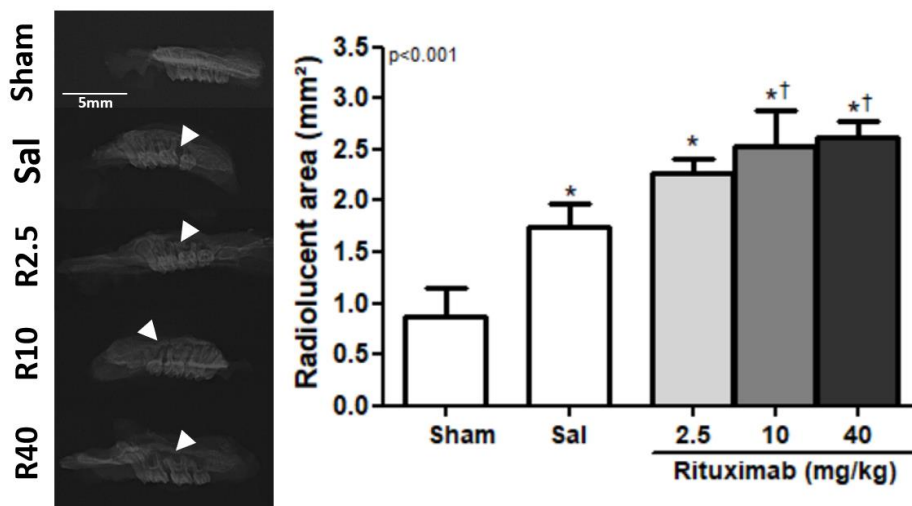


Figura 6: Análise radiográfica digital de perda óssea alveolar em ratos submetidos a modelo experimental de perda óssea por ligadura e tratados com diferentes doses de rituximabe.

* $p<0,05$ versus grupo Sham, † $p<0,05$ versus grupo salina, ‡ $p<0,05$ versus R2,5 e R10; teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM).

Microscopicamente a perda óssea dos animais do grupo salina ($790.5\pm 187.9 \mu\text{m}$) foi significativamente superior ao grupo Sham ($41.9\pm 3.7 \mu\text{m}$). Os grupos R2.5 ($1094,0\pm 66,7 \mu\text{m}$), R10 ($1094\pm 66,7 \mu\text{m}$) e R40 ($1175\pm 55,5 \mu\text{m}$) apresentara aumento da perda óssea em comparação com o grupo tratado com solução salina ($p<0,001$). Qualitativamente pôde-se observar que a perda óssea estava diretamente associada a intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear e histiolinfoplasmocitário (Figura 7).

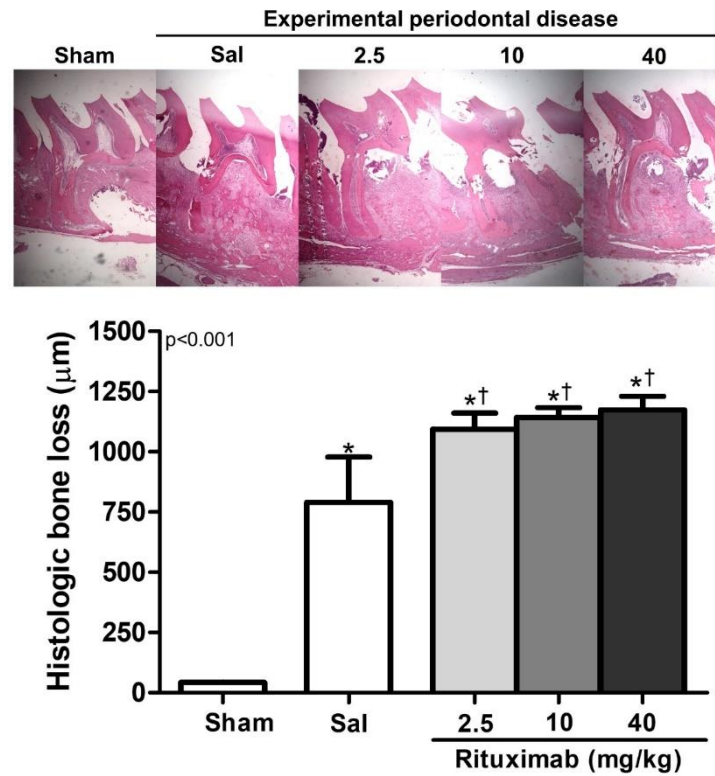


Figura 7: Análise histológica de perda óssea alveolar em ratos submetidos a modelo experimental de perda óssea por ligadura e tratados com diferentes doses de rituximabe. * $p < 0,05$ versus grupo Sham, † $p < 0,05$ versus grupo salina, ‡ $p < 0,05$ versus R2,5 e R10; teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM). H&E, 2,5x.

6. DISCUSSÃO

A doença periodontal está associada à presença de uma comunidade microbiana disbiótica em um hospedeiro suscetível, sendo a terapia periodontal não cirúrgica com ou sem antimicrobianos o padrão-ouro do tratamento, removendo mecanicamente o biofilme dentário etiológico. No entanto, direcionar apenas as bactérias periodontopatogênicas não alcança resultados favoráveis em todos os pacientes periodontais sendo o sistema imune parcialmente responsável pela destruição dos tecidos periodontais (HAJISHENGALLIS et al., 2020; PRESHAW, 2018).

Com isso, existe uma necessidade não atendida de complementar as abordagens terapêuticas atuais com estratégias que modulam os aspectos destrutivos da resposta inflamatória do hospedeiro para alcançar melhores resultados clínicos a longo prazo. O uso adjuvante de agentes moduladores do hospedeiro pode ter um impacto positivo ou negativo na progressão da doença periodontal. (VAN DYKE, 2020).

Agentes bloqueadores de diversas citocinas e células foram desenvolvidos e estão sendo utilizados para saber quais consequências podem ser obtidas, sendo observado em alguns momentos que terapia utilizadas com essas drogas sem o tratamento básico (raspagem supragengival, raspagem subgengival e profilaxia) associado não apresenta efeito significativo sobre a condição periodontal (ORTIZ et al., 2009).

Devido não haver artigos na literatura que comprovem os achados do rituximabe, se mostrando de forma escassa, o presente estudo, caracterizado como pioneiro, teve como objetivo investigar a influência do tratamento com rituximabe na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.

A técnica da ligadura produz peças anatômicas de fácil mensuração da perda óssea alveolar e excelente reprodutividade em estudos. Além disso, durante o curso temporal da doença, podem-se mensurar parâmetros sistêmicos (LIMA et al., 2004). O modelo utilizado reproduz as características observadas na doença periodontal em seres humanos, uma vez que a estrutura morfológica periodontal dos molares dos ratos é semelhante, o que inclui epitélio gengival, epitélio sulcular, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais, cimento e osso alveolar (BEZERRA et al., 2000).

Diversos estudos afirmam que as células B e os plasmócitos produzem e secretam imunoglobulinas como IgG, além de citocinas como IL-6 e TNF - α , as quais protegem os hospedeiros através da prevenção da aderência bacteriana, inativação das toxinas de bactérias e na opsonização dos neutrófilos. Entretanto, quando estas citocinas são

produzidas de forma desordenada, como nos tecidos periodontais inflamados, elas destroem os tecidos gengivais e intensificam a reabsorção óssea (PAGE e KORNMAN et al., 1997).

Todavia, LI et al. (2007) observou que na medula óssea de camundongos, a linhagem de células B contribuiu com 64% da produção total de osteoprotegerina (OPG). Consistente com esses dados, descobriu-se que camundongos knockout (KO) de células B têm um déficit de medula óssea em OPG, uma taxa aumentada de reabsorção óssea osteoclástica e massa óssea significativamente diminuídos. A reconstituição de células B em camundongos nulos de células B jovens resgatou essas alterações e preveniu a perda óssea, corroborando, assim, com a pesquisa executada, justificando a possibilidade de uma maior reabsorção óssea alveolar no grupo rituximabe devido sua atividade bloqueadora de células B.

Diferente do que os nossos achados mostram, Coat et al. (2015) identificaram que apesar da presença mínima na gengiva saudável, as células B se infiltram e dominam os locais de inflamação periodontal crônica progressiva, o qual estimulam diretamente os osteoclastos gerando IL-17, IL-6 e RANKL e que ao fazer uso do fármaco bloqueador os pacientes apresentam sinais clínicos e parâmetros periodontais mais leves.

Além disso, as toxinas bacterianas e os mediadores inflamatórios produzidos no ambiente periodontal, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α , proteína C reativa (PCR), aumentam a carga inflamatória, potencializando uma resposta exacerbada (GASNER e SHURE, 2020). Consequentemente, sendo a escala de desconforto mais acentuada nos animais que receberam dosagens diferentes do anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, tendo eles uma piora da doença periodontal e por esta razão maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Ainda, isto posto, um fator que estimula a realização de estudos nesta área é o impacto na qualidade de vida, afetando de modo prejudicial (NEEDLEMAN et al., 2004). Devido a hiperalgia ocasionada pela amplificação dos mediadores inflamatórios em função do bloqueio de células B, diminui a ingestão de ração por parte do grupo experimental, reduzindo a massa corpórea.

Quanto aos neutrófilos, estudos anteriores in vitro demonstraram que essa droga tem a capacidade de reduzir a quimiotaxia e a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente devido ao bloqueio da ação de células mononucleares sobre células polimorfonucleares (PAY et al., 2005). Essa ação tem sido atribuída à diminuição dos

níveis e ação dos quimiotáticos, sugerindo diminuição dessas células, bem como sua atividade.

É visto mais frequentemente um número aumento de neutrófilos em infecções bacterianas agudas e forma transitória no início de infecções virais (BECKER, 2001). A neutrofilia observada no hemograma do grupo salina submetido ao modelo de ligadura demonstra que houve diferença da neutrofilia com o grupo com solução salina e não induzido a perda óssea. Isto denota um efeito sistêmico da periodontite experimental, provavelmente por causa da translocação bacteriana provocada pela infecção local. O grupo tratado com rituximabe obteve redução significativa entre o grupo controle. Conclui-se, dessa forma, que o RTX foi capaz de diminuir o infiltrado neutrofilico na corrente sanguínea, sendo responsável por uma imunossupressão.

Os neutrófilos caracterizam a primeira linha de defesa do hospedeiro frente à agressão. Além da capacidade fagocitária, importante no combate às infecções, estas células produzem e liberaram mediadores inflamatórios que perpetuam a amplificação de recrutamento e ativação de células polimorfonucleares, sustentando assim a resposta inflamatória e o dano tecidual. Além disso, os neutrófilos ativados são capazes de liberar radicais livres e enzimas proteolíticas, os quais possuem capacidade de promover dano tecidual (VAN DYKE, 2003).

Em relação aos achados radiográficos, foram observadas diferenças significativas entre as áreas radiolúcidas, havendo uma maior perda óssea nos grupos de rituximabe quando comparado com os outros grupos. Diferentemente dos achados descritos por Nakachi et al. (2012) que não observaram alterações radiográficas em microtomografias computadorizadas em modelo de cicatrização alveolar entre animais do grupo controle e animais tratados com bloqueador de TNF- α , outro anticorpo monoclonal, sugerindo que a inibição desse fármaco não parece alterar o reparo ósseo sob visualização radiográfica.

Com isso, podemos observar em nosso estudo que devido provavelmente o bloqueio de células B, houve uma linfopenia no grupo experimental sendo parcialmente responsável pela redução de outros elementos celulares, diferentemente do grupo salina, causando uma imunossupressão, exacerbando as células inflamatórias, osteoclastogênese e amplificando a perda óssea observada radiograficamente.

Corroborando com os resultados da morfometria, a análise histopatológica das lâminas em hematoxilina-eosina (HE) dos animais submetidos à cirurgia de indução da

doença exibiu características clássicas da doença periodontal induzida: destruição do osso alveolar e do cemento bem como desorganização das fibras colágenas do periodonto e infiltrado de células polimorfonucleares no tecido conjuntivo periodontal em animais submetidos à perda óssea alveolar. Houve aumento da intensidade de todas estas características nos animais submetidos ao tratamento com rituximabe em todas as dosagens.

O presente estudo apresenta algumas limitações como: ser um estudo em animais, que apesar de mimetizar bem as respostas em humanos, principalmente inflamação e reparo, pode apresentar alterações metabólicas, principalmente relacionadas ao tempo de desenvolvimento dos eventos. É um estudo extremamente controlado com fatores como microbiota menor e distinta em comparação aos humanos. Apesar disso, destaca-se como o primeiro estudo que demonstra o possível efeito negativo de fármacos anti-CD20 na remodelação óssea.

Com isso, ressalta-se a necessidade de realização de novos estudos experimentais e ensaios clínicos que sustentem a indicação de cuidados adicionais nos procedimentos cirúrgicos de drenagem em pacientes sob terapia com inibidores de células B.

7. CONCLUSÃO

Ao final do presente estudo, pôde-se concluir que as dosagens utilizadas do anticorpo monoclonal rituximabe, acentuou a perda óssea induzida por ligadura em ratos, além de potencializar uma resposta exacerbada de dor nesses animais e suprimir o sistema imunológico.

REFERÊNCIAS

- AURBACH, K., et al. Blood collection, platelet isolation and measurement of platelet count and size in mice—a practical guide. *Platelets*, v. 30, n. 6, p. 698-707, 2019.
- BALTA, M.G., et al. Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*, v. 100, n. 8, p.798-809, 2021.
- BARROS SILVA, P. G., et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Diseases*, v. 22, n. 7, p. 649-657, 2016.
- BECKER, A. K. Interpretación del hemograma. *Rev. Chilena Ped.*, v. 72, 2001.
- BERGLUNDH, T.; ABRAHAMSSON, I.; WELANDER, M.; et al. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2007.
- BEZERRA, M. M., et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol.*, v. 71, p. 1009-1014, 2000.
- BRIZENO, L. A. C., ASSREUY, A. M. S., ALVES, A. P. N. N., SOUSA, F. B., SILVA, P. G. B., SOUSA, S. C. O. M., LASCANE, N. A. S., EVANGELISTA, J. S. M., MOTA, M. R. L. Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat mod: implication of TNF- α , IL-1 β and FGF-2. *Life Sciences, Oxford*, v. 155, p. 36–47, jun. 2016.
- CENCI, S., et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J. Clin. Invest*, v. 106, p. 1229–1237, 2000.
- COAT, J.; DEMOERSMAN, J.; BEUZIT, S.; et al. Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 42, n. 9, p. 817–823, 2015.
- COCHRAN, D. L. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, v. 79, n. 8s, p. 1569–1576, 2008.

DALCICO, R.; MENEZES, A. M.; DEOCLECIANO, O. B.; ORIÁ, R. B.; VALE M. L.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *J Periodontol.* v.84, n.8, pp.1145-1157, 2013.

DURBIN, C., et al. Estimating leukocyte, platelet, and erythrocyte counts in rats by blood smear examination. *Veterinary clinical pathology*, v. 38, n. 2, p. 157-162, 2009.

FIGUEREDO, C. M.; LIRA-JUNIOR, R.; LOVE, R. M. T and B Cells in Periodontal Disease: New Functions in A Complex Scenario. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 16, p. 3949, 2019.

GASNER, N. S.; SCHURE, R.S. Periodontal Disease. *StatPearls*. 2020.

GRAVES, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, v. 79, n. 8s, p. 1585–1591, 2008.

GUTIERREZ-ROELEN, I.; et al. Rituximab treatment induces the expression of genes involved in healing processes in the rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis & Rheumatism*, v. 63, n. 5, p. 1246-1254, 2011.

HAIJSHENGALLIS, G., et al. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontology 2000*, v. 84, n. 1, p. 14–34, 2020.

JEPSEN, S.; et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, v.45, n. 20, p. S219–S229, 2018.

KAGAN, L., et al. Interspecies Pharmacokinetic Modeling of Subcutaneous Absorption of Rituximab in Mice and Rats. *Pharm Res*, v. 31, n. 12, p. 3265-3273, 2014.

KASSEBAUM, N. J.; BERNABÉ, E.; DAHIYA, M.; BHANDARI, B.; MURRAY, C. J. L.; MARCENES, W. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression. *J Dent Res*, v. 93, n. 11, p. 1045–1053, 2014.

KAWAI, T., et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American Journal of Pathology*, v. 169, n. 3, p. 987-998, 2006.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; et al. B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease. *The American Journal of Pathology*, v. 169, n. 3, p. 987–998, 2006.

KORNMAN, K. S.; TONETTI, M. S. Proceedings of the World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 45, n. 20, 2018.

LAYSSOL-LAMOUR, C., et al. The effects of storage at 4 C and 20 C on the hemograms of C57BL/6 mice and Wistar rats using the IDEXX ProCyte Dx and blood smear evaluations. *Veterinary clinical pathology*, v. 48, n. 4, p. 652-667, 2019.

LESHEM, Y. A.; et al. Successful treatment of pemphigus with biweekly 1-g infusions of rituximab: a retrospective study of 47 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 68, n. 3, p. 404-411, 2013.

LI, Y., et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*, v. 109, p. 3839–3848, 2007.

LIMA, D.L.F.; MONTENEGRO JR., R.M.; VIEIRA, A.P.G.F.; ALBANO, M.F.; REGO, D.M. Absence of periodontitis in acromegalic patients, *Clin. Oral Invest.*, v.13, pp.165-169, 2009.

LIMA, V. et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J. Periodontol.*, v. 75, p. 162- 168, 2004.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of Epithelial Relationships in the Gingiva of Rat and Man. *Journal of Periodontology*, v.46, n.11, pp. 677–680, 1975.

LIU, F.; et al. A meta-analysis of emotional disorders as possible risk factors for chronic periodontitis: *Medicine*, v. 97, n. 28, p. e11434, jul. 2018.

MARIN, C.; et al. Nível de informação sobre doenças periodontais dos pacientes em tratamento em uma clínica universitária de periodontia. *Salusvita, Bauru*, v. 31, n. 1, p. 19-28, 2012.

MARTINS, G. S., et al. Cytochemical characteristics of blood cells from Brazilian tortoises (Testudines: Testudinidae). *Genet. Mol. Res.*, v. 15, n. 1, 2016.

MIDAGLIA, L.; MORA, L.; MULERO, P.; et al. Rituximab: its efficacy, effectiveness and safety in the treatment of multiple sclerosis. *Revista De Neurologia*, v. 66, n. 1, p. 25–32, 2018.

MOLON, R. S. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 18, p. 4541, 2019.

MOUTSOPOULOS, N.M., et al. Interleukin-12 and interleukin-23 blockade in leukocyte adhesion deficiency type 1. *N Engl J Med*, v. 376, n. 12, p. 1141–1146, 2017.

NAKACHI, H. A structural modulator of tumor necrosis factor type 1 receptor promotes bone formation under lipopolysaccharide-induced inflammation in a murine tooth extraction model. *European Journal of Pharmacology*, v. 679, p. 132-138, 2012.

NEEDLEMAN, I., et al. Impact of oral health on the life quality of periodontal patients. *J Clin Periodontol*, v.31, p. 454– 457, 2004.

ORTIZ, P., et al. Periodontal Therapy Reduces the Severity of Active Rheumatoid Arthritis in Patients Treated With or Without Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *J Periodontol*, v. 80, n. 4, p. 535-540, 2009.

PAGE, R.C.; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, v. 14, p. 9-11, 1997.

PAY, S. et al. Chimerical anti-TNF-alpha, infliximab, inhibits neutrophil chemotaxis and production of reactive oxygen species by blocking the priming effect of mononuclear cells on neutrophils. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 27, p. 187-198, 2005.

PEREZ-GALA, S.; et al. Cytokine-release syndrome related to rituximab limited to lesions and excision scars of lesions of primary cutaneous lymphoma. *Archives of dermatology*, v. 142, n. 11, p. 1508-1518, 2006.

PRESHAW, P.M. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000*, v. 76, n. 1, p. 131–149, 2018

SALLES, G.; et al. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: a review of 20 years of clinical experience. *Advances in therapy*, v. 34, n. 10, p. 2232-2273, 2017.

SATO, K., et al. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 6955, 2017.

SILVA, P. G. B., MARTINS, J. O. L., NETO, R. A. L. P., LEMOS, J. V. M., MACHADO, L. C., CARLOS, A. C. A. M., ALVES, A. P. N. N., LIMA, R. A. Tumor necrosis factor alpha mediates orofacial discomfort in an occlusal dental interference model in rats: The role of trigeminal ganglion inflammation. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 49, n. 2, p. 169-176, 2020.

TAKAHASHI, Y., et al. Rituximab protects podocytes and exerts anti-proteinuric effects in rat adriamycin-induced nephropathy independent of B-lymphocytes. *Nephrology (Carlton)*, v. 22, n. 1, p. 49-57, 2017.


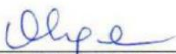
TONETTI, M.S., et al. Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11 th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*, v.42, n. 16, p. 5–11, 2015.

VAN DYKE, T.E. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*, v. 91, n. 1, p. S19–S25, 2020.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J. Dent. Res.*, v. 82, p. 82-90, 2003.

ZHANG, M., et al. Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of clinical laboratory analysis*, v. 34, n. 1, p. e23024, 2020.

ANEXOS

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS			
			
Of. No. 013/21			
Protocolo da CEUA: 013/21			
Pesquisador Responsável: PAULO GOBERLÂNIO DE BARROS SILVA			
Título do Projeto: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM RITUXIMABE NO PROCESSO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS			
<p>Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou <u>APROVADO</u> o projeto supracitado na reunião do dia 8 (oito) de julho de 2021.</p>			
Descrição do animal utilizado:			
Espécie:	Wistar, macho, 180-220g	Número Amostral:	45
<p>Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 08/7/2022.</p>			
Fortaleza, 08 de julho de 2021.			
 <hr/> Olga Vale Oliveira Machado Coordenadora CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE			
<small>Campus Benfica Rua Princesa Isabel, 1920 60015-061 - Fortaleza-CE Fone: 85.3214.8770 3214.8771</small>	<small>Campus Dionísio Torres Rua Israel Bezerra, 630 60135-460 - Fortaleza-CE Fone: 85.3257.2020 Fax: 85.3277.1762</small>	<small>Campus D. Luis Av. Dom Luis, 911 60160-230 - Fortaleza-CE Fone: 85.3457.5300 Fax: 85.3457.5374</small>	<small>Campus Parque Ecológico Rua João Adolfo Gurgel, 133 60192-345 - Fortaleza-CE Fone: 85.3265.8100 Fax: 85.3265.8110</small>