

**UNIVERSIDADE UNIGRANRIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ENDODONTIA**

**EFEITO DA MEDICAÇÃO SISTÊMICA COM ANTICORPO  
MONOCLONAL NIVOLUMABE NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES  
PERIRRADICULARES EM RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**BIANCA ABREU DE AZEVEDO**

**2024**

**UNIVERSIDADE UNIGRANRIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ENDODONTIA**

**EFEITO DA MEDICAÇÃO SISTÊMICA COM ANTICORPO  
MONOCLONAL NIVOLUMABE NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES  
PERIRRADICULARES EM RATOS**

**BIANCA ABREU DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Endodontia).

Orientadores:

Prof. Dr. José Freitas Siqueira Jr  
Profa. Dra. Luciana Armada Dias

Co-orientadora:

Profa. Dra Sabrina de Castro Brasil

2024

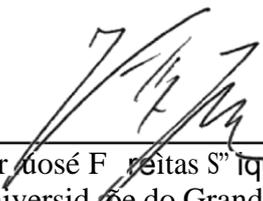
**EFEITO DA MEDICAÇÃO SISTÊMICA COM ANTICORPO  
MONOCLONAL NIVOLUMABE NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES  
PERIRRADICULARES EM RATOS**

BIANCA ABREU DE AZEVEDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Endodontia)

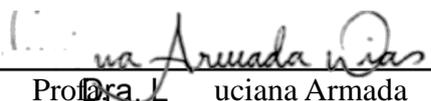
Aprovada em 03 de Abril de 2024

Banca examinadora



---

Prof. Dr. José Freitas Siqueira Júnior  
Universidade do Grande Rio



---

Prof. Dra. Luciana Armada  
Dias Universidade Iguazu



---

Prof. Dra. Renata Perez Vianna Silva Faculdades  
Unidas do Norte de Minas



---

Prof. Dra. Carolina Kamiński Saiz  
Universidade do Grande Rio



---

Prof. Dra. Sabrina de Castro Brasil  
Universidade do Grande Rio

## DEDICATÓRIA

A todos os meus pacientes oncológicos, que  
lutam diariamente pela vida.

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador Prof. Dr. José Freitas Siqueira Júnior, a quem eu tenho grande respeito e admiração, pela paciência, incentivo, ensinamentos e por ter acreditado em mim para a realização desse trabalho desde o início, desde a primeira conversa ao telefone. Foi uma honra inenarrável ser aluna do meu grande ídolo durante esses 2 anos.

À minha orientadora Profa. Dra. Luciana Armada Dias, pela dedicação, carinho, paciência, amizade e incentivo durante a realização desse trabalho. Sua calma, sabedoria e presença foram fundamentais para que tudo corresse bem e para que eu me sentisse segura. Seus ensinamentos estarão sempre comigo.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Sabrina de Castro Brasil, a quem eu devo todas as minhas orações noturnas, pelo carinho, incentivo, amizade, paciência e por ter depositado sua confiança em mim para a realização desse trabalho. Sempre calma e com bom humor, conseguiu me deixar segura para a finalização dessa pesquisa. Obrigada por me fazer acreditar em mim mesma, a minha admiração por você é gigante.

Ao Prof. Dr. Flávio Ferreira Alves, por ter me incentivado ao mundo da pesquisa e escrita. Agradeço por sua motivação, dedicação, paciência e ensinamentos.

À Profa. Dra. Isabela das Neves Rôças Siqueira, a quem eu tenho imensa admiração, pelos ensinamentos, dedicação, por ter acreditado nesse trabalho e pelas brilhantes considerações na etapa inicial dessa pesquisa.

Ao meu marido Guilherme e a minha filha Helena por terem lidado tão bem com a minha ausência, e pelo amor que eu sempre senti mesmo quando estava completamente cansada e desmotivada. Sem vocês ao meu lado seria impossível.

Aos meus amigos Elcides, Bryan, Allan e Renata que me deram um lar no Rio de Janeiro todas as vezes que eu precisei. A amizade e o amor de vocês foram fundamentais para que esse trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos de PPGO Giuliana, Thamyres, Warley, Amanda, Fátima e Erika pelos ensinamentos, parceria e risadas. A nossa “panelinha” será eterna assim como a nossa amizade.

À minha parceira de trabalho Adriana, a quem eu tenho muito carinho e estima, por ter feito meus plantões no hospital para que eu pudesse realizar esse trabalho. Sempre com boa vontade e solícita. Obrigada, eu não conseguiria sem o seu apoio.

Ao Hospital São Lucas da PUC-RS e ao Grupo Oncoclínicas de Porto Alegre por depositarem em mim a confiança e responsabilidade ao cuidado dos seus pacientes oncológicos.

## ÍNDICE

---

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....                                   | 1  |
| 2. JUSTIFICATIVA .....  | 12 |
| 3. OBJETIVO(S) .....  | 13 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 14 |
| 5. RESULTADOS .....   | 18 |
| 6. DISCUSSÃO .....  | 25 |
| 7. CONCLUSÃO(ÕES) .....   | 30 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 31 |
| 9. ANEXO 1- OPDIVO®- Bula: Ministério da Saúde (2020) .....                   | 39 |
| 10. ANEXO 2- Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais<br>(CEUA) ..... | 41 |

## RESUMO

---

**Objetivos.** Avaliar o impacto da medicação sistêmica com o anticorpo monoclonal Nivolumabe no desenvolvimento de lesões perirradiculares em ratos. **Materiais e métodos.** Foram utilizados 34 ratos machos da raça Wistar com 10 semanas de idade, divididos em dois grupos experimentais (N1 e N2) e dois grupos controles (C1 e C2). O grupo N1 recebeu quatro aplicações (15/15 dias) de Nivolumabe de forma intraperitoneal por um período de 2 meses antes da indução da lesão perirradicular e o grupo N2 recebeu uma aplicação de Nivolumabe 15 dias antes. C1 e C2 receberam solução fisiológica nos mesmos períodos e padrões que os respectivos grupos experimentais. Após 7 dias da indução da lesão perirradicular, todos os grupos receberam mais 2 aplicações das suas respectivas soluções durante 40 dias. Ao final do período experimental, a massa corporal de todos os grupos foi verificada e os animais eutanasiados. O sangue foi coletado para análise bioquímica e as hemi-mandíbulas esquerdas radiografadas para análise do tamanho das lesões usando o *software* Image J. **Resultados.** Na contagem de segmentados foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (N1xC1  $p=0,0499$  e N2xC2  $p=0,0059$ ). Essa diferença não foi observada nos outros grupos celulares. Na taxa de alanina aminotransferase houve diferença estatística entre N2xC2 ( $p=0,0002$ ). Não houve diferença para aspartato aminotransferase. Na taxa de creatinina houve diferença N1xC1 ( $p=0,0011$ ). Não houve diferença significativa em relação a ureia nitrogenada no sangue entre os grupos. As análises radiográficas da área da lesão não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p>0,05$ ). **Conclusões.** Não foi possível verificar a influência da medicação com Nivolumabe dentro dos períodos avaliados no desenvolvimento de lesões

perirradiculares. No entanto, as análises bioquímicas demonstraram o efeito sistêmico sobre os grupos experimentais.

**Palavras-chave:** Lesão perirradicular; molares; Nivolumabe; ratos; Wistar.

## ABSTRACT

---

**Aim:** To assess the impact of systemic medication with the monoclonal antibody Nivolumab on the development of periradicular lesions in rats. **Materials and methods.** A total of 34 male Wistar rats aged 10 weeks were divided into two experimental (N1 and N2) and two control groups (C1 and C2). The N1 group received Nivolumab intraperitoneally 2 months before the induction of the periradicular lesion, and the N2 group received Nivolumab 15 days before. C1 and C2 animals received saline solution for the same periods and patterns as the respective experimental groups. After 7 days from the induction of the periradicular lesion all groups were administered the respective solutions for additional 40 days. At the end of the experimental period, the body mass of all animals was verified, and then they were euthanized. Blood was collected for biochemical analysis, and the left hemi-mandibles were radiographed for analysis of the periradicular lesion size using Image J *software*. **Results.** In the segmented cell count, a statistically significant difference occurred between groups ( $p=0.0499$  and  $p=0.0059$ ). This difference was not observed in the other cell groups. In the alanine aminotransferase rate, there was a statistical difference between N2xC2 ( $p=0.0002$ ). No difference was found for aspartate aminotransferase. In the creatinine rate, there was a difference between N1xC1 ( $p=0.0011$ ). There was no significant difference in relation to nitrogen urea. As for lesion size as determined by radiographic analyses, there were no significant differences between groups ( $p>0.05$ ). **Conclusions.** Within the periods of administration, there was no considerable influence of Nivolumab in the development of periradicular lesions. However, biochemical analyses demonstrated systemic effects on the experimental groups.

**Keywords:** Periradicular lesion; molars; Nivolumab; rats; Wistar

## LISTA DE FIGURAS

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Radiografías de mandíbulas..... | 24 |
|---|----|

## LISTA DE TABELAS

---

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Médias da massa corporal final (g).....                              | 18 |
| Tabela 2: Valores de hemácias e hemoglobina.....                               | 19 |
| Tabela 3: Valores de hematócrito e volume globular médio.....                  | 19 |
| Tabela 4: Valores da concentração de hemoglobina globular média e plaquetas.   | 20 |
| Tabela 5: Contagem de leucócitos e linfócitos.....                             | 21 |
| Tabela 6: Contagem de monócitos e segmentados.....                             | 21 |
| Tabela 7: Valores do nível de ureia nitrogenada e creatinina.....              | 22 |
| Tabela 8: Valores de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase.... | 23 |
| Tabela 9: Áreas das lesões perirradiculares (pixel).....                       | 23 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

---

|               |  |
|---------------|--|
| APCs          | Antigen Presenting Cells                                 |
| ALT           | Alanina Aminotransferase                                 |
| AST           | Aspartato aminotransferase                               |
| B7            | Proteína B7  |
| BUN           | Nitrogênio úrico   |
| CR            | Creatinina   |
| CD28          | Proteína CD28  |
| CD80          | Molécula CD80  |
| CD86          | Molécula CD86  |
| CD25          | Proteína CD25  |
| CD45RO        | Proteína CD4RO   |
| CTLA-4        | Antígeno-4 do linfócito T citotóxico                     |
| GM-CSF        | Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos |
| IgG           | Imunoglobulina G   |
| IgG4          | Subtipo da Imunoglobulina G                              |
| IL-1          | Interleucina-1   |
| IL-2          | Interleucina-2   |
| IL-3          | Interleucina-3   |
| IL-6          | Interleucina-6   |
| IL-8          | Interleucina-8   |
| IL-10         | Interleucina-10  |
| IL-12         | Interleucina-12  |
| IFN- $\gamma$ | Interferon Gama  |

|               |   |
|---------------|---|
| LAG-3         | Gene 3 de ativação de linfócitos                                  |
| Micro-CT      | Microtomografia computadorizada                                   |
| NK            | Células natural killer  |
| PD-1          | Proteína transmembrana do tipo I                                  |
| PDL-1         | Ligante de morte programada 1                                     |
| PDL-2         | Ligante de morte programada 2                                     |
| PMN           | Neutrófilos polimorfonucleares                                    |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa                                     |
| TGF- $\beta$  | Fator de crescimento transformante beta                           |
| VISTA         | Supressor de ativação de células T de domínio V de imunoglobulina |

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

---

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) e o Ministério da Saúde, desenvolveu o ABC do Câncer que, em sua última edição, relatou como essa doença vem impactando e mudando o perfil de adoecimento da população brasileira. Segundo o INCA, o câncer está entre as doenças não transmissíveis que mais impactam nessa mudança, com uma estimativa para o triênio 2023/2025, da ocorrência de cerca de 704 mil novos casos de câncer no Brasil (SANTOS *et al.*, 2023).

Tratando-se de uma doença que constitui uma questão de saúde pública, fica clara a crescente necessidade de estudos voltados aos tratamentos odontológicos, incluindo o tratamento endodôntico, em pacientes oncológicos uma vez que o tratamento antineoplásico possui um envolvimento sistêmico eminente e, muitas vezes, com presença de alterações com alto impacto na qualidade de vida desses pacientes.

## 1.1 O PAPEL DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DOS SEUS CHECKPOINTS EM RELAÇÃO AS CÉLULAS TUMORAIS

A atuação do sistema imunológico na prevenção e na edição da imunogenicidade das células tumorais pode ser dividida em 3 fases: eliminação, equilíbrio e escape. Na fase de eliminação as células imunes reconhecem e destroem as células neoplásicas antes que elas estabeleçam um tumor clinicamente detectável, já na fase do equilíbrio ocorre um estado dinâmico no qual o crescimento tumoral é contido pela vigilância imunológica contínua, porém não é completamente erradicado. Por fim, a fase de escape ocorre quando as células tumorais, que sobreviveram ao equilíbrio, adquirem características que as permitem escapar do

controle imunológico. (MATZINGER,1994; WRENSHALL *et al.*, 1999; FREDERICK & CLAYMAN, 2001; DUNN *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2018).

Outros estudos relataram que a fase de escape tumoral também é resultado de alterações que ocorrem nas próprias células tumorais. Essas alterações podem incluir o controle tumoral por células imunes efectoras, como perda de expressão do antígeno, ou o desenvolvimento de uma via de escape da ação imune, como a expressão de proteínas que interferem nas vias de sinalização do controle imunológico (MARINCOLA *et al.*, 2000; PEDOEEM *et al.*, 2014; RIBAS, 2015).

PARDOLL (2012) descreve os *checkpoints* imunológicos como vias essenciais para manter a auto tolerância regulando, assim, a autoimunidade. As células tumorais, nesse contexto, associam-se a essas vias como principal mecanismo de escape, especialmente contra células T específicas para antígenos tumorais. Os dois receptores mais conhecidos por suas funções inibitórias da ação imunológica, são o antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e a proteína 1 de morte celular programada (PD-1).

### 1.1.1 Receptores Inibitórios

Alguns autores descrevem o receptor imune inibitório PD-1 como uma proteína transmembrana do tipo I, pertencente à superfamília de imunoglobulinas CD28 (TSAI *et al.*, 2014; LÁZÁR-MOLNÁR *et al.*, 2017). É uma proteína composta por 288 aminoácidos onde esses aminoácidos são divididos em um domínio extracelular globular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. O PD-1 é expresso em células T ativadas por antígenos, como por exemplo: células T CD4 + e CD8 +, células B, células mieloides (monócitos), células natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas e em células T com estímulos crônicos, o que sugere múltiplos papéis na regulação do sistema imunológico. O receptor PD-1 anui

dois ligantes: o PDL-1 e o PDL-2. O PDL-1 é expresso nas células apresentadoras de antígenos (APCs), em diversas células teciduais e em algumas células tumorais. Já o PDL-2 é expresso principalmente em APCs (KEIR *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2015; GORDON *et al.*, 2017).

Já o receptor CTLA-4, o antígeno-4 do linfócito T citotóxico, é expresso somente em células T e é um membro da família de receptores CD28. Após a ativação das células T responsivas, ocorre a autoexpressão do CTLA-4 o que desativa a ativação adicional dessas células, finalizando, assim, a resposta imune. Já nas células T regulatórias, quando expresso em alto grau, o receptor CTLA-4 serve para prevenir a ativação de células responsivas adicionais.

Uma vez que CD28 e CTLA-4 reconhecem os mesmos ligantes: CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), quando expresso, o CTLA-4 atua como um inibidor competitivo de CD28 por reduzir a disponibilidade de B7 nas APCs para fornecer coestimulação via o receptor CD28. A elucidação de que o CTLA-4 define um conjunto ou pontos específicos das respostas imunes, gerou estudos para o uso clínico de anticorpos no bloqueio desse receptor para promover respostas imunológicas aumentadas as células tumorais. Diferente do CTLA-4, receptor PD-1 tem, como principal papel, limitar a atividade de células T efetoras em órgãos e tecidos periféricos durante as respostas inflamatórias e prevenir a autoimunidade. Além disso, a expressão de PD-1 em células T aumenta com a estimulação crônica pelo antígeno, sendo extremamente importante nos mecanismos de escape imunológico, durante infecções virais crônicas e presença de células tumorais (GHIOOTTO *et al.*, 2010; RAMSAY, 2013).

### **1.1.2 Exaustão de células T**

WHERRY & KURACHI (2015) relatam que tanto em infecções crônicas quanto no câncer, as células T são expostas a antígenos e/ou sinais inflamatórios persistentemente. Isso é frequentemente associado à deterioração da função das células T, em um estado chamado de “exaustão”, as células T esgotadas perdem suas funções efetoras, expressam múltiplos receptores inibitórios e são definidas por um programa transcricional alterado. A exaustão das células T está frequentemente associada ao controle ineficiente de infecções persistentes e a presença de células tumorais, porém a revitalização das células T exaustas pode reativar a sua função imune. Os autores ressaltam, também, que embora a exaustão das células T impeça o controle ideal de infecções e células tumorais, as vias de modulação super-expressas na exaustão – como via da proteína 1 de morte celular programada (PD-1) e o antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) – podem ser inativadas e reverter esse estado disfuncional, revigorando as respostas imunes. A demonstração de que a exaustão das células T é reversível em vez de um destino terminal ou irreversível, fornece uma oportunidade clínica substancial para empregar a imunoterapia na melhora da imunidade.

### **1.1.3 Bloqueando as vias de inibição das células T através da imunoterapia**

Uma das principais armas das células tumorais contra o sistema imunológico é através do engajamento de moléculas inibidoras de células T que, normalmente, atuam prevenindo a autoimunidade ou regulando a resposta imune contra microrganismos. Evidências experimentais e clínicas mostraram que as respostas de célula T a alguns tumores são inibidas pelo envolvimento dos receptores PD-1 com seus ligantes, porém essas interações podem ser bloqueadas por anticorpos ou

moduladas por formas recombinantes de ligantes ou receptores (PARDOLL, 2012; RAMSAY, 2013; OSTRAND *et al.*, 2014; PEDOEEM *et al.*, 2014).

Estudos mostram que o bloqueio de PD-1 ou do seu ligante, pode melhorar a atividade lítica antitumoral e a produção de anticorpos em pacientes oncológicos. Além disso, a expressão de receptores PD-1 e CTLA-4 em células T regulatórias e células mieloides supressoras, regula positivamente a sua função imunossupressora. Uma vez que ocorre o bloqueio terapêutico destes receptores, a atividade das células T regulatórias e células mieloides supressoras no microambiente tumoral parece diminuir, promovendo o *killing* tumoral pelas células T (FRANCISCO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; RAMSAY, 2013; OSTRAND *et al.*, 2014).

Os anticorpos são considerados atualmente a terapia de primeira linha para alguns tumores metastáticos. A terapia com anticorpos monoclonais anti-PD-1 tem alcançado uma notoriedade clínica substancial, tendo como principal função o bloqueio da via de sinalização do receptor PD-1 (PD-1/PDL-1). Com isso, ocorre a melhora das respostas imunes uma vez que elimina essa manobra de proteção das células tumorais. Promovendo, assim, uma capacidade às próprias células T, antes bloqueadas, imunológica antitumoral (CONITEC, 2019).

Dentre as imunoglobulinas, a IgG é a forma preferida para muitas indicações, pois, segundo os estudos de AL-RUBEAI *et al.* (2011), ela possui elevada meia-vida plasmática, estabilidade molecular, adequação para uma purificação de afinidade eficiente e funções imunológicas efetoras.

Nesse projeto será abordado o OPDIVO® (ANEXO 1, pág.39), produzido pela Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA e aprovado pelo Food and Drug Administration desde 2014 (FDA, 2014) para ser usado em algumas terapias antineoplásicas, como no tratamento do melanoma (avançado ou tratamento adjuvante), do câncer de pulmão de células não pequenas e do carcinoma de

células escamosas da cabeça e pescoço. Sua substância ativa é o Nivolumabe, um anticorpo monoclonal pertencente à classe das imunoglobulinas IgG4. Ele provoca a inibição do checkpoint imune por bloquear a interação entre PD-1 e PD-L1/PD-L2 ao se ligar ao receptor PD-1. Uma vez que células cancerígenas podem produzir as proteínas PD-L1 e PD-L2 e se ligarem a esse receptor desativando a atividade das células T, o Nivolumabe, ao se ligar ao receptor PD-1, impede que PD-L1 e PD-L2 tumorais desativem as células T, aumentando a capacidade do sistema imunológico de eliminar células tumorais (EMA, 2021).

## **1.2 LESÃO PERIRRADICULAR NO CENÁRIO ONCOLÓGICO**

### **1.2.1 Patogenia da lesão perirradicular**

Segundo SIQUEIRA & RÔÇAS (2007), a lesão perirradicular é um grupo de doenças inflamatórias causadas por microrganismos (principalmente bactérias) que infectam o sistema de canais radiculares. O processo se inicia após a necrose pulpar como resultado de cárie, trauma ou procedimentos iatrogênicos, quando bactérias invadem e colonizam o sistema de canais radiculares. As bactérias que colonizam o canal radicular necrótico entram em contato com o ligamento periodontal via forames apicais ou laterais, induzindo danos a esses tecidos dando origem as alterações inflamatórias. O sistema imune do hospedeiro, por sua vez, pode eliminar as bactérias que saem do canal, porém são incapazes de erradicar as bactérias presentes no interior do canal radicular necrosado, que carece de uma microcirculação ativa e, conseqüentemente, está além do alcance do sistema imune.

### **1.2.2 Histopatologia da lesão perirradicular**

As lesões perirradiculares foram descritas como barreiras que restringem os microrganismos e impedem sua disseminação para os tecidos circundantes. As células inflamatórias e não inflamatórias do hospedeiro, na tentativa de eliminar e conter as bactérias e seus produtos dos tecidos perirradiculares, liberam mediadores químicos, como citocinas e prostaglandinas, que estão envolvidos na indução da reabsorção óssea caracteristicamente observada na lesão perirradicular crônica (STASHENKO, 1990; NAIR, 1997; BATTAGLINO *et al.*, 2002).

As citocinas pró-inflamatórias aumentam a proliferação e diferenciação de precursores de osteoclastos promovendo a ativação de osteoclastos maduros, ou ambos, estimulando, assim, a reabsorção óssea sendo seguida pela substituição por um tecido granulomatoso e uma parede densa de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Não tão comum, há um tampão epitelial no forame apical para bloquear a penetração de microrganismos nos tecidos extra radiculares, sendo essa a característica histológica do cisto perirradicular. Apenas um número limitado de patógenos endodônticos pode penetrar através dessas barreiras; entretanto, produtos microbianos e toxinas são capazes de penetrar essas barreiras para iniciar e estabelecer a patologia perirradicular (NAIR, 1997; ROODMAN, 1993).

### **1.2.3 O papel da resposta imunológica na lesão perirradicular**

A resposta imune consiste em uma rede biológica elaborada que integra processos complexos e interconectados de reconhecimento de patógenos presentes na imunidade inata e na imunidade adaptativa. Ela é protetora em sua intenção, mas uma vez que se torna desregulada, inadequada, persistente ou excessiva, sua natureza se torna destrutiva. Esta intrincada constelação de processos é flexível, dinâmica e fortemente individual (YANAGISAWA, 1980; TERONEM *et al.*, 1996).

De acordo com vários estudos, as principais células inflamatórias presentes nos cistos e granulomas envolvem os linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos. Macrófagos desempenham um papel importante no desenvolvimento de reações inflamatórias devido à sua capacidade de liberar inúmeros mediadores químicos que modulam a inflamação local (YANAGISAWA, 1980; DOHLSTEN *et al.*, 1987; PIATTELLI *et al.*, 1991; TERONEM *et al.*, 1996; SANDLER *et al.*, 2007).

Em relação aos mediadores inflamatórios, estudos verificaram diferentes citocinas como as interleucinas IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, o interferon IFN- $\gamma$ , o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (KABASHIMA *et al.*, 1998; COLIC *et al.*, COLIC *et al.*, 2007). Todos esses mediadores foram detectados em quantidades variáveis em modelos experimentais em animais e em lesões perirradiculares humanas.

#### 1.2.4 Associação entre lesão perirradicular e condições sistêmicas

Com o avanço científico na área que abrange a inter-relação entre condições patológicas dos tecidos perirradiculares e condições sistêmicas, alguns estudos foram conduzidos para investigar sobre as possíveis alterações sistêmicas que podem potencializar a patogênese da infecção endodôntica, bem como o potencial da infecção endodôntica em desencadear e/ou potencializar danos sistêmicos.

Dentre as condições sistêmicas mais citadas na literatura, estão o diabetes mellitus, a aterosclerose e as doenças cardiovasculares, hepáticas e autoimunes. Os estudos citam, dentre outros achados, os níveis de citocinas inflamatórias presentes nessas inter-relações entre doença sistêmica e lesão perirradicular, o potencial de cura da lesão perirradicular em pacientes sistêmicos e a sua prevalência através de

avaliações radiográficas (COTTI *et al.*, 2011; CINTRA *et al.*, 2014; CASTELLANOS *et al.*, 2013; CANTIGA *et al.*, 2021; GUERRERO *et al.*, 2021).

Em um estudo de modelo animal, COTTI *et al.* (2017) avaliaram a influência do Adalimumabe, um medicamento inibidor do fator de necrose tumoral (Anti-TNF- $\alpha$ ) utilizado no controle de doenças autoimunes como a psoríase, Doença de Crohn e pacientes reumáticos, na reparação da lesão perirradicular e ficou evidenciado que nem o uso sistêmico do Adalimumabe nem seu uso local atrasaram a cicatrização da lesão perirradicular. Na verdade, os resultados desse estudo evidenciaram uma reparação tecidual perirradicular mais rápida no grupo que fez uso do medicamento quando comparado ao grupo controle.

#### 1.2.5 Checkpoints imunológicos e a lesão perirradicular

Recentemente, DELGADO *et al.* (2019) avaliaram a expressão da proteína 1 de morte programada (PD-1) e do ligante de morte programada 1 (PD-L1) em leucócitos da lesão perirradicular crônica, bem como os níveis de citocinas nas lesões perirradiculares. Baseados na hipótese que a persistência bacteriana e a infecção pulpar crônica são facilitadas pela exaustão das células T que expressam o receptor inibitório PD-1, os autores tiveram como objetivo analisar a participação potencial de PD-1 no desenvolvimento da lesão perirradicular crônica humana. No geral, 26 pacientes foram avaliados: 10 com lesão perirradicular e 16 com tecido gengival saudável (usados como grupo controle). Através da citometria de fluxo, os leucócitos de ambos os grupos foram avaliados e os níveis de citocinas foram avaliados por ensaio imunoenzimático. Em relação a caracterização fenotípica de leucócitos no tecido gengival de pacientes com lesão perirradicular crônica, os autores detectaram um maior número de leucócitos isolados nesse grupo do que no grupo controle. Sendo 75,3% o fenótipo de T CD3+. Dentro do fenótipo CD3+, a

proporção de células T CD4+ foi maior no grupo com lesão perirradicular do que no grupo controle, assim como a frequência de células T CD4+ que expressam CD45RO, CD25 e CTLA-4 foram significativamente maiores na lesão perirradicular do que nas células das amostras de controle, sugerindo a prevalência de um fenótipo com caráter supressor e de memória dessas células T. Em relação às células T CD8+, as frequências de CTLA-4 foram significativamente maiores nas lesões perirradiculares quando comparado com as células das amostras do grupo controle. Curiosamente, a expressão de CD28 foi menor em células T CD8+ na lesão perirradicular quando comparado ao grupo controle. Sendo o CD28 o correceptor principal na ativação, proliferação e sobrevivência das células T, pode-se sugerir que a presença do fenótipo CD8+ CD28- na lesão perirradicular representaria uma menor diversidade do receptor de células T (TCR), menor proliferação após engajamento antigênico, maior citotoxicidade, caráter supressor dessas células T CD8+ e menor habilidade em secretar IL-2 e menor regulação na ativação de células T. Somado a isso, os autores encontraram uma maior quantidade de células T CD4+ ativas quando comparados ao tecido gengival saudável. Sobre a expressão de PD-1, o tema principal do presente projeto, DELGADO *et al.* (2019) observaram que em células T CD4+ a expressão de PD-1 foi significativamente maior do que em leucócitos de tecido gengival saudável, bem como a porcentagem da expressão de PD-1 em células T CD8+. Quando os autores analisaram a expressão de PDL-1, os resultados mostram frequências mais altas de células T e macrófagos que expressam essa proteína em amostras de lesão perirradicular. Os macrófagos presentes na lesão também apresentaram maior expressão de PDL-1 do que outras células imunes analisadas nesse estudo.

WANG *et al.* (2018) também avaliaram, através de imuno-histoquímica, a expressão de PD-1/LAG-3 em lesões perirradiculares de humanos. O gene 3 de

ativação de linfócitos (LAG-3) é outra via de inibição do checkpoint imunológico, uma molécula expressa na superfície de células imunes, incluindo linfócito T CD4+, Células T CD8+ e um subconjunto de células natural killer (NK). A análise foi feita em 14 casos de granulomas e 13 casos de cistos perirradiculares em pacientes. Os resultados mostraram que a resposta imune nas lesões perirradiculares são, de fato, agressivas. Tanto na expressão de TNF $\alpha$  quanto na infiltração de CD4+/CD8+. Além disso, os resultados desse estudo mostraram que as células T podem expressar PD-1 e LAG-3 devido à inflamação progressiva nas lesões perirradiculares, sugerindo ser uma maneira potencialmente nova de impedir a inflamação progressiva, restringindo assim a destruição óssea grave causada pelo granuloma perirradicular.

Esses estudos tornam-se bases importantes para o presente projeto, sobre a possível interação do anticorpo monoclonal Nivolumabe e as células que expressam PD-1 presentes na lesão perirradicular.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

Estudos sobre a contribuição das moléculas coestimuladoras à imunopatogênese da lesão perirradicular, bem como os biomarcadores presentes nos fenótipos celulares na lesão perirradicular crônica, são escassos na literatura. Com as estimativas sobre a incidência de câncer no Brasil, fica clara a necessidade de linhas de pesquisas direcionadas a esse grupo de pacientes, para que se entenda melhor a resposta dos tecidos perirradiculares frente à infecção. Na oncologia, os avanços nos tratamentos antineoplásicos se dão, principalmente, em relação à Imunoterapia, por isso é de suma importância compreender a inter-relação sistêmica desse grupo de biofármacos em todos os âmbitos da saúde, inclusive na saúde oral.

Dependendo do protocolo quimioterápico, pacientes oncológicos submetidos a esse tipo de terapia antineoplásica, por volta do 10<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia após o início do tratamento, sofrem uma queda na contagem das células sanguíneas de forma intensa. Este período é conhecido como NADIR de quimioterapia. A queda da contagem das células brancas é a mais alarmante de todas e deve ser alvo de grande atenção. É muito comum que durante o período NADIR, os pacientes passem por uma agudização de um processo crônico na cavidade oral. Dentes com lesões perirradiculares podem sofrer um processo de agudização, com sinais e sintomas clínicos presentes. Com o advento da Imunoterapia, um dos efeitos adversos em pacientes que fazem uso desses biofármacos é a exacerbação da reação imunológica. Seria correto afirmar que os sinais clínicos de uma agudização de lesão perirradicular são, na verdade, uma exacerbação imune local? No que se refere especificamente ao Nivolumabe, não há estudos na literatura avaliando o seu efeito sobre a progressão e severidade da lesão perirradicular.

### **3. OBJETIVOS**

---

Esse estudo teve como objetivo avaliar a influência do Nivolumabe no desenvolvimento e na severidade da lesão perirradicular induzida em ratos. Dados sistêmicos dos animais também foram coletados e comparados.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **4.1 PARECER ÉTICO**

O projeto de pesquisa está de acordo com Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e obteve aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA), sob o protocolo PEBIO/UNIG N° 001/23 (ANEXO 2, pág,41).

### **4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Foram utilizados neste estudo 34 ratos machos adultos, com 10 semanas de idade, da linhagem Wistar. Os animais foram mantidos em gaiolas sob temperatura ambiente controlada (25°C), umidade constante, com ciclos de 12 horas/escuro e de 12 horas/claro (06:00–18:00 horas), com acesso livre à comida e água. Após o período de aclimatação de dez dias, os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: o grupo controle sem o uso do Nivolumabe (n=16) e o grupo em que este medicamento foi administrado (n=18).

### **4.3 O BLOQUEIO DA INTERAÇÃO DE PD-1/PDL-1**

Os animais do grupo experimental (n=18) foram divididos aleatoriamente em 2 subgrupos experimentais: grupo N1 (n=10), tratados com anticorpo monoclonal imunoglobulina G4 (IgG4), que se liga ao receptor de morte programada 1 (PD-1), o Nivolumabe, em sua forma comercial OPDIVO®, no intuito de averiguar uma possível inter-relação do Nivolumabe com a formação da lesão perirradicular por um período de 2 meses (totalizando 4 aplicações) com administração intraperitoneal e o

grupo N2 (n=8) que recebeu o medicamento 15 dias antes (1 aplicação) da indução da lesão perirradicular (WEBER *et al.*, 2015; ASCIERTO *et al.*, 2019; EMA, 2022;).

Após uma semana da indução da lesão perirradicular, os animais dos grupos experimentais N1 e N2 continuaram recebendo Nivolumabe por mais 40 dias, totalizando 2 aplicações. O grupo controle foi subdividido da mesma forma que o grupo experimental, C1 (n=8) e C2 (n=8), e receberam solução fisiológica nos mesmos períodos que seus respectivos grupos experimentais (WEBER *et al.*, 2015; ASCIERTO *et al.*, 2019; EMA, 2022;).

#### **4.4 ADMINISTRAÇÃO DO NIVOLUMABE NA SUA FORMA COMERCIAL OPDIVO®**

A dosagem do OPDIVO® foi de acordo com as recomendações do fabricante e da *Food and Drug Administration* (FDA), quando usado como mono droga para o melanoma avançado sem tratamento prévio, que é de 3 mg/kg. O cálculo foi feito individualmente de acordo com o peso de cada animal e administrado por injeção intraperitoneal (FDA, 2020; YANG *et al.*, 2021; Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA).

#### **4.5 INDUÇÃO DA LESÃO PERIRRADICULAR**

Com quatro meses e meio de idade, todos os animais foram anestesiados com Xilazina 2% e Quetamina 10% e Midazolam 5 mg (0,1 mL/100 g de peso corporal). Em seguida, uma broca esférica no. 1/2 (KG Sorensen, São Paulo, SP), ativada por um motor de baixa velocidade (CS 421; Dentec, Rio de Janeiro, RJ), foi usada para expor as polpas dos primeiros molares inferiores.

#### **4.6 ANÁLISE BIOMÉTRICA**

A massa corporal dos animais foi verificada desde o início do experimento até o dia do sacrifício. A pesagem foi realizada semanalmente com auxílio de uma balança digital (Meller Toledo 9094, SP, Brasil).

#### **4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA SANGUÍNEA**

Quinze dias após a última aplicação do Nivolumabe ao final do 40º dia, os animais foram anestesiados com Xilazina 2% e Quetamina 10% e Midazolam 5 mg (0,2 ml/100 g de peso corporal), eutanasiados por exsanguinação e o sangue foi coletado através da punção cardíaca para análise bioquímica.

O sangue foi avaliado para atividade leucocitária global e diferencial, função hepática através das taxas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e função renal através do nitrogênio úrico no sangue (BUN) e creatinina (CR), para fins de comparação entre os grupos sobre os efeitos sistêmicos do Nivolumabe (YANG *et al.*, 2021; TAGUCHI *et al.*, 2022).

#### **4.8 EXAME DE IMAGEM**

As hemi-mandíbulas esquerdas foram removidas, lavadas e imersas em solução salina. Nas imagens obtidas, as áreas das lesões perirradiculares associadas aos ápices das raízes mesiais dos primeiros molares foram analisadas e quantificadas em pixels por meio do *software* ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, EUA). As tomadas radiográficas foram realizadas em aparelho Radiográfico Digital (Modelo Digital MI Fit T2- Micro Imagem, SP, Brasil) e um observador externo e qualificado realizou as análises dos grupos e cada imagem duas vezes.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram comparados entre os grupos controle e experimental por meio dos testes não paramétricos de Mann Whitney, utilizando o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA

Os valores numéricos finais das médias da massa corporal podem ser observados na Tabela 1. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias das massas finais dos animais do estudo.

**Tabela 1:** Médias da massa corporal final (g)

| GRUPO | N  | Média de peso final | P      |
|-------|----|---------------------|--------|
| N1    | 10 | 440,9 ±19,37        |        |
| C1    | 8  | 416,2 ±34,23        | 0,1375 |
| N2    | 8  | 428,7 ±34,23        |        |
| C2    | 8  | 404,2 ±28,75        | 0,2345 |

---

### 5.2 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

#### 5.2.1 Análise de eritrócitos e plaquetas

A contagem de eritrócitos e os valores plaquetários coletados ao final do experimento podem ser observados nas Tabelas 2, 3 e 4. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos N1xC1, N1xN2, C1xC2 ( $p>0,05$ ). Porém, houve diferença estatisticamente significativa entre N2xC2 ( $p=0,0207$ ) nos valores do volume globular médio.

**Tabela 2:** Valores de Hemácias e Hemoglobina

| GRUPO | N  | Hemácia    | P      | Hemoglobina | P      |
|-------|----|------------|--------|-------------|--------|
| N1    | 10 | 8,45±0,899 | 0,2743 | 15,04±0,898 | 0,7618 |
| C1    | 8  | 8,45±0,899 |        | 14,8±0,637  |        |
| N2    | 8  | 8,68±0,238 |        | 14,58±0,369 |        |
| C2    | 8  | 9,06±0,452 | 0,083  | 14,76±0,651 | 0,2345 |

**Tabela 3:** Valores de Hematócritos e Volume globular médio

| GRUPO | N  | Hematócrito | P      | VGM         | P      |
|-------|----|-------------|--------|-------------|--------|
| N1    | 10 | 42,9±4,152  | 0,3154 | 50,81±0,943 | 0,4598 |
| C1    | 8  | 44,71±2,806 |        | 50,48±0,898 |        |
| N2    | 8  | 44,58±0,911 |        | 51,36±0,824 |        |
| C2    | 8  | 45,58±1,956 | 0,1304 | 50,31±1,068 | 0,0207 |

**Tabela 4:** Valores de Concentração de Hemoglobina Globular Média e Plaquetas

| GRUPO | N  | CHGM        | P      | Plaquetas   | P      |
|-------|----|-------------|--------|-------------|--------|
| N1    | 10 | 35,4±4,484  | 0,2031 | 763,8±296,3 | 0,8884 |
| C1    | 8  | 33,18±1,440 |        | 672,4±273,7 |        |
| N2    | 8  | 32,69±0,533 |        | 768,4±101,0 |        |
| C2    | 8  | 32,4±0,164  | 0,1949 | 724,3±125,6 | 0,1304 |

#### 5.2.2 Análise do total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos

Os valores da série branca podem ser observados na Tabela 5 e 6. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos N1xN2 e C1xC2 em relação a contagem global de leucócitos, linfócitos e monócitos ( $p > 0,05$ ). Porém, em relação aos segmentados (neutrófilos), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos N1xC1 e N2xC2 ( $p = 0,0499$  e  $p = 0,0059$  respectivamente).

**Tabela 5:** Contagem de Leucócitos e Linfócitos

| GRUPO | N  | Leucócito   | P      | Linfócito   | P      |
|-------|----|-------------|--------|-------------|--------|
| N1    | 10 | 8,563±4,290 | 0,9591 | 83,25±3,284 | 0,9591 |
| C1    | 8  | 7,875±1,994 |        | 83,13±3,603 |        |
| N2    | 8  | 6,875±1,262 | 0,4418 | 80,2±3,633  |        |
| C2    | 8  | 7,525±1,182 |        | 85,25±2,062 | 0,0635 |

**Tabela 6:** Contagem de Monócitos e Segmentados

| GRUPO | N  | Monócito    | P      | Segmentado  | P      |
|-------|----|-------------|--------|-------------|--------|
| N1    | 10 | 1,125±0,834 | 0,7984 | 16,38±2,722 | 0,0499 |
| C1    | 8  | 1,375±1,188 |        | 13,75±3,240 |        |
| N2    | 8  | 1,625±1,061 | 0,3969 | 18,43±4,036 |        |
| C2    | 8  | 1,143±0,378 |        | 10,13±4,422 | 0,0059 |

### 5.2.3 Em relação à função renal

Os valores de nitrogênio úrico no sangue (BUN) e da creatinina (CR) presentes na corrente sanguínea podem ser verificados na Tabela 7. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos N1xC1, N2xC2, N1xN2, C1xC2 em relação ao BUN presente na corrente sanguínea. No entanto, em relação à CR, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre N1xC1 ( $p=0,001$ ).

**Tabela 7:** Valores do nível de Ureia Nitrogenada e Creatinina

| GRUPO | N  | BUN         | P      | CR            | P      |
|-------|----|-------------|--------|---------------|--------|
| N1    | 10 | 51,5±5,099  | 0,9497 | 0,668±0,07180 | 0,0011 |
| C1    | 8  | 50,17±10,76 |        | 0,5±0,06803   |        |
| N2    | 8  | 49,14±3,436 |        | 0,637±0,04432 |        |
| C2    | 8  | 52,17±5,529 | 0,4452 | 0,598±0,1315  | 1      |

### 5.2.3 Em relação à função hepática

Os valores de alanina aminotransferase (ALT) e de aspartato aminotransferase (AST) presentes na corrente sanguínea podem ser observados na Tabela 8. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de AST entre os grupos N1xC1, N2xC2, N1xN2, C1xC2 ( $p>0,05$ ). Já em relação aos valores de ALT, houve diferença significativa em relação ao grupo N2xC2 ( $p=0,0002$ ). Porém, não foi observada diferença em relação aos outros grupos.

**Tabela 8:** Valores de Alanina Aminotransferase e Aspartato Aminotransferase

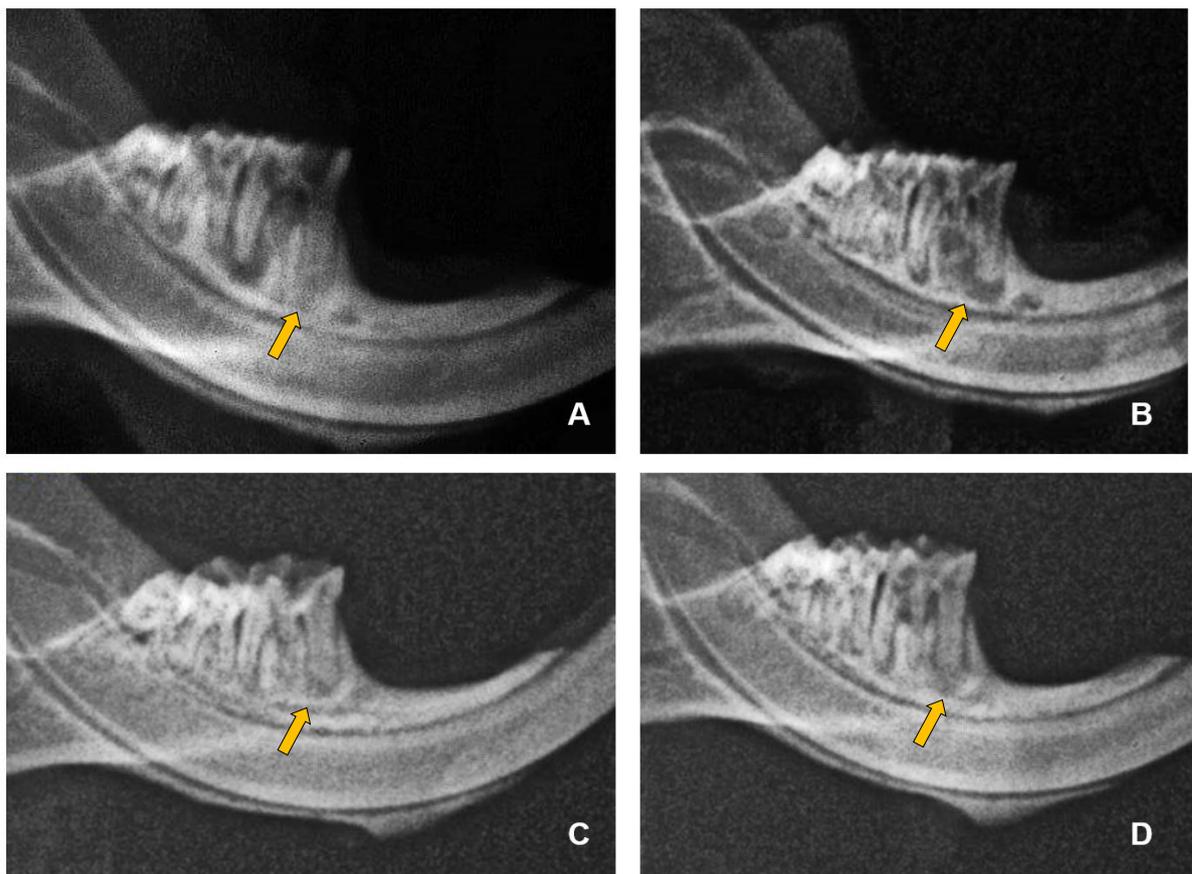
| GRUPO | N  | ALT         | P      | AST         | P      |
|-------|----|-------------|--------|-------------|--------|
| N1    | 10 | 52,9±34,17  | 0,4082 | 115±67,14   | 0,7128 |
| C1    | 8  | 40,13±14,78 |        | 85,17±11,70 |        |
| N2    | 8  | 54,5±5,345  |        | 92,63±10,47 |        |
| C2    | 8  | 34,75±4,432 |        | 85,71±7,499 |        |

#### 5.4 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Os valores numéricos das médias das áreas das lesões perirradiculares dos grupos podem ser observados na Tabela 9. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos N1xC1, N2xC2, N1xN2, C1xC2 ( $p>0,05$ ).

**Tabela 9:** Áreas das lesões perirradiculares (pixel)

| GRUPO | N  | Área da Lesão | P     |
|-------|----|---------------|-------|
| N1    | 10 | 860,7±379,8   | 0,281 |
| C1    | 8  | 589,9±314,7   |       |
| N2    | 8  | 809,5±214,6   |       |
| C2    | 8  | 597,9±322,3   |       |



**Figura 1:** Radiografias das mandíbulas. **A:** Grupo N1 aplicação do Nivolumabe durante 2 meses antes da indução da lesão perirradicular; **B:** Grupo N2 aplicação do Nivolumabe 15 dias antes da indução da lesão perirradicular; **C:** Grupo C1, aplicação de solução salina durante 2 meses antes da indução da lesão perirradicular; **D:** Grupo C2, aplicação de solução salina 15 dias antes da indução da lesão perirradicular.

## 6. DISCUSSÃO

---

As lesões perirradiculares representam complexas barreiras leucocitárias, fundamentais para restringir a saída de microrganismos do interior do sistema de canais radiculares para os tecidos perirradiculares, prevenindo, assim, sua disseminação para o osso e outras regiões organismo. Essa reação imune é predominantemente mediada por células como linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos, essenciais para o combate e contenção da infecção (YANAGISAWA, 1980; DOHLSTEN *et al.*, 1987; PIATTELLI *et al.*, 1991; TERONEM *et al.*, 1996; SANDLER *et al.*, 2007).

Referindo-se ao câncer e às infecções crônicas, WHERRY & KURACHI (2015) destacaram que as células T, continuamente expostas a antígenos e sinais inflamatórios, podem entrar em um estado de exaustão, comprometendo a eficácia da resposta imune. Porém, a inativação das vias de exaustão, particularmente através da modulação da proteína 1 de morte celular programada (PD-1), pode revitalizar a funcionalidade das células T. Da mesma forma, em uma investigação sobre a expressão de PD-1 e seu ligante PD-L1 em leucócitos associados a lesões perirradiculares crônicas em humanos, DELGADO *et al.* (2019) observaram uma prevalência elevada de células T e macrófagos expressando essas proteínas, sugerindo um ambiente imune altamente regulado nessas condições patológicas. Já WANG *et al.* (2018) avaliaram a superexpressão de PD-1 e LAG-3 em lesões perirradiculares em humanos, apontando para o significativo papel dos *checkpoints* imunológicos na dinâmica da perda óssea inflamatória. No estudo de YANG *et al.* (2021) a molécula abordada pelos autores foi o supressor de ativação de células T de domínio V de imunoglobulina (VISTA), que compartilha homologias consideráveis com PD-1 e PD-L1 em lesões perirradiculares de camundongos. A relevância da

superexpressão de PD-1 e LAG-3 nas lesões sugere um impacto significativo dos checkpoints imunológicos na progressão da perda óssea inflamatória. Estes estudos ampliam a compreensão da dinâmica imunológica envolvida nas lesões perirradiculares, destacando o papel das células T ativadas e de outros componentes imunes na promoção da osteoclastogênese e o potencial moderador exercido pelas células T regulatórias.

Nesse cenário, a inclusão do Nivolumabe em nosso estudo buscou investigar sua interação com o desenvolvimento da lesão perirradicular. Após a seleção da amostra, os grupos foram divididos em grupo experimental e grupo controle. O grupo experimental foi dividido em dois subgrupos: N1 (uso do Nivolumabe a cada 2 semanas por 2 meses) e N2 (uso do Nivolumabe 15 dias antes da indução da lesão perirradicular). Embora a literatura seja limitada sobre o tempo mínimo para ação do Nivolumabe, ensaios clínicos em pacientes com melanoma avançado mostraram que respostas objetivas ao tratamento com Nivolumabe ocorreram após 8 a 12 semanas de tratamento (WEBER *et al.*, 2015; ASCIERTO *et al.*, 2019; EMA, 2022).

O modo de aplicação foi de forma intraperitoneal, similar a estudos anteriores em modelos animais (WEBER *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2021).

A metodologia utilizada para a indução da lesão perirradicular seguiu os mesmos parâmetros de estudos anteriores (ARMADA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009). A reabsorção óssea perirradicular, induzida pela exposição pulpar, foi observada em todos os grupos experimentais através da análise radiográfica.

Além da avaliação do tecido ósseo através de radiografia, também foram realizadas avaliações biométricas e bioquímica para acompanhar os possíveis efeitos sistêmicos do Nivolumabe.

No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa em relação a massa corporal, o que corrobora com estudos anteriores (WANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2021).

O Nivolumabe se caracteriza pela sua ação na ativação da resposta imunológica por ser um inibidor do checkpoint imunológico. Neste estudo, a análise bioquímica sanguínea feita no final do experimento, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos sobre os valores da série vermelha e plaquetária. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa na contagem global de leucócitos, linfócitos e monócitos concordando com estudos clínicos anteriores onde efeitos adversos como leucocitose ou policitemia foram classificadas como raras (EMA, 2022). Contudo, na contagem de segmentados (neutrófilos), houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo N1 e C1 ( $p=0,0499$ ) e entre os grupos N2 e C2 ( $p=0,0059$ ) o que pode sugerir que o Nivolumabe, ao reativar células T exaustas e promover uma resposta imune antitumoral, altera o equilíbrio e a função de outras células do sistema imune, incluindo os neutrófilos. Isso pode levar a um aumento no recrutamento ou na atividade dessas células, refletido por alterações em seus níveis sanguíneos.

A literatura elucida alguns efeitos adversos em relação à função hepática e a função renal de pacientes que fazem uso do Nivolumabe como monoterapia para o tratamento do melanoma avançado sem tratamento prévio. As doenças renais e urinárias, por exemplo, são frequentes no que diz respeito as reações adversas ao uso do Nivolumabe. Em nossos achados não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos níveis de nitrogênio úrico no sangue (BUN) entre os grupos. Porém, houve diferença estatisticamente significativa nos valores da creatinina (CR) entre os grupos N1 e C1 ( $p=0,0011$ ) sugerindo que, embora não configure uma condição patológica renal, a função renal do grupo N1 pode ter sido

mais sensibilizada frente ao uso do Nivolumabe. É importante ressaltar que as variações nos níveis de creatinina dentro dos limites normais podem ainda ser clinicamente relevantes, especialmente se mostrarem tendências a longo prazo ou se correlacionarem com outros indicadores clínicos e laboratoriais (EMA, 2022).

Em relação aos níveis de alanina aminotransferase (ALT), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos N2 e C2, corroborando com estudos anteriores que alertam sobre como os inibidores de checkpoint imunológico, incluindo o Nivolumabe, podem causar hepatotoxicidade, manifestada por aumentos dos biomarcadores de lesão hepática, como o ALT. A hepatotoxicidade é um efeito colateral conhecido, embora relativamente incomum, associado a essa classe de medicamentos. O mecanismo subjacente pode envolver a ativação imunomediada contra células hepáticas ou tecidos, desencadeada pela modulação da resposta imune (EMA, 2022). Já em relação aos níveis de aspartato aminotransferase (AST), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Como dito anteriormente, YANG *et al.* (2021) constataram em seus estudos, que o bloqueio do supressor de ativação de células T de domínio V de imunoglobulina (VISTA) com um anticorpo anti-VISTA em um modelo experimental em ratos (n=40) exacerbou a perda óssea periapical e aumentou a infiltração de células imunes na lesão perirradicular. Mesmo que VISTA compartilhe homologias consideráveis com PD-1 e PD-L1, esse biomarcador apresenta uma expressão mais ampla, incluindo células mieloides e células T CD4+ e CD8+, e atua tanto como receptor quanto ligante, o que amplia a possibilidade de ação do anticorpo anti-VISTA nas vias receptoras desse checkpoint imunológico. Além disso, o estudo de YANG *et al.* (2021) não avaliou a interação do anti-VISTA com o desenvolvimento da lesão perirradicular como o presente estudo, mas sim a sua interação nos seus diferentes estágios de desenvolvimento, através da microtomografia

computadorizada (Micro-CT) as análises revelaram que, enquanto a área de lesão não apresentou mudanças significativas nos primeiros estágios (dias 7 e 14), houve uma exacerbação notável da perda óssea nos grupos tratados com o bloqueio de VISTA nos dias 21 e 28. Isso sugere que o papel regulatório negativo de VISTA na periodontite apical torna-se mais decisivo à medida que a doença progride para os estágios mais avançados.

Embora as lesões perirradiculares nos grupos experimentais deste estudo tenham se mostrado mais extensas nas análises realizadas com o *software* ImageJ, as diferenças não foram estatisticamente significativas, sugerindo que o bloqueio do checkpoint imunológico PD1/PDL-1 e PD-1/PDL-2 pode não ser relevante para o desenvolvimento da lesão perirradicular. A comparação das análises de imagem neste estudo e os resultados de YANG *et al.* (2021) ilustram a complexidade dos mecanismos imunológicos e suas manifestações radiográficas.

A discrepância observada pode ser explicada por uma série de fatores metodológicos e biológicos importantes. Dentre eles, as diferenças fundamentais nos modelos experimentais, incluindo o tipo de intervenção, o tipo de anticorpo monoclonal utilizado e sua dosagem, a duração do estudo e as características específicas dos animais, podem influenciar significativamente a resposta imune e, conseqüentemente, o desenvolvimento das lesões perirradiculares. Além disso, a sensibilidade dos métodos de avaliação radiográfica empregados pode variar, com técnicas como a microtomografia computadorizada (Micro-CT) oferecendo uma resolução mais alta e uma quantificação mais precisa da perda óssea em comparação a métodos radiográficos convencionais. Isto abre perspectivas para estudos futuros.

## 7. CONCLUSÕES

---

As análises radiográficas do presente estudo não demonstraram diferenças estatisticamente significativas nos tamanhos das lesões perirradiculares entre os grupos. Outros estudos utilizando abordagens diagnósticas mais sensíveis para avaliar os possíveis efeitos do inibidor de checkpoint imunológico, Nivolumabe, no desenvolvimento dessa patologia devem ser conduzidos para confirmar ou não estes achados. Entretanto, os achados bioquímicos do nosso estudo reforçam os efeitos sistêmicos do Nivolumabe.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Ascierto PA, Long GV, Robert C, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo AM, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Ny L, Arance A, Svane IM, Schadendorf D, Gogas H, Sagi A, Jiang J, Rizzo J, Atkinson V (2019). Survival Outcomes in Patients with Previously Untreated BRAF Wild-Type Advanced Melanoma Treated With Nivolumab Therapy: Three-Year Follow-up of a Randomized Phase 3 Trial. *JAMA Oncology* 5, 187-194.

Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Roças IN, Sérgio Márcio Motta SM, Siqueira JF Jr (2006). Development of periradicular lesions in normal and diabetic rat. *J Appl Oral Sci* 14: 371-375.

Battaglino R, Kim D, Fu J, Vaage B, Fu XY, Stashenko P (2002). C-MYC is required for osteoclast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research* 17, 763-773.

Cantiga-Silva C, Estrela C, Segura-Egea JJ, Azevedo JP, de Oliveira PHC, Cardoso CBM, Pinheiro TN, Ervolino E, Sivieri-Araújo G, Cintra LTA (2021). Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. *International Endodontic Journal* 54, 1353-61.

Castellanos-Cosano L, Machuca-Portillo G, Segura-Sampedro JJ, Torres-Lagares D, López-López J, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ (2013). Prevalence of apical periodontitis and frequency of root canal treatments in liver transplant candidates. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 18, 773-9.

Chen DS, Irving BA, Hodi FS (2012). Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clinical Cancer Research* 18, 6580-7.

Cintra LT, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim SR, Oliveira e Silva C, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE (2014). Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *Journal of Endodontics* 40, 1139-44.

Colić M, Vasilijć S, Gazivoda D, Vučević D, Marjanović M, Lukić A (2007). Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *European Journal of Oral Sciences* 115, 315-20.

Cotti E, Abramovitch K, Jensen J, Schirru E, Rice DD, Oyoyo U, Torabinejad M (2017). The Influence of Adalimumab on the Healing of Apical Periodontitis in Ferrets. *Journal of Endodontics* 43,1841-1846.

Cotti E, Dessì C, Piras A, Flore G, Deidda M, Madeddu C, Zedda A, Longu G, Mercurio G (2011). Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *Journal of Endodontics* 37,1624-9.

Delgado RJR, Pinheiro CR, Gasparoto TH, Sipert CR, de Moraes IG, Garcia RB, Bramante CM, Bernardineli N, Nishiyama CK, da Silva JS, Torres SA, Garlet GP, Campanelli AP (2019). Programmed Death 1 (PD-1) and PD-1 Ligand (PD-L1) Expression in Chronic Apical Periodontitis. *European Endodontic Journal* 4, 3-8.

Dohlsten M, Sjögren HO, Carlsson R (1987). Histamine acts directly on human T cells to inhibit interleukin-2 and interferon-gamma production. *Cellular immunology* 109, 65-74.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The three Es of cancer immunoediting. Annual Review of Immunology 22, 329-60.

European Medicines Agency (EMA) (2021). Opdivo (nivolumab) - An overview of Opdivo and what is it used for. European Medicines Agency, 1–6. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/opdivo-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/opdivo-epar-medicine-overview_en.pdf). Acesso em Janeiro, 2022.

European Medicines Agency (EMA) (2022). Opdivo (nivolumab) – Product information. European Medicines Agency, 41-43. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_en.pdf) . Acesso em 02/11/2022

Food And Drug Administration (FDA) (2014). Highlights of Prescribing Information- Opdivo (nivolumab) injection, for intravenous use, 1-20. Disponível em: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/125527s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/125527s000lbl.pdf). Acesso em Julho, 2021.

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. The Journal of Experimental Medicine 206, 3015-29.

Frederick MJ, Clayman GL (2001). Chemokines in cancer. Expert reviews in Molecular Medicine 3,1-18.

Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, Pastor S, Truneh A, Nunès JA, Olive D (2010). PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. International Immunology 22, 651-60.

Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, Gupta R, Tsai JM, Sinha R, Corey D, Ring AM, Connolly AJ, Weissman IL (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545, 495-499.

Guerrero-Gironés J, Ros-Valverde A, Pecci-Lloret MP, Rodríguez-Lozano FJ, Pecci-Lloret MR (2021). Association between Pulpal-Periapical Pathology and Autoimmune Diseases: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine* 10, 4886.

Kabashima H, Nagata K, Maeda K, Iijima T (1998). Interferon-gamma-producing cells and inducible nitric oxide synthase-producing cells in periapical granulomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 27, 95-100.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of Immunology* 26, 677-704.

Lázár-Molnár E, Scanduzzi L, Basu I, Quinn T, Sylvestre E, Palmieri E, Ramagopal UA, Nathenson SG, Guha C, Almo SC (2017). Structure-guided development of a high-affinity human Programmed Cell Death-1: Implications for tumor immunotherapy. *EBioMedicine* 17, 30-44.

Liu Y, Yu Y, Yang S, Zeng B, Zhang Z, Jiao G, Zhang Y, Cai L, Yang R (2009). Regulation of arginase I activity and expression by both PD-1 and CTLA-4 on the myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 58, 687-97.

Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Advances in Immunology* 74, 181-273.

Matzinger P (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology* 12, 991-1045.

Ministério da Saúde, Brasília/DF (2020). Terapia-alvo (vemurafenibe, dabrafenibe, cobimetinibe, trametinibe) e imunoterapia (ipilimumabe, nivolumabe, pembrolizumabe) para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático: Relatório de recomendação, Brasília/DF 541, 1-91.

Disponível em: [https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/2020/relatorio\\_541\\_terapiaalvo\\_melanoma\\_final\\_2020.pdf](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/2020/relatorio_541_terapiaalvo_melanoma_final_2020.pdf).

Acesso em Julho, 2021.

Nair PN (1997). Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology* 2000 13, 121-48.

Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST (2014). The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *The Journal of Immunology* 8, 3835-3841.

Pardoll DM (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer* 1, 252-64.

Park YJ, Kuen DS, Chung Y (2018). Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance. *Experimental & Molecular Medicine* 50, 1-13.

Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A (2014). Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clinical Immunology* 1, 145-52.

Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P (1991). Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *Journal of Endodontics* 17, 26-9.

Ramsay AG (2013). Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *British Journal of Haematology* 162, 313-25.

Ribas A (2015). Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discovery* 5, 915-9.

Roodman GD (1993). Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcified Tissue International* 1, 94-8.

Sandler C, Lindstedt KA, Joutsiniemi S, Lappalainen J, Juutilainen T, Kolah J, Kovanen PT, Eklund KK (2007). Selective activation of mast cells in rheumatoid synovial tissue results in production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-1Ra. *Inflammation Research* 56, 230-9.

Santos M de O, Lima FC da S de, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM de Cancela M de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Rev. Bras. Cancerol*;69(1). Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>

Siqueira JF Jr, Rôças IN (2007). Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Brazilian Dental Journal* 18, 267-80.

Stashenko P (1990). Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endodontics & Dental Traumatology* 6, 89-96.

Taguchi K, Hayashi Y, Ohuchi M, Yamada H, Yagishita S, Enoki Y, Matsumoto K, Hamada A (2022). Augmented Clearance of Nivolumab Is Associated with Renal

Functions in Chronic Renal Disease Model Rats. *Drug Metabolism and Disposition* 50, 822-826.

Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI (2014). PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10, 3111-6.

Wang HS, Yang FH, Li Y, Pei F, Kulkarni AB, Chen Z, Zhang L (2018). The expression of PD-1 and LAG-3 in periapical lesions. *American Journal of Translational Research* 10, 2677-2684.

Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, Hoeller C, Khushalani NI, Miller WH Jr, Lao CD, Linette GP, Thomas L, Lorigan P, Grossmann KF, Hassel JC, Maio M, Sznol M, Ascierto PA, Mohr P, Chmielowski B, Bryce A, Svane IM, Grob JJ, Krackhardt AM, Horak C, Lambert A, Yang AS, Larkin J (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 16, 375-84.

Wherry EJ, Kurachi M (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology* 15, 486-99.

Wrenshall LE, Stevens RB, Cerra FB, Platt JL (1999). Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans. *Journal of Leukocyte Biology* 3, 391-400.

Yanagisawa S (1980). Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *Journal of Oral Pathology* 5, 288-300.

Yang F, Zhang Y, Chen Z, Zhang L (2021). VISTA Blockade Aggravates Bone Loss in Experimental Murine Apical Periodontitis. *Frontiers in Immunology* 12, 738586.

## 9. ANEXO(S)

---

### **ANEXO 1 – OPDIVO®- Bula: Ministério da Saúde (2020)**

- Tipo: anticorpo monoclonal de imunoglobulina G4 (IgG4) que se liga ao receptor de morte programada 1 (PD-1) e bloqueia sua interação com PD-L1 e PD-L2.
- Princípio Ativo: NIVOLUMABE.
- Nome comercial: OPDIVO®.
- Apresentação: solução injetável para infusão intravenosa na concentração de 10 mg/mL em frascos de 4 mL (40 mg) e 10 mL (100 mg) de uso único.
- Detentor do registro: Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA.
- Fabricante: idem.
- Indicação aprovada na Anvisa: em monoterapia para o tratamento de melanoma avançado (irressecável ou metastático).
- Indicação proposta pelo demandante: idem.
- Posologia e Forma de Administração: a dose recomendada é 3 mg/kg, administrada por via intravenosa durante 60 minutos a cada 2 semanas.
- O tratamento deve continuar enquanto um benefício clínico for observado ou até que o tratamento não seja mais tolerado pelo paciente.
- Contraindicações: hipersensibilidade à substância ativa ou a quaisquer dos excipientes.
- Precauções/eventos adversos: reações adversas resultantes de atividade imunológica elevada (pneumonite grave ou doença pulmonar intersticial, colite ou diarreia grave, hepatite grave, nefrite grave e disfunção renal,

endocrinopatias graves, incluindo hipotireoidismo, hipertireoidismo, insuficiência adrenal, hipofisite, diabetes mellitus e cetoacidose diabética, pancreatite, uveíte, desmielinização, neuropatia autoimune (incluindo paralisia do nervo abducente e facial), síndrome de Guillain-Barré, hipopituitarismo, síndrome miastênica, encefalite, gastrite, miosite, miocardite e rabdomiólise.

## ANEXO 2- Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA)



1

UNIVERSIDADE IGUAÇU

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO PEBIO/UNIG Nº 001/23**

**Nome do Pesquisador:** JOSÉ FREITAS SIQUEIRA JUNIOR

**Outros participantes da Pesquisa:** Bianca Abreu de Azevedo; Luciana A. Dias.

**Título do Projeto:** EFEITO MONOCLONAL NIVOLUMABE NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PERIRRADICULARES EM RATOS DA MEDICAÇÃO SISTÊMICA COM ANTICORPO

**Parecer da CEUA:** De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO** para esta Comissão em reunião realizada em 16 de janeiro de 2023.

A handwritten signature in black ink, which reads 'Simoni Machado de Medeiros'.

**Simoni Machado de Medeiros**

Coordenadora da CEUA/UNIG