

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

Participação do macrófago e mediadores inflamatórios em modelo experimental de osteonecrose em camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico

Diego Feijão Abreu

Fortaleza
2019

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

Participação do macrófago e mediadores inflamatórios em modelo experimental de osteonecrose em camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração:
Estomatopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Fortaleza
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A145p Abreu, Diego Feijão.

Participação do macrófago e mediadores inflamatórios em modelo experimental de osteonecrose em camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico / Diego Feijão Abreu. – 2019.

57 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

1. Ácido zoledrônico. 2. Macrófagos. 3. Osteonecrose. I. Título.

CDD 617.6

Aos meus Pais, Aldemi (*in memoriam*) e Fani.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me proporcionar saúde, força, sabedoria e serenidade para atravessar todos os obstáculos que foram impostos durante esta caminhada.

Aos meus pais, **José Aldemi Abreu** (*In memoriam*) e **Fani Feijão Abreu** pelo esforço e dedicação para me proporcionar uma educação de qualidade e mostrar que o caminho dos estudos nos leva mais longe. Ao meu Pai, em especial, que costumava sempre ficar mais feliz que eu em minhas conquistas. Certamente estaria feliz hoje. Você deixou um exemplo de honestidade e, principalmente, de esperança. Sempre acreditar que dias melhores virão e nunca desistir. Muito obrigado por tudo.

A minha Orientadora **Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, um exemplo de amor a Odontologia. Agradeço por toda paciência e por todo conhecimento compartilhado durante esses anos. Uma professora de conhecimento infinito e uma profissional exemplar.

Ao Professor e Amigo **Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva**, por toda ajuda na construção desse trabalho. Um bate papo rápido que sempre traz algo positivo. Um profissional extremamente dedicado, outro exemplo de humildade e competência. Muito obrigado.

Aos meus irmãos **Daniel** e **Gabriela**, pelo convívio, companheirismo e exemplo que sempre foram e são para mim. Pela confiança de sempre e pela ajuda incondicional durante todos esses anos.

Ao meu cunhado **Valdson Alencar** (*in memoriam*) pelo seu apoio, incentivo e confiança e pelo exemplo que foi. Mostrando que através da dedicação aos estudos sempre conseguiremos nossos objetivos.

Aos meus Sobrinhos **Mariana, João, Júlia** e **Enzo** por alegrarem minha vida sempre.

A **Rebeca** por todo amor, companheirismo, ajuda e paciência durante esses 2 anos de mestrado e, principalmente, por sempre me incentivar em tudo.

A todos meus familiares e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação e permitiram que eu pudesse chegar até aqui.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia Bucodental, **João, Thamara, Dayrine, Elisa, Isabelly, Karine, Thinali, Thaís, Ealber, Gabriela, Pedro Henrique, Erasmo, Camila** e **Ernando** pelo convívio amistoso e pelo compartilhamento de conhecimento contínuo.

Todos vocês foram fundamentais nessa jornada e serei eternamente grato!
MUITO OBRIGADO!

Agradecimentos especiais ao **CNPq** por fomentar esta pesquisa e a evolução do conhecimento científico em nosso País.

“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que veja toda a
escada. Apenas dê o primeiro
passo”
(Martin Luther King Jr.)

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Metástases ósseas são consideradas como uma complicação frequente, associada a algumas neoplasias malignas. Os bisfosfonatos (BFs), fármacos com atividade antirreabsortiva, utilizados no tratamento das metástases ósseas, osteoporose e mieloma múltiplo, causam a osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB), principal efeito adverso. A patogênese da OMB é desconhecida, no entanto, o processo de desregulação inflamatória e os macrófagos parecem estar envolvidos diretamente. O presente trabalho tem como objetivo delinear mediadores relacionados à participação de macrófagos em mandíbulas de camundongos tratados com ácido zoledrônico (AZ). Camundongos swiss machos (n=6/grupo) foram divididos em 2 grupos submetidos à infusão com solução salina (0,1ml/kg) com ou sem exodontia e AZ (1mg/kg) com ou sem exodontia. Foram administradas três doses semanais de AZ ou salina (D0, D7, D14) pela via intraperitoneal. Após 28 dias foi realizada a exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito (D42), na semana subsequente (D49) foi administrada uma dose adicional de AZ ou salina e, um mês após a exodontia (D70), finalizando o protocolo. Os animais foram eutanasiados semanalmente e as mandíbulas, após removidas, foram seccionadas em lado direito (LD), para ensaio de n-acetil-β-D-glicosaminidase (n-AG) e lado esquerdo (LE), para avaliação microscópica (contagem de lacunas de osteócitos vazias/preenchidas, osteoclastos, infiltrado inflamatório, além da análise por imuno-histoquímica do fator ativador nuclear kappa B (NF-κB), TNF-α, ciclooxigenase 2 (COX-2), IL-1β e MCP-1. Os testes ANOVA/Bonferroni e t-*student* foram utilizados para análise estatística (p<0.05). Como resultado foi encontrado que o percentual de lacunas de osteócitos vazias foi significativamente mais alto no grupo tratado com AZ sem exodontia do dia 14 (14,01±1,73) até o dia 70 (9,01±3,97) (p<0,001). Já no grupo AZ após exodontia houve aumento em relação ao dia 0 (1,33±0,42) no dia 42 (12,33±0,76) permanecendo esses valores elevados até o dia 70 (11,33±2,95) (p<0,001). A contagem de osteoclastos foi significativamente mais alta no grupo tratado com AZ submetido a exodontia em relação aos demais grupos a partir do dia 49 até o dia 70 (p<0,001). O número total de células inflamatórias se mostrou significativamente mais alto no grupo AZ sem exodontia nos dias 63 e 70 quando comparado ao grupo salina sem exodontia nos mesmos dias (p<0,001). Já no grupo AZ submetido à exodontia o número de células inflamatórias se mostrou mais alto em relação aos demais grupos do dia 49 ao dia 70 (p<0,001). Com relação à dosagem de n-AG, a exodontia associada ao tratamento com AZ aumentou os níveis de n-acetil glicosaminidase (p<0,001). Em relação à quimiocina TNF-α, o tratamento com AZ aumentou sua imunexpressão independente de exodontia (p<0,001). Para IL-1β (p=0,005) o tratamento com AZ aumentou pontualmente sua imunexpressão. Conclui-se que, a exodontia associada ao tratamento com AZ aumenta a imunexpressão para COX-2 (p<0,001) e MCP-1 (p<0,001) no sítio cirúrgico e incrementa, ainda, a imunexpressão nuclear de NF-κB (p=0,003). Estes resultados sugerem, portanto, que uma desregulação imunológica com participação de macrófagos pode estar associada à patogênese da OMB.

Palavras-chave: Ácido zoledrônico, Macrófagos, Osteonecrose

ABSTRACT

Cancer is a public health problem, especially in developing countries. Bone metastases are considered as a frequent complication, associated with some malignancies. Bisphosphonates (BFs), drugs with antiresorptive activity, used in the treatment of bone metastases, osteoporosis and multiple myeloma cause bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw (OMB), the main adverse effect. The pathogenesis of OMB is unknown, however, the process of inflammatory dysregulation and macrophages seem to be directly involved. The present work aims to delineate mediators related to the participation of macrophages in jaws of mice treated with zoledronic acid (AZ). Male swiss mice ($n = 6$ / group) were divided into 2 groups submitted to infusion with saline solution (0.1ml / kg) with or without exodontia and AZ (1mg / kg) with or without exodontia. Three weekly doses of AZ or saline (D0, D7, D14) were given intraperitoneally. After 28 days, the left and right lower first molars were extracted (D42), an additional dose of AZ or saline was administered the following week (D49) and one month after the exodontia (D70), ending the protocol. The animals were euthanized weekly and the jaws, after removal, were sectioned on the right side (LD) for n-acetyl- β -D-glucosaminidase (n-AG) and left side (LE) assays for microscopic evaluation (counting (NF-kB), TNF- α , cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-1 β , and MCP- 1. ANOVA / Bonferroni and t-student tests were used for statistical analysis ($p < 0.05$). As a result, it was found that the percentage of empty osteocyte gaps was significantly higher in the group treated with day 14 (14.01 ± 1.73) day-old AZ than in day 70 (9.01 ± 3.97) ($p < 0.001$). In the AZ group after exodontia, there was an increase compared to day 0 (1.33 ± 0.42) on day 42 (12.33 ± 0.76), and these values remained high until day 70 (11.33 ± 2.95) ($p < 0.001$). The osteoclast count was significantly higher in the group treated with AZ submitted to the exodontia in relation to the other groups from day 49 to day 70 ($p < 0.001$). The total number of inflammatory cells was significantly higher in the AZ group without exodontia on days 63 and 70 when compared to the saline group without exodontia in the same days ($p < 0.001$). In the group AZ submitted to the exodontia the number of inflammatory cells was higher in relation to the other groups from day 49 to day 70 ($p < 0.001$). Regarding the dosage of n-AG, the exodontia associated with the treatment with AZ increased the levels of n-acetyl glucosaminidase ($p < 0.001$). Regarding the chemokine TNF- α , treatment with AZ increased its immunoexpression independent of exodontia ($p < 0.001$). For IL-1 β ($p = 0.005$) treatment with AZ increased its immunoexpression punctually. It is concluded that, the exodontia associated with AZ treatment increases the immunoexpression for COX-2 ($p < 0.001$) and MCP-1 ($p < 0.001$) at the surgical site and also increases the nuclear immunoexpression of NF-kB ($p = 0.003$). These results suggest, therefore, that immunological dysregulation involving macrophages may be associated with the pathogenesis of OMB.

Keywords: Zoledronic acid, Macrophages, Osteonecrosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura química dos bisfosfonatos

Figura 2 - Protocolo experimental para delineamento do curso temporal de infiltração de macrófagos em camundongos swiss tratados com AZ submetidos ou não à exodontia.

Figura 3 - Fluxograma do protocolo experimental e distribuição dos animais

Figura 4 - Percentual de lacunas de osteócitos vazias em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

Figura 5 - Percentual células Inflamatórias em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

Figura 6 - Contagem de osteoclastos em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

Figura 7 - Concentração de n-AG de osteoclastos em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior direito.

Figura 8 – Contagem de células imunopositivas para TNF- α em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

Figura 9 - Contagem de células imunopositivas IL-1 β em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

Figura 10- Contagem de células imunopositivas para COX-2 tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

Figura 11 - Contagem de células imunopositivas para MCP-1 em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

Figura 12 - Contagem de células imunopositivas para NF κ B em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos Primários

Lista de ABREVIATURAS e SIGLAS

ANOVA- Do inglês *Analysis of variance* (análise de variância)

AZ – Ácido Zoledrônico

BFs - Bisfosfonatos

BRONJ- Do inglês *Macrophages and bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw*

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

COX – 2 – Ciclooxigenase 2

DAB – 3,3'-Diamino-benzidina

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM – Erro média-padrão

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL- 6 – Interleucina 6

IL- 8 – Interleucina 8

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MCP-1 -Do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein* – 1

MPO- Mieloperoxidase

MRONJ – Osteonecrose relacionada a Medicamentos

n-AG – n-acetil- β -D-glicosaminidase

NF- κ B - Fator ativador Nuclear kappa B

NPDM- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

OMB- Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos

PBS – do inglês *Phosphate buffered saline* (solução tampão de fosfato)

TMA – do inglês *Tissue Microarray*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFC - Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Bisfosfonatos	16
1.2. Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos.....	18
1.3. Patogênese da OMB.....	19
1.4. Desregulação da resposta imunológica associada ao ácido zoledrônico, macrófagos e OMB.....	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	25
4.1. Animais	25
4.2. Protocolo experimental	26
4.3. Parâmetros de análise	29
4.4. Delineamento estatístico	32
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	44
8. REFERÊNCIAS	45
9. ANEXOS	
Anexo A: Comprovante de aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais.....	59

1.INTRODUÇÃO

As metástases ósseas são consideradas como uma complicação frequente, associada a algumas neoplasias malignas, devido a interações entre as células tumorais e o microambiente ósseo, favorecendo a implantação e o crescimento tumoral (KAN et al., 2016).

Embora as opções de tratamento e os resultados de sobrevida tenham melhorado significativamente para a maioria dos tumores malignos (De Santis et al., 2014), as metástases ósseas geralmente estão associadas à morbidade (GUO et al., 2018; MENTON et al., 2005) e mortalidade significativas (CETIN et al., 2015; SAAD et al., 2007). Aproximadamente 65-75% dos pacientes com câncer de mama e próstata e 15-40% dos pacientes com câncer colorretal e pulmão apresentam evidência de metástase óssea (AAPPRO et al., 2010; MACHADO et al., 2009).

As metástases ósseas apresentam diferentes apresentações clínicas. Sendo o sintoma mais prevalente a dor, presente em aproximadamente 75% dos casos (CHOUDHURY et al., 2011). A dor intensa, provavelmente decorrente do processo de osteólise, é considerada um sintoma grave e de difícil controle (MUNDY, 2002). Complicações associadas às metástases ósseas estão presentes entre 46-65% dos pacientes. Sendo as complicações mais recorrentes, as fraturas ósseas patológicas, compressões da medula espinhal, necessidade de radioterapia e tratamento cirúrgico (AAPPRO et al., 2010; MACHADO et al., 2009).

Essas complicações podem diminuir significativamente a qualidade de vida dos pacientes, resultando em transtornos físicos e emocionais (AAPPRO et al., 2010; MACHADO et al., 2009). Atualmente, duas classes de drogas são usadas para o tratamento das metástases ósseas: os bisfosfonatos e os anticorpos monoclonais (MATUOKA, 2018).

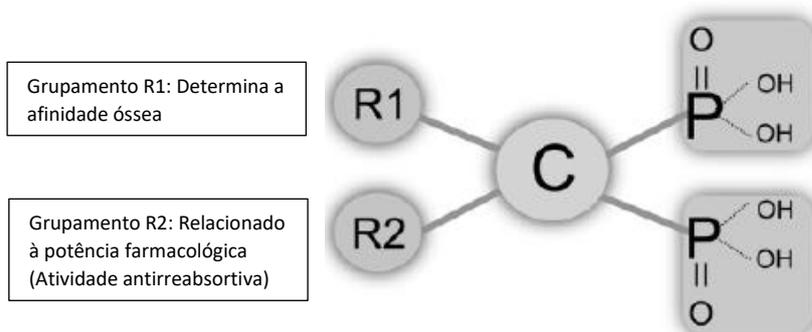
Entretanto, a partir de 2003, foram publicados diversos relatos casos de pacientes apresentando graus variados de exposição óssea nos ossos maxilares (MARX, 2003). Desde então, inúmeros estudos, entre revisões sistemáticas da literatura, relatos de casos e estudos em animais vêm sendo publicados abordando osteonecrose dos maxilares associados ao uso de bisfosfonatos (NICOLAU-GALITIS et al., 2019; MENDES et al., 2019; KARNA et al., 2018; CARIOLATTO et al., 2018; POLI et al., 2018).

1.1. BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos (BFs) são fármacos que apresentam atividade antirreabsortiva amplamente utilizados no tratamento das metástases ósseas de diversas neoplasias, assim como da osteoporose, osteogênese imperfeita, doença do osso de Paget e mieloma múltiplo (ENDO et al., 2017; WOO et al., 2006).

Constituídos por uma estrutura semelhante ao pirofosfato endógeno, os BFs foram constituídos com base nessa molécula por sua similaridade e forte interação com a estrutura óssea. Diferentemente do pirofosfato, no entanto, os BFs contêm dois grupos fosfonatos ligados um a um ao átomo de carbono central (estrutura P-C-P), não oxigênio, o que lhes confere alta resistência à degradação enzimática e maior tempo de meia vida (ROGERS et al., 2000; RUSSELL, CROUCHER, ROGERS, 2007).

Diversos grupos químicos podem ser acrescentados à estrutura por meio de duas ligações covalentes adicionais ao átomo de carbono central, dando origem a uma enorme gama de possíveis estruturas aos BFs (ROGERS et al., 2000) e conferindo diferentes propriedades a esses fármacos. O grupo R1 determina a afinidade dos BFs pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência e atividade farmacológica (FLEISCH, 1998).



Adaptado de Pazianas, 2010

Figura 1: Representação da estrutura química dos bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são classificados a partir de sua estrutura química em aminobisfosfonatos – fármacos que contêm grupamento amina em sua

composição e os não-aminobisfosfonatos – fármacos que não apresentam o grupamento amina em sua composição (FLEISCH, 1998; RUSSELL et al., 1999).

Podem ser classificados ainda em BFs de primeira geração: etidronato, clodronato e tiludronato; Segunda geração: alendronato, pamidronato, risendronato e ibandronato. O ácido zoledrônico é classificado como fármaco da terceira geração dos bisfosfonatos (PAZ et al., 2014).

Pertencente à classe dos Bisfosfonatos de terceira geração, o ácido zoledrônico (AZ), é um derivado imidazólico heterocíclico e classificado como aminobisfosfonato. Trata-se do bisfosfonato mais potente sendo utilizado, principalmente, no tratamento de metástase óssea e osteoporose avançada. A administração é feita por via endovenosa, com uma infusão de 4 mg do fármaco por cerca de 15 minutos. Ao final da administração, tem rápida elevação da sua concentração plasmática, seguido de um declínio, apresentando, após 24 h, concentração plasmática de 1%. Cerca de 56% do AZ liga-se a proteínas plasmáticas e o mesmo praticamente não é acumulado no organismo, com uma única exceção: o sistema esquelético (RUSSEL et al., 1999; FERNANDES, LEITE, LANÇAS, 2005; LYSENG-WILLIAMSON, 2008).

O mecanismo de ação do AZ envolve a formação de um análogo da adenosina trifosfato osteoclástica, que induz a apoptose e a inibição da via do mevalonato na síntese de colesterol por inativação da farnesil difosfato sintase, com consequente desregulação do transporte intracelular, desorganização citoesquelética e inibição da proliferação osteoclástica, além de inibir o recrutamento de osteoclastos e induzir a produção pelos osteoblastos de um fator de inibição de osteoclastos (WOO et al., 2006). Além de possuir o mecanismo de ação inerente aos aminobisfosfonatos, o AZ destaca-se por sua ação antitumoral (CLÉZARDIN, 2005) e possui excelentes resultados na redução e atraso da morbidade esquelética e as complicações decorrentes da doença óssea metastática, sendo, por conseguinte, utilizado por mais de 15 anos para melhorar os resultados de pacientes com metástases ósseas de tumores sólidos (AAPRO et al., 2008).

Apesar de sua boa atividade antirreabsortiva e antitumoral, o AZ, assim como outros bisfosfonatos, está associado a diversos efeitos adversos vinculados a eventos pró-inflamatórios, destacando-se a Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB).

1.2. OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS (OMB)

A osteonecrose dos maxilares associada ao tratamento com bisfosfonatos foi primeiramente descrita em 2003. (MARX et al., 2003; MIGLIORATI et al., 2003; RUGGIERO et al., 2004; SIGUA-RODRIGUEZ et al., 2014)

Em 2014, Ruggiero et al., sugeriram a ampliação do termo Osteonecrose induzida por bisfosfonatos para Osteonecrose relacionada a medicamentos (MRONJ), em decorrência do crescimento do número de casos de necrose óssea de maxila e mandíbula, associados a terapia com fármacos antirreabsortivos, como o denosumab e outros fármacos antiangiogênicos. Neste trabalho serão abordados os efeitos da osteonecrose associada ao uso dos bisfosfonatos, será adotado o termo osteonecrose induzida por bisfosfonatos (OMB).

A OMB é definida como: exposição óssea em região maxilofacial, podendo estar associada a fístula intraoral ou extraoral persistente por mais de 8 semanas, em pacientes que fizeram ou fazem uso de BFs sistemicamente e sem histórico de radioterapia de cabeça e pescoço nem doença metastática associada aos maxilares (RUGGIERO et al., 2014). A mandíbula é mais afetada que a maxila, sendo acometida em aproximadamente 2/3 dos casos (RISTOW et al., 2014). Os sintomas são variáveis, podendo apresentar-se desde uma exposição óssea assintomática ou estar associada a dor, supuração, fístula, inflamação da mucosa oral e trismo (ALLEN et al., 2014). A OMB é considerada uma complicação grave e de difícil tratamento (ABUGHAZALEH & KAWAR, 2011).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da OMB estão diretamente relacionados ao tipo de BF utilizado, via de administração do fármaco e, ainda, ao tempo de uso. Concomitantemente ao uso dos BFs, os procedimentos cirúrgicos orais, entre eles a exodontia, periodontite, trauma e presença de infecção bucal aumentam sobremaneira o risco de desenvolvimento da OMB (ZHANG et al., 2015).

Ainda não há consenso na literatura sobre qual a modalidade de tratamento mais efetiva, variando desde abordagens conservadoras como a utilização de agentes antimicrobianos (RUGGIERO et al., 2014), oxigenoterapia hiperbárica, laserterapia, debridamentos superficiais até abordagens mais radicais, como ressecções ósseas em bloco (CEPONIS et al., 2017; WEBER et al., 2016; RUGGIERO et al., 2014).

Algumas características desta condição já foram descobertas e elucidadas, entretanto sua patogênese ainda é incerta (ALLEN & BURR, 2009) Dessa forma, o estudo e elucidação da patogênese da OMB representa grande relevância tanto para o estabelecimento de medidas preventivas quanto para o estabelecimento de tratamentos efetivos.

1.3. PATOGÊNESE DA OMB

Embora o primeiro caso de OMB tenha sido relatado há uma década, a fisiopatologia da doença ainda não foi elucidada (MARX, 2003; RUGGIERO et al., 2014). Entre as hipóteses levantadas na literatura para o envolvimento exclusivo dos maxilares, destacam-se: alterações no metabolismo ósseo – remodelação e supressão da reabsorção, inibição da angiogênese, microtrauma constante, supressão da imunidade inata ou adquirida, deficiência de vitamina D, toxicidade dos bisfosfonatos em tecidos moles, infecção e inflamação (BARROS-SILVA, et al., 2017; REID et al., 2007; BAMIAS et al., 2005; BI et al.,

2010; HOKUGO et al., 2010., MORTENSEN et al., 2007; SONIS et al., 2009; MEHOTRA & RUGGIERO, 2006; RUGGIERO et al., 2006).

Os principais mecanismos estudados da OMB envolvem efeitos inibitórios dos BFs no “*turnover*” ósseo e angiogênese. Embora estes mecanismos não expliquem adequadamente a patogênese da OMB (Allen & Burr, 2009).

Alguns estudos apontam a relação da osteonecrose dos maxilares e infecção (HINSON et al., 2014; AGHALOO et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2010). Lopes-Jornet et al. (2011) não observaram relação entre OMB e infecção, entretanto observaram a presença, em animais, de processo infeccioso estabelecido e de um intenso infiltrado inflamatório em áreas de exodontias, relacionando-se ao desenvolvimento da OMB.

Gilbert et al. 2000; Cheung et al. 2011, destacam a relação da inflamação aguda e apoptose de osteócitos, inibindo a vitalidade e atividade dos osteoblastos.

Barros-Silva et al. (2015) estabeleceram um modelo experimental de OMB que mimetiza a condição em seres humanos, bem como uma série de eventos idiopáticos pós-infusão de AZ. Esse modelo experimental utiliza um protocolo crônico de 70 dias de duração. Em 2016, estes autores e, observaram o desenvolvimento da OMB relacionada ao aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , iNOS e IL1- β , que são mediadores pró-apoptóticos para osteócitos.

Além disso, em estudos posteriores, essa equipe observou que mesmo após 70 dias da primeira de quatro infusões venosas semanais de AZ, o periodonto clinicamente normal sem exodontia de animais tratados cronicamente com a dose de 0,20 mg/kg de AZ apresentava aumento de vasos dilatados/ectásicos, células inflamatórias mononucleares CD68+ e neutrófilos, independente do aumento do número de mastócitos (BARROS-SILVA et al., 2017).

Outros estudos em modelos experimentais (SONIS et al., 2009; ALI-ERDEM et al., 2011; Lopes-Jornet et al., 2011; MAAHS et al., 2011) e estudos clínicos (LESCLOUS et al., 2009) demonstraram associação entre inflamação e OMB. Os bisfosfonatos aumentam a produção de mediadores da inflamação aguda *in vitro* (MURATSU et al., 2013) e *in vivo* (NORTON et al., 2012), modificando o perfil imunológico e celular em paciente submetido a tratamento crônico com BFs.

1.4. DESREGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA ASSOCIADA AO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO, MACRÓFAGOS E OMB

O AZ apresenta uma atividade tóxica direta em muitos grupos celulares, como células epiteliais, fibroblastos (SILVERMAN e LANDESBURG, 2009; SCHEPER et al., 2009), osteoblastos (NAIDU et al., 2008), macrófagos (SCHELLER et al., 2011), neutrófilos (KUIPER et al., 2012), células endoteliais (MISSO et al., 2012), além de interferir na maturação de células de linhagem mieloide (WOLF et al., 2006). Assim como outros BFs, dentre eles o alendronato de sódio (HIRAGA et al., 2010), o AZ possui efeitos de teratogenicidade em dentes, altera a erupção de molares e a formação da matriz dental, estimula a reabsorção odontoclástica e induz a formação de dentículos e de odontomas (MASSA et al., 2006).

Estudos envolvendo modelos experimentais (SONIS et al., 2009; ALI-ERDEM et al., 2011; LÓPEZ-JORNET et al., 2011; MAAHS et al., 2011; MARINO et al., 2012) e estudos clínicos (LESCLOUS et al., 2009) têm demonstrado uma relação entre o uso de bisfosfonatos e eventos pró-inflamatórios.

Ligam-se irreversivelmente à hidroxiapatita do tecido ósseo (ENDELE et al., 2005) e sua constante presença nos ossos gnáticos pode ser importante na modificação do perfil inflamatório local. Além disso, permanece obscuro como se dá o início da desregulação imunológica e qual o comportamento desta desregulação ao longo do tempo.

Em estudos *in vivo*, o AZ aumenta de forma dose dependente a quantidade de leucócitos circulantes e induz anemia quando administrado cronicamente (BARROS-SILVA et al., 2015). Em cavidade peritoneal de ratos, NORTON et al., (2012) observaram que a infusão de bisfosfonatos aminados, inclusive o AZ, aumenta o número de neutrófilos e monócitos por uma via dependente de Interleucina 1 (IL-1).

Até mesmo em estudos clínicos observou-se aumento de marcadores pró-inflamatórios como a IL-1 β em saliva (BAGAN et al., 2013) e fluido gengival (TSAO et al., 2013) de pacientes sob tratamento crônico com AZ, além de modificação do perfil celular sanguíneo com aumento de células inflamatórias e citocinas circulantes (ROSSINI et al., 2012; WELTON et al., 2013).

Sabe-se que quando elementos celulares são estimulados, há aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios (YU et al., 2011). O AZ é uma molécula muito tóxica a diversos grupos celulares e a indução de citocinas em decorrência de sua toxicidade são importantes na migração e ativação de neutrófilos e macrófagos (GRAVES e JIANG, 1995). Neutrófilos possuem uma sobrevivência encurtada na presença de AZ (KUIPER et al., 2011), o que pode induzir dano tecidual e incrementar o potencial de fagocitose e destruição de macrófagos.

O papel dos macrófagos no desenvolvimento da OMB vem sendo objeto de muitos estudos. Os macrófagos são células presentes no final do processo de inflamação aguda e presentes durante a inflamação crônica, sendo fundamentais para o processo de reparação tecidual (MONTOVANI et al, 2013). Os macrófagos são essenciais ainda na regulação e expressão da imunidade inata e nas respostas imunes adaptativas, desempenhando, portanto, um papel central na inflamação e na defesa do hospedeiro (GORDON & MARTINEZ, 2010).

Além disso, os macrófagos desempenham funções homeostáticas, além de defesa, participando diretamente do processo de remodelação tecidual e regulação do metabolismo (GORDON & MARTINEZ, 2010).

A associação entre desregulação imunológica relacionada aos bisfosfonatos e a função dos macrófagos é discutida como um fator potencial no desenvolvimento da OMB (HOEFERT et al., 2015). A polarização dos macrófagos em M1 ou M2 é o mecanismo responsável pela definição se sua atividade de homeostase será dirigida para a inflamação destrutiva dos tecidos (M1) ou para o processo de reparação e cicatrização das feridas (M2) (ALLAVENA & MANTOVANI, 2012; CAO et al., 2011; HAO et al., 2012; HIRATA et al., 2011., KURAHARA et al., 2011; LAN et al., 2012; MANTOVANI et al., 2013; WEBER et al., 2014).

Em estudos *in vitro* com culturas de macrófagos, tem sido observado que a incubação com diferentes concentrações de AZ é capaz de ativar a Óxido-nítrico sintase induzida (INOS) de forma dose dependente. A ativação ocorre por uma via dependente do Fator Nuclear kappa B (NF-κB) e da consequente expressão de IL-1β, TNF-α e IL-6 (MURATSU et al., 2013). Até mesmo clinicamente há evidências de que o AZ é um forte indutor de alterações do sistema imune com consequente desregulação inflamatória.

Wehrhan e colaboradores (2017) relataram um aumento significativo do número de macrófagos na OMB, além do aumento da polarização M1 em relação a polarização M2 no osso afetado. A polarização e a predominância do fenótipo M1 destrutivo do tecido pode levar a deterioração da homeostase óssea e contribuir, portanto, para o desenvolvimento de OMB. Ressaltam, ainda, que o aumento da polarização M1 revela uma ação dupla dos BFs. Se por um lado o aumento de macrófagos M1 é responsável pelos efeitos antitumorais dos BFs, por outro lado, a redução dos macrófagos M2 regenerativos com predominância dos macrófagos M1 destrutivos levaria a um desequilíbrio da homeostase óssea e contribuiria para o desenvolvimento da OMB.

Buscar respostas na tentativa de elucidar a patogênese da OMB assume grande importância, tendo em vista as dificuldades encontradas no tratamento desta condição. Adotando-se o processo de desregulação inflamatória associada ao uso crônico dos BFs, estabelecer temporalmente como se comportam os macrófagos assume um papel importante para

elucidação da patogênese da OMB. A verificação deste comportamento, assim como dos mediadores envolvidos neste processo permitirá, em estudos futuros, o estabelecimento de possíveis bloqueios farmacológicos para identificação dessas vias.

2. JUSTIFICATIVA

Os bisfosfonatos são fármacos antirreabsortivos amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças, entre elas, o mieloma múltiplo, doença do osso de Paget, osteoporose, osteopenia, osteogênese imperfeita e metástases ósseas decorrentes de neoplasias de mama, próstata e pulmão, apresentando efeito positivo significativo na qualidade de vida dos pacientes acometidos por doenças ósseas.

Entretanto, efeitos adversos estão associados ao seu uso. Dentre eles, destaca-se a osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos. A OMB é uma condição associada ao uso dos bisfosfonatos administrados tanto por via oral quanto por via endovenosa. É considerada uma condição grave e de difícil tratamento, afetando diretamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos podendo acarretar, em casos mais severos, a suspensão do tratamento antineoplásico, em pacientes portadores de mieloma múltiplo ou metástases ósseas.

A patogênese da OMB ainda é desconhecida. Sabe-se que está associada a eventos pro-inflamatórios em decorrência do uso dos BFs, portanto, conhecer e elucidar os mecanismos envolvidos na OMB assumem grande importância, para a busca de estratégias farmacológicas e adjuvantes na prevenção/tratamento dos eventos pró-inflamatórios relacionados aos bisfosfonatos, em especial o AZ, e talvez até orientar formas de evitar ou atenuar esse complexo efeito adverso.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

3.1.1. Avaliar a participação de macrófagos e os mediadores associados em modelo experimental de osteonecrose em camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Realizar um curso temporal de migração de macrófagos induzido por AZ em mandíbulas de camundongos swiss com e sem exodontias.

3.2.2. Analisar o perfil histomorfométrico relacionado a osteonecrose induzida por AZ em mandíbulas de camundongos swiss.

3.2.3. Estudar os mediadores envolvidos na migração de macrófagos induzidos por AZ em mandíbulas de camundongos swiss.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

O projeto foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFC, sendo aprovado sob o protocolo de 139/17. Para a realização desta pesquisa foram utilizados 192 camundongos swiss machos (ENDELE et al., 2005), pesando entre 25 e 30 gramas, procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC, e transferidos para o Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos-NPDM, em gaiolas apropriadas de polipropileno medindo 49x34x16cm, em número de 06 animais por caixa, e numerados individualmente através de marcação da cauda com tinta, de 1 a 6, refeitas quando necessário. Os animais receberam ração comercial balanceada própria e água *ad libitum*, foram mantidos em ciclos de luz-escuro de 12 horas e

permaneceram nas mesmas condições ambientais durante todo o experimento. O peso dos animais foi avaliado semanalmente até a eutanásia.

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1. DESENHO DO CURSO TEMPORAL DO MODELO EXPERIMENTAL

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo experimental, baseado no estudo de BARROS-SILVA et al. (2015) que através de desenho de curva dose resposta observou que a dose clínica para seres humanos transposta para animais, de 3 mg/kg de AZ, dividida em três infusões de 1 mg/kg é capaz de induzir OMB em modelo murino. Utilizando o protocolo de BARROS-SILVA et al., (2015) os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

- **Grupo 01:** animais tratados com solução salina (0,1ml/kg).
- **Grupo 02:** animais tratados com AZ (1 mg/kg).

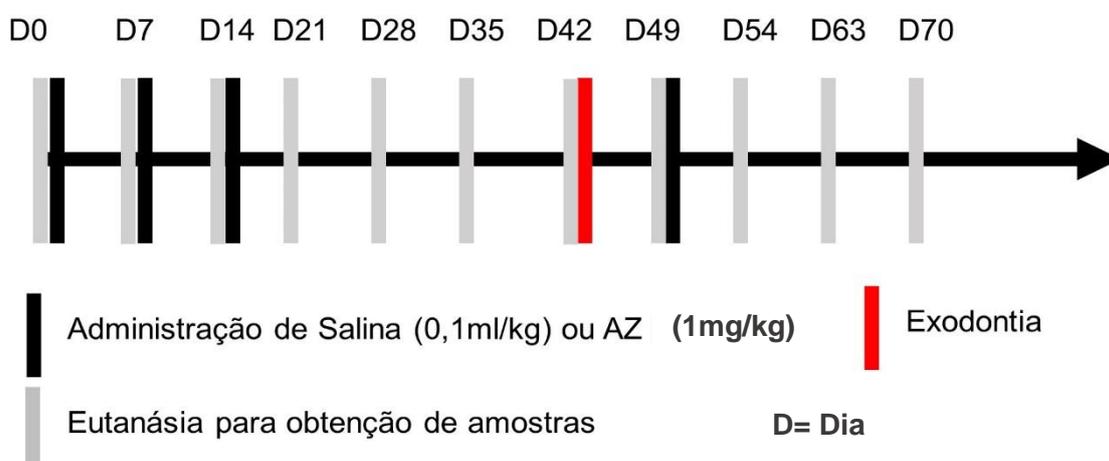


Figura 2: Protocolo experimental para delineamento do curso temporal de infiltração de macrófagos em camundongos swiss tratados com AZ submetidos ou não a exodontia.

Os animais receberam administração de três doses semanais consecutivas de AZ ou salina (D0, D7, D14) por meio da via intraperitoneal. Para realização das administrações, os mesmos foram imobilizados por método

manual (imobilização dorso-cervical). Posteriormente foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e do direito (D42). Na semana seguinte à exodontia (D49) foi administrada uma dose adicional de AZ ou salina e um mês após a exodontia (D70) o protocolo entrou em desfecho.

Para a exodontia, os animais foram anestesiados com quetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal e a sindesmotomia do 1º molar inferior esquerdo e direito foi realizada com auxílio de sonda exploradora, a luxação com uso de espátula Hollemback 3S e a extração com espátula Lecron-Zalle em movimento de alavanca (BARROS-SILVA et al., 2015). Após este procedimento os animais foram mantidos em ambientes aquecidos para controle de hipotermia pós-anestesia e em observação dentro de caixas individuais. Todos os procedimentos foram realizados cegamente por um mesmo operador previamente treinado e os animais foram aleatorizados e pesados previamente.

A eutanásia foi realizada semanalmente em cada dia de avaliação, através de imobilização manual (dorso-cervical) e sobredosagem anestésica com quetamina (300mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg).

Cada um dos grupos experimentais (1 e 2) foram divididos em subgrupos (n=6 animais/subgrupo). Essa divisão se faz necessária por conta do procedimento de exodontia, ao qual alguns animais não foram submetidos (dia 0 ao dia 35) e outros que foram submetidos (do dia 42 ao dia 70).

Cada subgrupo foi eutanasiado semanalmente, da seguinte forma: imediatamente antes da infusão da primeira dose de AZ (baseline, D0) e a partir de então semanalmente em D7 (imediatamente antes da infusão da segunda dose de AZ), D14 (imediatamente antes da infusão da terceira dose de AZ), D21, D28, D35, D42 (imediatamente antes da exodontia), D49 (imediatamente antes da quarta infusão de AZ), D56, D63 e D70.

É importante ressaltar que os Grupos 1 e 2, até o dia 35, não passaram pelo procedimento de exodontia. Portanto, estes grupos tinham apenas 1 subgrupo cada (n=6/subgrupo).

Entretanto, a partir do dia 42, os Grupos 1 e 2 passaram pelo procedimento de exodontia. Portanto, estes grupos foram acompanhados até o D70, subdivididos em duas formas. Grupo salina sem exodontia e com exodontia e grupo AZ sem exodontia e com exodontia. Cada subgrupo composto por 6 animais. Para que fossem feitos estes dois subgrupos, o número de animais foi dobrado.

Portanto, foram necessários, ao final dos experimentos, a utilização de 192 animais, distribuídos segundo a figura abaixo.

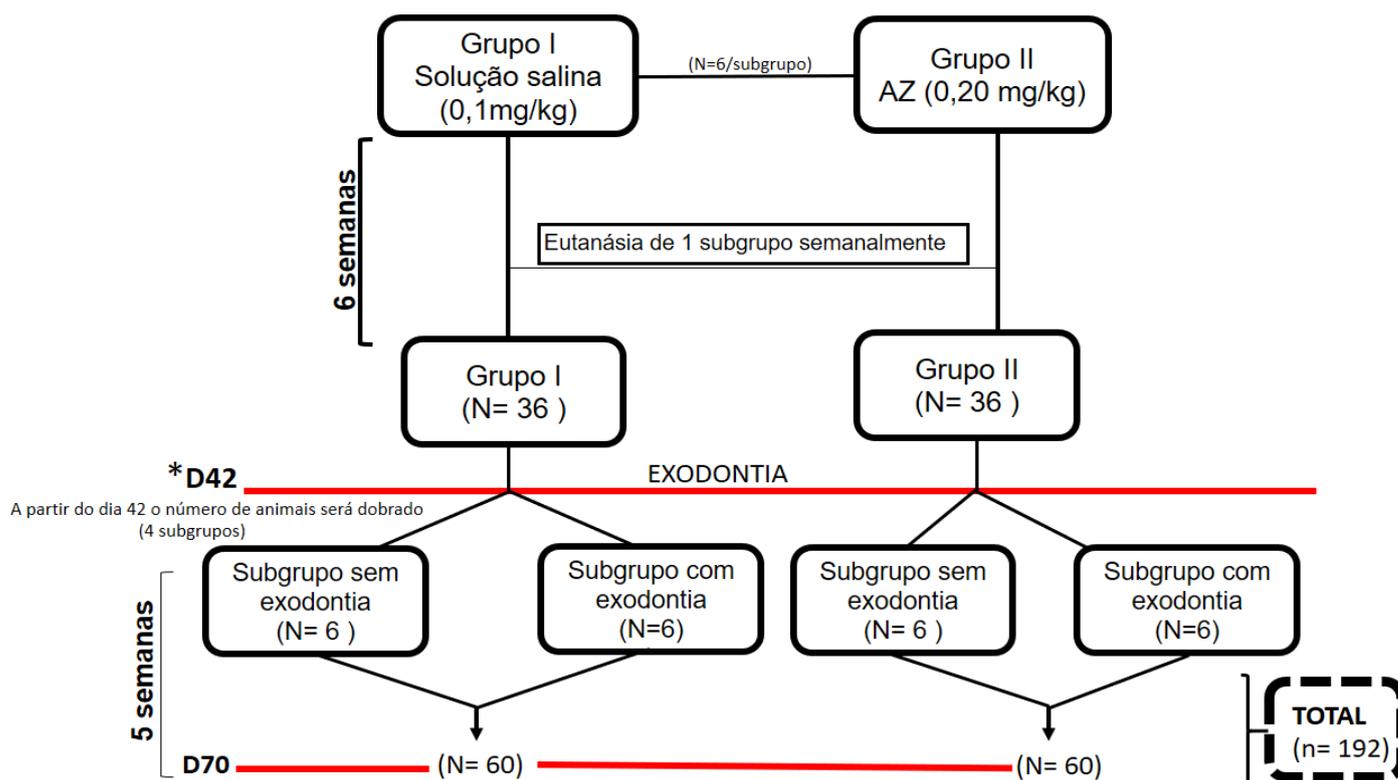


Figura 3. Fluxograma do protocolo experimental e distribuição dos animais

Imediatamente após a eutanásia, as mandíbulas dos animais foram excisadas cirurgicamente, a hemimandíbula esquerda fixada em formol

tamponado 10% e a hemimandíbula direita congelada em nitrogênio líquido para armazenamento em freezer -80 °C.

Após a remoção das amostras, os animais eutanasiados foram armazenados em freezer comum e posteriormente foram recolhidos pelo serviço especializado para incineração.

4.3. PARÂMETROS DE ANÁLISE

4.3.1. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO, CONFECÇÃO DE LÂMINAS E ANÁLISE MICROSCÓPICA

Após período de fixação (24 a 48 horas) as hemimandíbulas esquerdas foram descalcificadas (suspensão) em solução 10% EDTA (pH 7.3) durante 30 dias para processamento e confecção de lâminas histológicas.

Após desparafinização, 4 a 5 cortes de 3µm foram reidratados para coloração por hematoxilina-eosina. O ligamento periodontal, osso alveolar e a gengiva de recobrimento foram analisadas através de microscopia de luz com aumento de 400x. Foram realizadas fotografias de 3 campos “*hotspot*” por lâmina e realizado contagem de células utilizando o *software ImageJ*, NIH, versão 1.60.

Para estabelecer o perfil histomorfométrico, realizou-se a contagem de lacunas de osteócitos vazias, lacunas com osteócitos presentes, número de osteoclastos e o número de células inflamatórias. O somatório dos campos de cada lâmina foi considerado como unidade amostral e utilizados os percentuais de lacunas de osteócitos vazias, o número de osteoclastos e células inflamatórias para avaliação quantitativa (SHAKER et al., 2013).

4.3.2. ENSAIO DE N-ACETIL-B-D-GLICOSAMINIDASE (N-AG)

Para avaliar a quantificação de macrófagos, a hemimandíbula direita com e sem exodontia foi utilizada para ensaio de n-AG. Às amostras foram acrescidos 200µL de solução tampão de citrato 100 mM, 0.02% (m/v), albumina (pH 4.25, 1M NaOH, 25°C) para maceração. Após a homogeneização a enzima

n-AG foi adicionada a uma solução contendo p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida (Beta NAG[®]) dissolvido em solução tampão citrato de sódio 0,2 mol/l (pH 4,4). A mistura resultante foi incubada a 37°C por 15 minutos para a hidrólise enzimática do substrato com liberação do íon p-nitrofenilato. A ação enzimática foi interrompida com a adição de solução tampão de Kolthoff 0,5 mol/l (pH 10,25). As placas foram lidas em leitor de ELISA (405nm) e alterações de absorbância foram plotadas em uma curva padrão de macrófagos e expressos em pNP/mg, conforme recomendação do fabricante (Abcam, USA, 2018).

4.3.3. PROCESSAMENTO E ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os dias de pico de macrófagos foram escolhidos (D7, D28, D42, D56 e D70) para realização de imuno-histoquímica através da técnica da estreptavidina-biotinilada (adaptado de HSU et al., 1981) para os marcadores inflamatórios possivelmente envolvidos na sua migração.

Para a realização da imuno-histoquímica as lâminas foram confeccionadas através da técnica de microarranjo tecidual - *Tissue Microarray* (TMA) (KONONEN et al., 1998). As áreas marcadas foram identificadas nos blocos doadores, dos quais foram obtidos cilindros de 2mm de diâmetro e transferidos para o bloco receptor (TMA). Para a confecção do bloco de TMA foi utilizado o equipamento *Tissue MicroArray builder 20010.2, Histopathology Ltd, Hungary*.

Após desparafinização e reidratação foi realizada recuperação antigênica por calor com solução de citrato 0,1 M, a 97°C durante 20 minutos, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%, lavagem com solução tampão de fosfato (PBS) e incubação com os anticorpos primários.

Após incubação com o anticorpo primário (Quadro 1) pelos tempos determinados, as lâminas foram lavadas (PBS) e incubadas com polímero Histofine[®] (anticorpo secundário acoplado a complexo estreptavidina-biotina-peroxidase) por 30 minutos e, após lavagem, a revelação foi realizada com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) (Dako[®]) em tempos previamente estipulados. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris (10'') e a montagem

das lâminas com Enthellan®. O controle negativo das reações foi realizado através da omissão do anticorpo primário.

Quadro 1. Anticorpos Primários

ANTICORPO	CLONE	DILUIÇÃO	FABRICANTE	CONTROLE POSITIVO
ANTI-IL-1 β	POLICLONAL	1:150	ABCAM, MA, USA	GRANULOMA PIOGÊNICO
ANTI-NF-KB	POLICLONAL	1:100	ABCAM, MA, USA	GRANULOMA APICAL OU CISTO RADICULAR
ANTI-COX-2	MONOCLONAL	1:200	ABCAM, MA, USA	GRANULOMA APICAL OU CISTO RADICULAR
ANTI-TNF- α	MONOCLONAL	1:200	ABCAM MA, USA	GRANULOMA APICAL OU CISTO RADICULAR
ANTI- MCP-1	MONOCLONAL	1:200	ABCAM MA, USA	GRANULOMA APICAL OU CISTO RADICULAR

Para análise imuno-histoquímica, a expressão de cada marcador no periodonto do primeiro molar inferior esquerdo foi analisada através de microscopia de luz. Foram realizadas fotografias de 3 campos “hotspot” por lâmina e realizado contagem de células utilizando o *software ImageJ*, NIH, versão 1.60.

Um aumento de 400x foi utilizado para contagem de imunocoloração de células exibindo positividade citoplasmática para TNF- α , IL-1 β , COX-2, MCP-1 e positividade nuclear para NF-kB. (Kim et al, 2012).

4.4. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

4.4.1. CÁLCULO AMOSTRAL

Baseado na atividade de Mieloperoxidase (MPO) na gengiva de animais tratados (5691.0 ± 3443.0) ou não (8.1 ± 10.7) com AZ observado pelo nosso grupo de estudos (BARROS-SILVA et al., 2015), estima-se necessário avaliar um total de 05 (cinco) animais por grupo, a fim de obter uma amostra que apresente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese nula deste trabalho (teste t de Student). Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra acrescentou-se 20% (um animal) em cada grupo, totalizando 06 (seis) animais por grupo de estudo.

4.4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, expressos em forma de média e erro-padrão e comparados utilizando os testes t de Student, ANOVA-1-way ou ANOVA-2-way seguidos do pós-teste de Bonferroni.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prism® 7.0 e o índice de significância $p < 0.05$ será adotado em todas as avaliações.

5. Resultados

5.1 Perfil histomorfométrico do desenvolvimento da OMB em modelo experimental com camundongos swiss tratados com AZ

O percentual de lacunas de osteócitos vazias foi significativamente mais alto no grupo tratado com AZ sem exodontia em relação ao grupo salina sem exodontia do dia 14 ($14,01 \pm 1,73$ versus $0,00 \pm 0,00$) até o dia 70 ($9,01 \pm 3,97$ versus $0,44 \pm 0,28$) ($p < 0,001$). No grupo tratado com AZ após exodontia o percentual de lacunas de osteócitos vazias foi significativamente mais alto que os demais grupos do dia 49 ao dia 70 ($p < 0,001$). Foi observado que no grupo tratado com solução salina submetido à exodontia houve um discreto aumento no percentual de lacunas de osteócitos vazias no dia 49 ($5,45 \pm 3,15$) ($p = 0,008$). No grupo tratado com AZ submetido a exodontia houve aumento significativo no dia 49 ($48,21 \pm 2,95$) permanecendo esses valores significativamente elevados até o dia 70 ($49,94 \pm 16,20$) ($p < 0,001$).

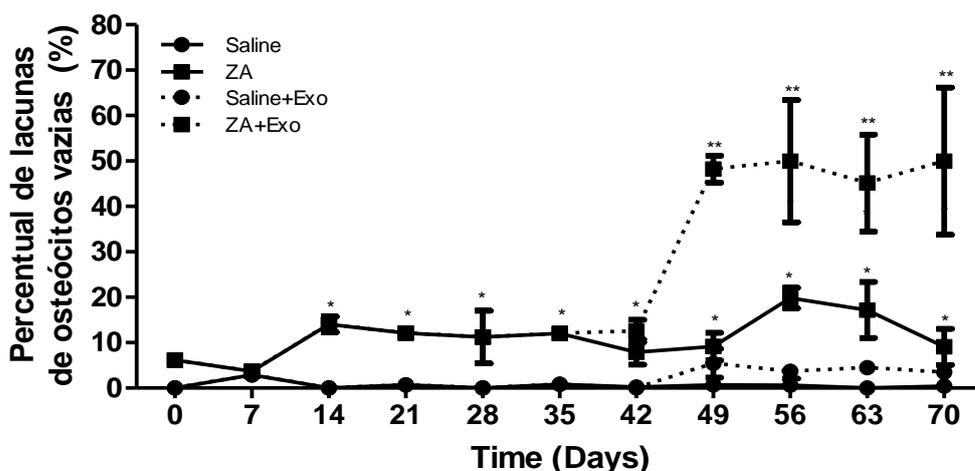


Figura 4: Percentual de lacunas de osteócitos vazias em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. * $p < 0,05$ versus salina sem exodontia; ** $p < 0,05$ versus grupos salina (sem exodontia e com exodontia); média \pm EPM, Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

O número total de células inflamatórias se mostrou significativamente mais alto no grupo AZ sem exodontia nos dias 63 e 70 que no grupo salina sem exodontia nos mesmos dias ($p < 0,001$). Já no grupo AZ submetido à exodontia o número de células inflamatórias se mostrou significativamente mais alto em

relação aos demais grupos do dia 49 ao dia 70 ($p < 0,001$). No grupo salina após exodontia houve aumento no dia 49 ($11,00 \pm 5,20$) retornando aos níveis basais já no dia 56 ($2,50 \pm 1,44$) ($p = 0,001$). Já no grupo AZ após exodontia houve aumento no dia 42 ($12,33 \pm 0,76$) permanecendo esses valores significativamente elevados até o dia 70 ($11,33 \pm 2,95$) ($p < 0,001$)

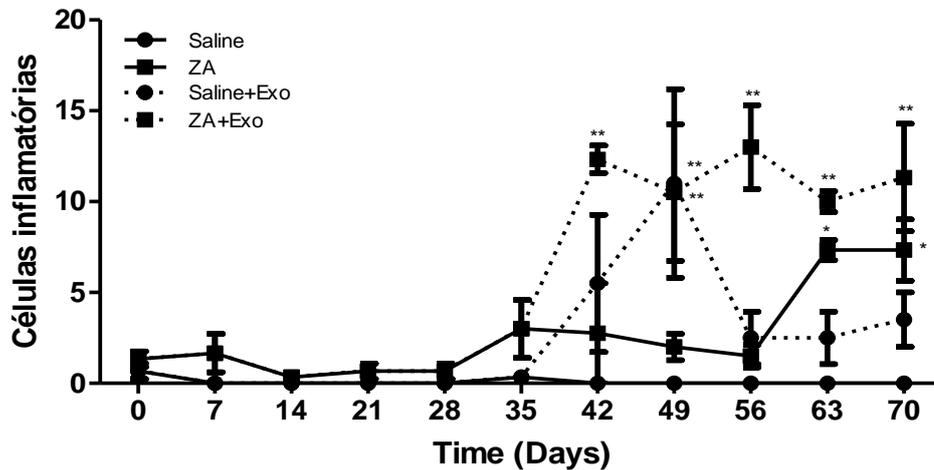


Figura 5: Contagem de células inflamatórias em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo * $p < 0,05$ versus salina sem exodontia; ** $p < 0,05$ versus grupos salina (sem exodontia e com exodontia); média \pm EPM, Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

A contagem de osteoclastos foi significativamente mais alta no grupo tratado com AZ submetido à exodontia em relação aos demais grupos a partir do dia 49 até o dia 70 ($p < 0,001$).

Foi observado no grupo salina após exodontia um aumento significativo no número de osteoclastos nos dias 49 ($5,00 \pm 0,10$) e 56 ($3,00 \pm 2,5$) retornando aos níveis basais do dia 63 ($2,00 \pm 1,15$) e 70 ($1,33 \pm 0,21$). No grupo AZ houve aumento no número de osteoclastos após exodontia a partir do dia 49 ($9,67 \pm 0,21$) permanecendo significativamente elevado até o dia 70 ($7,33 \pm 1,05$).

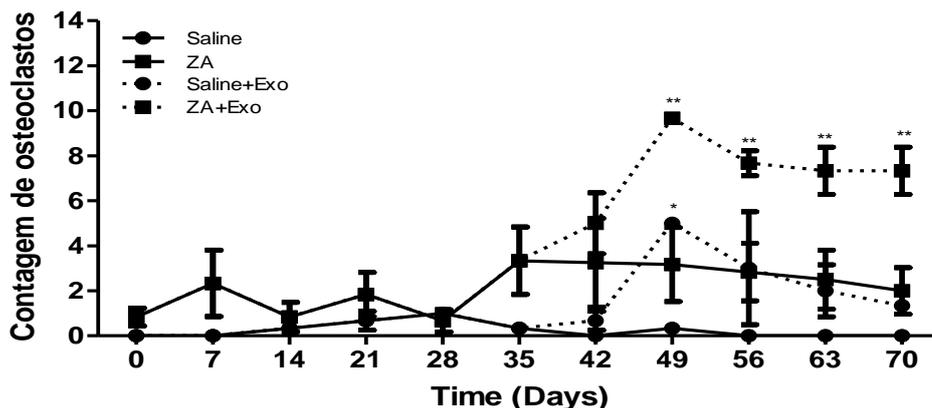


Figura 6: Contagem de osteoclastos em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo * $p < 0,05$ versus salina sem exodontia; ** $p < 0,05$ versus grupos salina (sem exodontia e com exodontia); média \pm EPM, Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

5.2 Exodontia associada ao tratamento com AZ aumenta os níveis de n-acetil glicosaminidase

Não houve diferença estatística entre os grupos AZ e salina do D0 ao D63, havendo diferença significativa entre esses dois grupos apenas no D70 ($3,82 \pm 0,60$ versus $7,47 \pm 0,77$ nmol pNP/mg) ($p < 0,001$). Nos animais submetidos a exodontia houve diferença significativa a partir do D56 ($5,32 \pm 0,68$ versus $10,14 \pm 0,24$ nmol pNP/mg), D63 ($5,34 \pm 0,26$ versus $10,52 \pm 1,53$ nmol pNP/mg) e D70 ($5,01 \pm 0,63$ versus $11,03 \pm 1,02$ nmol pNP/mg) ($p < 0,001$).

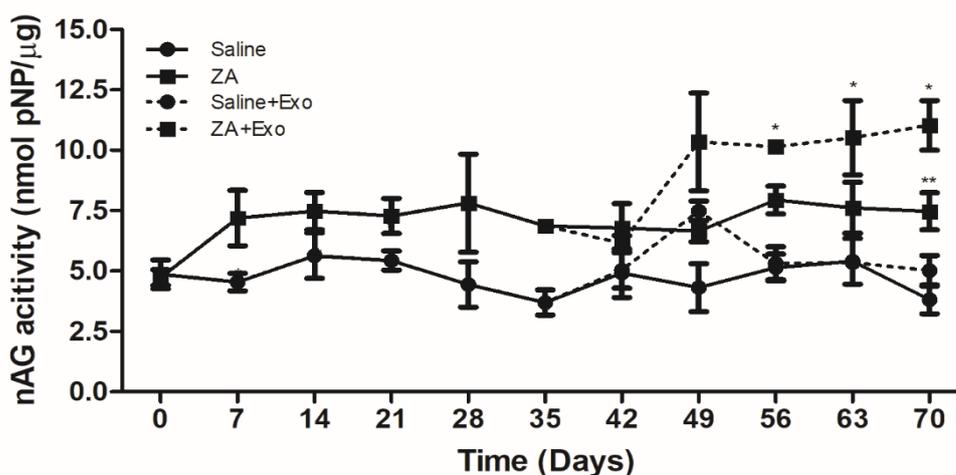


Figura 7: Concentração de n-AG de osteoclastos em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior direito * $p < 0,05$ versus salina sem exodontia; ** $p < 0,05$ versus grupos salina (sem exodontia e com exodontia); média \pm EPM, Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

5.3. Tratamento com AZ aumenta a imunopressão de TNF- α independente de exodontia

No dia 21, o grupo tratado com AZ mostrou maior número de células marcadas para TNF- α ($p < 0,001$), no dia 42 os animais tratados com AZ submetidos à exodontia apresentaram maior percentual de células marcadas para TNF- α que os animais tratados com AZ não submetidos à exodontia e estes dois grupos apresentaram mais células positivas que os grupos salina com ou sem exodontia ($p = 0,007$). Nos dias 56 os animais tratados com AZ com e sem exodontia e os animais tratados com salina com exodontia apresentaram maior percentual de células imunomarcadas para TNF- α ($p = 0,006$). No dia 70 os animais tratados com AZ com e sem exodontia apresentaram aumento significativo na imunopressão para TNF- α em relação aos demais grupos ($p = 0,006$ e $p = 0,002$).

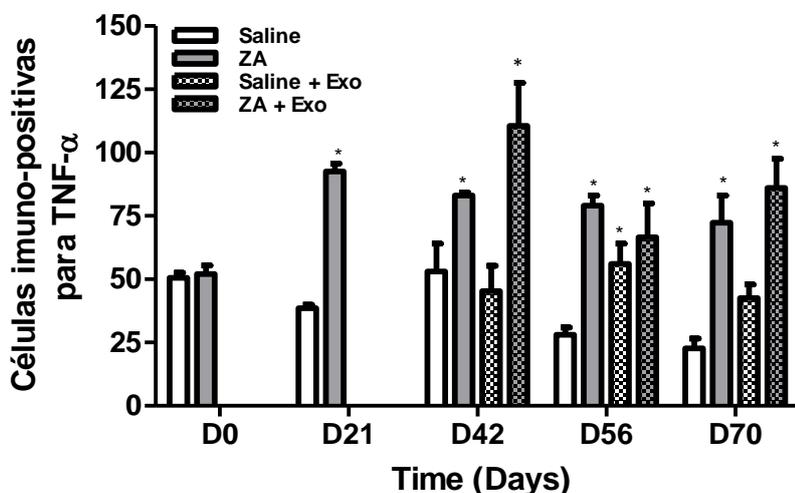


Figura 8: Contagem de células imuno-positivas para TNF- α em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo * $p < 0,05$, teste t de Student (D0 ou D21) ou ANOVA/Bonferroni (D42, D56 e D70) (média \pm EPM).

5.4 O Tratamento com AZ aumenta pontualmente a imunexpressão para IL-1 β .

No dia 21 o grupo tratado com AZ apresentou maior imunexpressão para IL-1 β que o grupo salina ($p=0,005$). No dia 42 ($p=0,150$), 56 ($p=0,524$) e 70 ($p=0,406$) não houve diferença entre os quatro grupos experimentais.

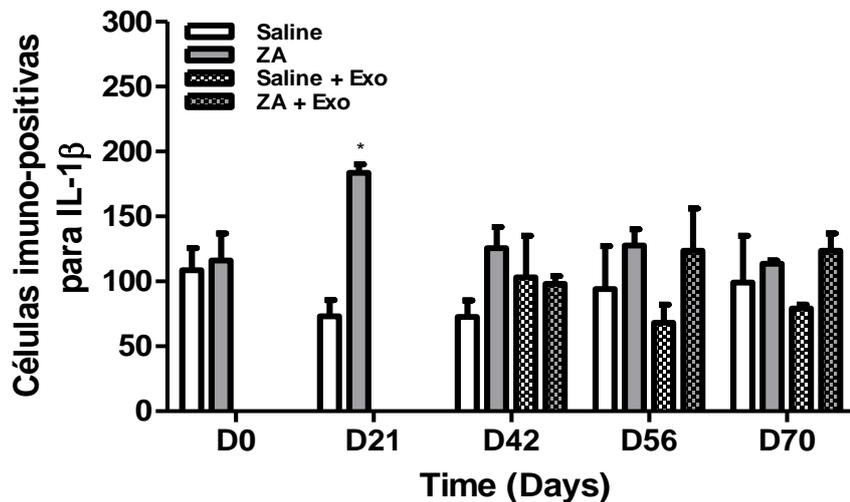


Figura 9: Contagem de células imuno-positivas para IL-1 β tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo * $p<0,05$, teste t de Student (D0 ou D21) ou ANOVA/Bonferroni (D42, D56 e D70) (média \pm EPM).

5.5 Exodontia associada ao tratamento com AZ aumenta a imunexpressão para COX-2 e MCP-1 no sítio de exodontia

Nos dias 0 ($p=0,264$) e 21 ($p=0,626$) não houve diferença significativa entre os grupos salina e AZ no tocante à imunexpressão de COX-2, porém, no dia 42 o grupo AZ sem exodontia apresentou mais células imunopositivas para este marcador que o grupo salina sem exodontia ($p=0,012$), e nos dias 56 e 70 o grupo AZ com exodontia apresentou imunexpressão significativamente superior aos demais grupos ($p<0,001$ e $p=0,020$).

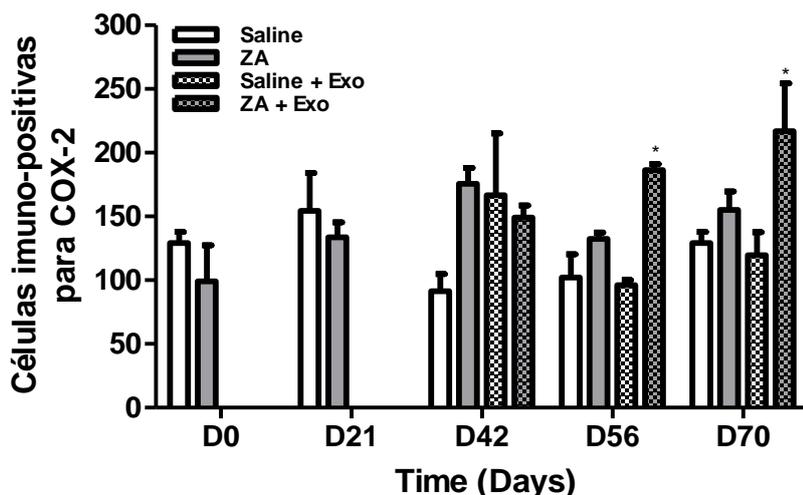


Figura 10: Contagem de células imuno-positivas para COX-2 tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo * $p < 0,05$, teste t de Student (D0 ou D21) ou ANOVA/Bonferroni (D42, D56 e D70) (média \pm EPM).

No dia 0 não houve diferença significativa no número de células imunopositivas para MCP-1 entre os grupos salina e AZ ($p = 0,770$). Todavia, no dia 21, os animais tratados com AZ apresentaram maior imunoexpressão para esse marcador ($p < 0,001$). No dia 42 os animais tratados com AZ submetidos ou não à exodontia apresentaram maior imunoexpressão para MCP-1 ($p = 0,030$). No dia 56, os animais submetidos à exodontia tratados ou não com AZ apresentaram maior imunoexpressão para MCP-1 do que os animais não submetidos ($p = 0,026$) ao passo que no dia 70 os animais tratados com AZ e submetidos à exodontia apresentaram a maior quantidade de células positivas para esse marcador no sítio de exodontia ($p < 0,001$).

Nos animais do grupo salina submetidos à exodontia houve aumento dos níveis de MCP-1 no dia 56 ($p = 0,009$) retornando aos níveis basais no dia 70 e nos animais tratados com AZ submetidos à exodontia, a quantidade de células positivas para MCP-1 aumentou a partir do dia 42, permanecendo significativamente elevados até o dia 70 ($p = 0,028$).

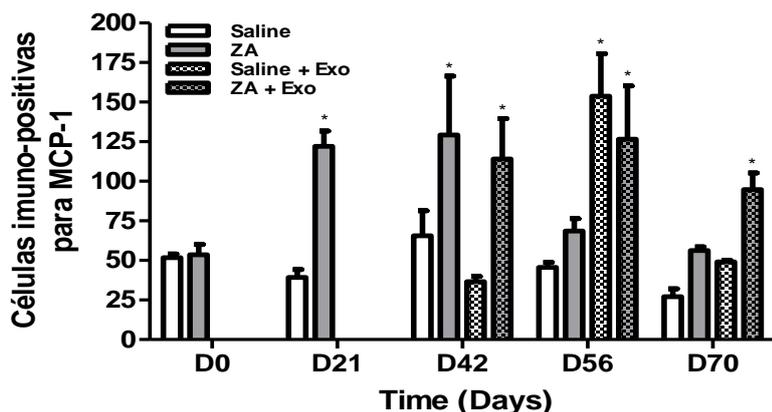


Figura 11: Contagem de células imuno-positivas para MCP-1 em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo * $p < 0,05$, teste t de Student (D0 ou D21) ou ANOVA/Bonferroni (D42, D56 e D70) (média \pm EPM).

5.6 Exodontia associada com tratamento com AZ aumenta a imunoposição nuclear para NF-kB

No dia 0 não houve diferença entre o número de células com imunoposição nuclear para NF-kB entre os dois grupos ($p = 0,447$), porém no dia 21 o número de células imunopositivas para NF-kB em núcleo foi significativamente superior no grupo AZ ($p < 0,001$). No dia 42 não houve diferença significativa entre os quatro grupos ($p = 0,148$), porém no dia 56 ($p = 0,011$) e dia 70 ($p = 0,003$) o grupo AZ submetido à exodontia apresentou o maior número de células com imunoposição nuclear para NF-kB.

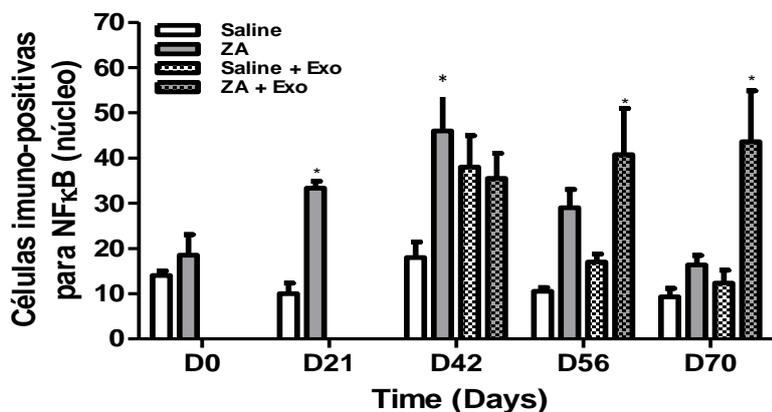


Figura 12: Contagem de células imuno-positivas para NF-kB beta tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo * $p < 0,05$, teste t de Student (D0 ou D21) ou ANOVA/Bonferroni (D42, D56 e D70) (média \pm EPM).

6. DISCUSSÃO

Os BFs são fármacos que atuam inibindo a reabsorção óssea mediada por osteoclastos e, por conseguinte, favorecem a redução do “*turnover*” ósseo, aumentando sua densidade e reduzindo o risco de fraturas. No entanto, este efeito inibitório de renovação do tecido ósseo, a longo prazo, pode acarretar em uma redução no processo de reparo ósseo e induzir osteonecrose (IZZOTTI et al, 2013; WALTER et al., 2010).

Muitos estudos apontam a participação do AZ na desregulação do sistema imunológico, acarretando em aumento significativo do número de células inflamatórias e níveis de citocinas pró-inflamatórias (BARROS-SILVA et al., 2017; ROSSINI et al., 2012, NORTON et al., 2012, WELTON et al., 2013). A participação da inflamação na OMB tem sido descrita desde os primeiros relatórios e pesquisas (HINSON et al., 2014). Mais de 81,6% dos casos de OMB estão associados à inflamação (HINSON et al., 2014). Em estudos com modelos experimentais com ratos, a OMB não foi associada à infecção, mas com intensa inflamação (LÓPEZ-JORNET et al., 2011). Assim, a desregulação imune tem um papel fundamental na patogênese da OMB.

No presente estudo observamos que a terapia com AZ parece induzir um estado hiper-inflamatório acompanhado pelo aumento de células inflamatórias associada a uma redução do turnover ósseo, constatada através do aumento de lacunas de osteócitos vazias em animais tratados com AZ, sugerindo, dessa forma, uma relação do aumento das células inflamatórias como um importante fator para o estabelecimento e desenvolvimento da OMB. Segundo George et al., (2018) a gravidade da osteonecrose, bem como a apoptose de osteócitos e o número de lacunas vazias aumentam a partir do estabelecimento de processo inflamatório do osso medular. Os osteócitos apoptóticos seriam responsáveis por desencadear processos que podem afetar a remodelação óssea e, especialmente, a atividade dos osteoclastos.

Os macrófagos, células oriundas dos monócitos, estão presentes nos tecidos ao final da inflamação aguda e presentes durante o processo inflamatório crônico. A presença de macrófagos em tecido cronicamente inflamado é garantida pelo recrutamento de monócitos no sangue, proliferação local de macrófagos e imobilização local dos macrófagos, sendo o primeiro mecanismo o mais importante (KUMAR et al., 2010). A destruição tecidual silenciosa é uma das características mais marcantes da inflamação crônica, com participação direta dos macrófagos.

A n-acetil- β -glicosaminidase (n-AG) é uma enzima predominantemente produzida por macrófagos e sua atividade sérica pode ser empregada como meio de avaliação indireta da concentração ou ativação de macrófagos teciduais (XAVIER et al, 2010; LAMAITA et al, 2012).

Neste estudo, observamos um aumento da concentração de n-AG em mandíbulas de camundongos tratados com AZ provavelmente em decorrência do aumento da concentração de TNF- α , IL-1 β , através da ativação de NF-kB. Segundo nosso estudo, foi verificado uma elevação significativa da imunomarcagem de TNF- α a partir do D21, sendo essa elevação acompanhada pelo aumento na imunomarcagem de NF-kB. O fator nuclear kappa B (NF-kB) desempenha um papel crucial nas respostas imunes e inflamatórias através da regulação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas e fatores de crescimento. Fatores de transcrição da família NF-kB são ativados em resposta a sinais que levam ao crescimento celular, diferenciação, apoptose e outros eventos. O NF-kB é ativado por sinais que ativam o fator nuclear NF-kappa-B inibidor quinase (IKK) resultando na fosforilação de uma proteína inibitória (I-kB). Após o processo de fosforilação, NF-kB é translocado para o núcleo celular (LYANG et al., 2004). Uma vez ativado, NF-kB eleva a concentração de TNF- α , IL-1 β e do Fator quimiotático de monócitos-1 (MCP-1), este último um importante fator quimiotático de macrófagos.

O TNF- α é uma citocina produzida por macrófagos e importante na quimiotaxia de neutrófilos. O aumento de neutrófilos mediados por TNF- α está

associado a danos teciduais locais (RAN et al, 2004). Segundo BARROS-SILVA et al. (2017), A infusão crônica de AZ aumenta o número de células inflamatórias e os níveis de TNF- α significativamente. Essa alteração foi observada em tecidos periodontais e em tecidos gengivais de ratos tratados com AZ, elevando o número de neutrófilos. Estes autores demonstraram ainda que a atividade MPO também foi significativamente aumentada na gengiva dos grupos tratados com AZ, provavelmente porque o TNF- α e a IL-1 β são importantes na quimiotaxia de neutrófilos. TNF- α também atua modulando o aumento de apoptose de osteócitos. A formação de corpos apoptóticos em osteócitos é um estímulo para o recrutamento e ativação de macrófagos e osteoclastos (KOGIANNI, MANN AND NOBLE, 2008), células que estão envolvidas no reconhecimento desses corpos apoptóticos para fagocitose e reabsorção óssea (HARRE et al, 2012). TNF- α é uma importante citocina associada à ativação do fator nuclear kappa B – NF-kB, através da ligação ao receptor TNFR, estimulando, dessa forma uma cascata de fosforilações culminando com sua ativação (KON et al., 2001; BALGA, 2006).

A ativação de NF-kB é um ponto chave na expressão de citocinas pró-inflamatórias, pois está diretamente relacionado ao controle da transcrição de genes da maioria dos fatores inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, COX-2, quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), a óxido nítrico sintase (iNOS) e moléculas de adesão (BARNES, 1997).

Para estabelecer a participação e a presença dos macrófagos no curso temporal do experimento e o papel dessas células na OMB, foi avaliada a proteína quimiotática de monócitos 1 – (MCP-1), que é um marcador chave no processo inflamatório, pois sua sinalização induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de macrófagos, sendo uma das principais reguladoras da resposta imune (SAWYER et al., 2014). No que se refere a presença de MCP-1 durante o protocolo de osteonecrose, observou-se um aumento significativo na imunomarcagem de MCP-1 no grupo tratado com AZ submetidos à exodontia. Após o procedimento cirúrgico D(42), a imunomarcagem manteve-se elevada até o desfecho do protocolo (D70). Dessa forma, a terapia com AZ manteve de forma sustentada a elevação MCP-1 após a exodontia. Este

é um achado importante no que diz respeito a participação dos macrófagos na patogênese da OMB, pois o aumento de MCP-1 foi acompanhado pelo aumento na concentração de n-AG ao longo do protocolo. Revelando, dessa forma, que a elevação dos níveis de TNF- α , responsável pela ativação de NF-kB, eleva a concentração de MCP-1 e conseqüentemente de macrófagos, confirmada com a elevação dos níveis de n-AG durante o protocolo em animais submetidos a terapia com AZ.

Outro achado importante no estudo refere-se a imunomarcação de COX-2. Dados recentes da literatura têm demonstrado que a enzima COX-2 apresenta um perfil bifásico de expressão/atividade durante o processo inflamatório. Enquanto ocorre uma expressão inicial de COX-2 em neutrófilos, relacionada com eventos vasculares e celulares da inflamação, em momentos mais tardios do processo inflamatório, ocorre a expressão em macrófagos, participando de eventos ligados à resolução do processo inflamatório (GUANG et al., 2015). Observou-se neste estudo, um significativo aumento na imunomarcação para COX-2 nos sítios de exodontia nos dias 56 e 70, em animais tratados com AZ. Esses dados corroboram com Diercke et al., 2012, em um estudo com cultura de células do periodonto submetido a forças mecânicas, onde os autores encontraram um aumento na expressão de COX-2 associada a terapia com AZ (JACOBS et al., 2017). O aumento na imunomarcação de COX-2 em mandíbulas de animais submetidos a terapia com AZ foi acompanhado, também, de um aumento na imunomarcação de NF-kB. Este achado é importante pois sabe-se que o fator nuclear kappa B é um regulador chave da ciclooxigenase-2 (GUANG et al., 2015). Portanto, o aumento de COX-2 está diretamente associado a ativação de NF-kB.

A partir dos achados obtidos, a terapia com AZ parece induzir uma quebra de homeostase e prejuízo no reparo. Quando observado o grupo salina, os animais que sofreram exodontia (D42) apresentaram uma elevação transitória de n-AG, NF-kB, MCP-1, COX-2 e citocinas (TNF- α), retornando aos níveis basais na semana posterior (D49). Entretanto, nos animais do grupo AZ foi observada uma elevação de n-AG, NF-kB, COX-2 e citocinas (TNF- α e IL-1 β) na semana da exodontia (D42), entretanto, quando comparado aos animais do

grupo AZ sem exodontia, viu-se que os níveis de todos esses marcadores inflamatórios não retornaram aos níveis basais no D49. Além disso, estes marcadores inflamatórios permaneceram elevados e acima dos níveis basais até o D70.

Em suma, a participação dos macrófagos parece estar associada a patogênese da OMB. Para a elucidação da patogênese dessa complexa condição torna-se imprescindível a realização de estudos com modulação de diferentes vias que determinam eventos pró-inflamatórios, dentre estas, enfatiza-se a rota de ativação e influxo local de macrófagos.

7. CONCLUSÃO

O tratamento crônico com AZ aumentou transitoriamente os níveis de TNF- α e IL-1 β , bem como o discreto aumento na atividade de n-AG em mandíbula de camundongos. Esses efeitos foram potencializados após exodontia, quando a superexpressão de MCP-1, COX-2 e NF-kB esteve relacionado aos níveis elevados de n-AG, sugerindo a participação do macrófago no desenvolvimento de OMB no modelo experimental testado.

8. REFERÊNCIAS

^{1,5} AAPRO, M et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumors: recommendations of an international expert panel. *Annals of Oncology*, v. 19, n. 3, p. 420–432, 2008

ABUGHAZALEH K., KAWAR N. Osteonecrosis of the jaws: what the physician needs to know: practical considerations. *Dis Mon. Apr*;57(4):231-41 2011

AGHALOO T. L., KANG B., SUNG E., SHOFF M, RONCONI M., GOTCHER J.E., BEZOUGLAIA O., TETRADIS S. Periodontal Disease and bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in the Rat. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 26, No. 8, , pp 1871–1882, 2011

ALI-ERDEM, M. et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, v. 16, n.7, p. 879-883, 2011

ALLAVENA P., MANTOVANI A: Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol* 167:195-205, 2012

ALLEN M.R., BURR D.B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg. May*;67(5 Suppl):61-70, 2009

ALLEN MR, RUGGIERO SL. A review of pharmaceutical agents and oral bone health: how osteonecrosis of the jaw has affected the field. *Int J Oral Maxillofac Implants.*;29(1):45-57, 2014

- APARECIDA CARIOLATTO F., CARELLI J., DE CAMPOS MOREIRA T., PIETROBON R., RODRIGUES C., BONILAURI FERREIRA A.P. recommendations for the Prevention of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review. *J Evid Based Dent Pract.* Jun;18(2):142-152, 2018.
- BAGAN, J. et al. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 42, n.5, p. 405-408, 2013
- BAMIAS A., KASTRITIS E., BAMIA C., et al: Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: Incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 23:8580, 2005
- BARROS SILVA, P.G.; FERREIRA JUNIOR, A.E.C; OLIVEIRA, C.C.; BRIZENO, L.A.C; WONG, D.V.T.; LIMA JUNIOR, R.C.P.; SOUSA, F.B.; MOTA, M.G.L., ALVES, A.P.N.N. Chronic treatment with zoledronic acid increases inflammatory markers in periodontium of rats *J Oral Pathol Med*;1–8, 2017
- BARROS-SILVA, P. G. B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*, v. 60, p. 1237-1245, 2015
- BARROS-SILVA, P. G., OLIVEIRA, C. C., BRIZENO, L. A., WONG, D. V. T., LIMA-JÚNIOR, R. C. P., GONÇALVES, R. P., et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Diseases*, 22, 649–657, 2016
- CAO X., SHEN D., PATEL M.M., TUO J., JOHNSON T.M., OLSEN T.W., et al.: Macrophage polarization in the maculae of age-related macular degeneration: A pilot study. *Pathol Int* 61:528-35, 2011
- CEPONIS P., KEILMAN C., GUERRY C., FREIBERGER JJ. Hyperbaric oxygen therapy and osteonecrosis. *Oral Dis.* Mar;23(2):141-151, 2017

CETIN K., CHRISTIANSEN C.F., SVAERKE C., JACOBSEN J.B., SORENSEN H.T. Survival in patients with breast cancer with bone metastasis: a Danish population-based cohort study on the prognostic impact of initial stage of disease at breast cancer diagnosis and length of the bone metastasis-free interval. *BMJ Open.*;5(4):e007702, 2015

CHEUNG W.Y., LIU C., TONELLI-ZASARSKY R.M et al., Osteocyte Apoptosis Is Mechanically Regulated and Induces Angiogenesis In Vitro. *J Orthop Res* 29: 523-530, 2011

CHOUDHURY, K.B., MALLIK, C., SHARMA, S., CHOUDHURY, D.B., MAITI, S., ROY, C.: A randomized controlled trial to compare the efficacy of bisphosphonates in the management of painful bone metastasis. *Indian J. Palliat. Care* 17(3), 210–218, 2011

CLÉZARDIN, P. Anti-tumour activity of zoledronic acid. *Cancer Treatment Reviews*, v. 31, n. 3, p. S1-S8, 2005

De SANTIS, C. E., LIN, C. C., MARIOTTO, A. B., SIEGEL, R. L., STEIN, K. D., KRAMER, J. L., JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64 (4), 252– 271, 2014

DIERCCKE K, KOHL A, LUX CJ, ERBER R. IL-1beta and compressive forces lead to a significant induction of RANKL-expression in primary human cementoblasts. *J Orofac Orthop*, 73(5):397–412, 2012

EID A, ATLAS J. The role of bisphosphonates in medical oncology and their association with jaw bone necrosis. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am.*;26:231-7, 2014

ENDELE, R.; LOEW, H.; BAUSS, F. Analytical methods for the quantification of ibandronate in body fluids and bone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n.1-2, p. 246-256, 2005

ENDO, et al., Underlying Mechanisms and Therapeutic Strategies for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). *Biol. Pharm. Bull.* 40, 739–750, 2017

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 274-280, 2005

FLEISCH, H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Endocrine Reviews*, v. 19, n. 1, p. 80–100, 1998

GEORGE E.L., LIN Y.L., SAUNDERS M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a mechanobiology perspective *Bone Reports*, 104–109, 2018

GILBERT L., HE X., FARMER P. et al Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 141: 3956-3964, 2000

GORDON S., MARTINEZ F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*; 32: 593–604, 2010

GRAVES, D. T.; JIANG, Y. Chemokines: a family of chemotactic cytokines. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, v. 6, n.2, p. 109-118, 1995

GUANG S., DONG L., JINLING F., YAN S., YARONG L., RONGFENG Q., XIN J., DONGFU L. Upregulation of cyclooxygenase-2 is associated with activation of the alternative nuclear factor kappa B signaling pathway in colonic adenocarcinoma *Am J Transl Res*;7(9):1612-1620, 2015

GUO X., ZHANG C., GUO Q., et al. The homogeneous and heterogeneous risk factors for the morbidity and prognosis of bone metastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Manage Res*.;10:1639–46, 2018

- HAO N.B., LU M.H., FAN Y.H., CAO Y.L., ZHANG Z.R., YANG S.M:
Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012:948098, 2012
- HARRE, U., IPSEIZ, N. et al. (2012) Moonlighting osteoclasts as undertakers of apoptotic cells. *Autoimmunity* 45, 612–9. 2012
- HINSON A.M., SMITH C.W., SIEGEL E.R., STACK B.C. Jr. Is bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw an infection? A histological and microbiological ten-year summary. *Int J Dent.*; 2014:452737, 2014
- HIRAGA, T et al., Administration of the Bisphosphonate Zoledronic Acid During Tooth Development Inhibits Tooth Eruption and Formation and Induces Dental Abnormalities in Rats. *Calcified Tissue International*, v. 86, n.6, p. 502–510, 2010
- HIRATA Y, TABATA M, KUROBE H, MOTOKI T, AKAIKE M, NISHIO C, et al.:
Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol* 58:248-55, 2011
- HOEFERT S., SCHMITZ I., WEICHERT F., GASPAR M., EUFINGER H:
Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases. *Clin Oral Investig* 19:497-508, 2015
- HOKUGO A., CHRISTENSEN R. CHUNG E.M., et al: Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res* 25:1337, 36, 2010
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981

IZZOTTI A., MENINI M., PULLIERO A., DINI G., CARTIGLIA C., PERA P., BALDI D. Bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw: the role of gene-environment interaction. *J Prev Med Hyg.* Sep;54(3):138-45, 2013

JACOBS C. et al., Mechanical loading increases pro-inflammatory effects of nitrogen-containing bisphosphonate in human periodontal fibroblasts. *Clin Oral Invest* DOI 10.1007/s00784-017-2168-1, 2017

KAN C., VARGAS G., PAPE F.L, CLÉZARDIN P., Cancer cell colonisation in the bonemicroenvironment, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (10) 1–16, 2016

KARNA H., GONZALEZ J., RADIA H.S., SEDGHIZADEH P.P., ENCISO R. Risk-reductive dental strategies for medication related osteonecrosis of the jaw among cancer patients: A systematic review with meta-analyses. *Oral Oncol.* Oct;85:15-23, 2018

KIM, Y. S., SEO, H. W. Reactive oxygen species promote heat shock protein 90-mediated HBV capsid assembly. *Biochem Biophys Res Commun.*; 457:328-333, 2015

KOBAYASHI Y., HIRAGA T., UEDA A., WANG L., MATSUMOTO-NAKANO M., HATA K., YATANI H., YONEDA T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* Mar;28(2):165-75, 2010

KOGIANNI, G., MANN, V., NOBLE, B. S. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of Bone and Mineral Research* 23, 915–27. 2008

KONONEN J., BUBENDORF L., KALLIONIEMI A., BÄRLUND M., SCHRAML P., LEIGHTON S., TORHORST J., MIHATSCH M.J, SAUTER G., ALLIONIEMI O. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *July* 4(7):844, 1998

KUIPER, J. W. P. et al. Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 165, n.2, p. 532–539, 2012

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010

KURAHARA H., SHINCHI H., MATAKI Y., MAEMURA K., NOMA H., KUBO F., et al.: Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 167:e211-9, 2011

LAMAITA RM, PONTES A, BELO AV, CAETANO JP, ANDRADE SP, CÂNDIDO EB, et al. Evaluation of N-acetilglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Journal Obstet Gynaecol Re.*;38(5):810–6, 2012

LAN C., HUANG X., LIN S., HUANG H., CAI Q., WAN T., et al.: Expression of M2-Polarized Macrophages is Associated with Poor Prognosis for Advanced Epithelial Ovarian Cancer. *Technol Cancer Res Treat*, 2012

LESCLOUS P., ABI NAJM S., CARREL J.P et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone* 45: 843-852. 2009

LIANG Y., ZHOU Y., SHEN P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cellular & molecular immunology*. Oct;1(5):343-50, 2004

LÓPEZ-JORNET P., CAMACHO-ALONSO F., MARTÍNEZ-CANOVAS A et al. Perioperative Antibiotic Regimen in Rats Treated With Pamidronate Plus Dexamethasone and Subjected to Dental Extraction: A Study of the Changes in the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 69: 2488-2493. 2011

LUQMANI Y, TEMMIM L, MEMON A, ABDULAZIZ L, PARKAR A, ALI M, et al. Measurement of serum N-acetyl beta glucosaminidase activity in patients with breast cancer. *Acta Oncol.*;38(5):649–53, 1999

LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Zoledronic Acid: a review of its use in breast cancer. *Drugs*, v. 68, n. 18, p. 2661-2682, 2008

MAAHS, M. P. et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head & Neck*, v. 33, n.2, p. 199-207, 2011

MACHADO, M., CRUZ, L.S., TANNUS, G., FONSECA, M.: Efficacy of clodronate, pamidronate, and zoledronate in reducing morbidity and mortality in cancer patients with bone metastasis: a metaanalysis of randomized clinical trials. *Clin. Ther.* 31(5), 962–979, 2009

MAHE, Y, MUKAIDA, N., KUNO, K., AKIYAMA, M., IKEDA, N., MATSUSHIMA, K. & MURAKAMI. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like elements. *J. Biol. Chem.* 266, 13759, 1991

MANTOVANI A., BISWAS S.K., GALDIERO M.R., SICA A., LOCATI M: macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229:176-85, 2013

MARINO K.L., ZAKHARY I., ABDELSAYED R.A et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol* 38: 511-518.2012

MARX RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*; 61(9):1115-7, 2003

MASSA, L. F.; BRADASCHIA-CORREA, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early

odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 54, n.6, p. 713–725, 2006

MATUOKA J.Y., KAHN J.G., SECOLI S.R. Denosumab versus bisphosphonates for the treatment of bone metastases from solid tumors: a systematic review. *Eur J Health Econ*. Oct 31. doi: 10.1007/s10198-018-1011-1, 2018

MEHROTRA B., RUGGIERO S. Bisphosphonate complications including osteonecrosis of the jaw. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 356, 2006

MENDES V., DOS SANTOS G.O., CALASANS-MAIA M.D., GRANJEIRO J.M., MORASCHINI V. Impact of bisphosphonate therapy on dental implant outcomes: An overview of systematic review evidence. *Int J Oral Maxillofac Surg*. Mar;48(3):373-381, 2019

MIGLIORATI C.A., SAUNDERS D., CONLON M.S. et al: Assessing the association between bisphosphonate exposure and delayed mucosal healing after tooth extraction. *J Am Dent Assoc* 144: 406, 2013

MISSO, G. et al. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biology & Therapy*, v. 13, n.14, p. 1491–1500, 2012

MOURA V.P.T., FONSECA S.M., GUTIERREZ M.G.R. Cuidando de paciente com câncer de mama e osteonecrose mandibular induzida por bifosfonato: relato de experiência. *Acta Paul Enferm* 22(1): 89-92, 2009

MUNDY, G.R.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature* 2(8), 584–593, 2002

MURATSU, D. et al. Zoledronic acid enhances lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory reactions through controlled expression of SOCS1 in macrophages. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, p. e67906, 2013

NAIDU, A. et al. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 106, n.1, p. 5–13, 2008

NICOLATOU-GALITIS O., KOURI M., PAPADOPOULOU E., VARDAS E., GALITI D., EPSTEIN J.B., ELAD S., CAMPISI G., TSOUKALAS N., BEKTAS-KAYHAN K., TAN W., BODY J.J., MIGLIORATI C., LALLA R.V; Osteonecrosis of the jaw related to non-antiresorptive medications: a systematic review. *Support Care Cancer*. Feb;27(2):383-394. 2019

NORTON J.T., HAYASHI T., CRAIN B. et al. Cutting edge: nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. *J Immunol* 188: 2977-2980. 2012

PAZ FJS, PAIVATHS, BARBOSA KGN. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bifosfonatos: uma revisão de literatura. *ClipeOdonto*;6(1):59-68, 2014

POLI P.P., SOUZA FÁ, MAIORANA C. Adjunctive use of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: A case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Sep;23:99-101, 2018

RAN Q, LIANG H, GU M, et al. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*.; 279:55137-55146, 2004

REID I.R., BOLLAND M.J., GREY A.B.: Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone* 41:318, 2007

RISTOW, O. et al. Effect of antiresorptive drugs on bony turnover in the jaw: denosumab compared with bisphosphonates. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 52, n. 4, p. 308- 313, 2014

ROGERS, M. J. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Cancer*, v. 88, n. 12, p. 2961-2978, 2000

ROSSINI, M. et al. Long-term effects of amino-bisphosphonates on circulating $\gamma\delta$ T cells. *Calcified Tissue International*, v. 91, n.6, p. 395-399, 2012

RUGGIERO S.L., FANTASIA J., CARLSON E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102:433, 2006

RUGGIERO S.L., MEHROTRA B., ROSENBERG T.J, et al: Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: A review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 62:527, 2004

RUGGIERO, S.L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication- related osteonecrosis of the jaw – 2014 update. *Journal of Oral And Maxillofacial Surgery*, [SI], v.72, 2014

RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics*, v. 119, n.2, p. S150-S162, 2007

RUSSELL, R. G. G.; CROUCHER, P. I.; ROGERS, M. J. Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporosis International*, v. 9, n.2, p. S66–S80, 1999

SAAD F., LIPTON A., COOK R., CHEN Y.M., SMITH M., COLEMAN R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer*.;110(8):1860–7, 2007

SAWYER AJ, TIAN W, SAUCIER-SAWYER JK, RIZK PJ, SALTZMAN WM, BELLAMKONDA RV, et al. The effect of inflammatory cell-derived MCP-1 loss on neuronal survival during chronic neuroinflammation. *Biomaterials*; 35: 6698–6706, 2014

SCHELLER, E. L. et al. Zoledronic acid inhibits macrophage SOCS3 expression and enhances cytokine production. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 112, n.11, p. 3364–3372, 2011

SCHEPER, M. et al. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *British Journal of Haematology*, v. 144, n.5, p. 667–676, 2009

SHAKER O., GHALLAB N.A., HAMDY E. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gingival tissues of chronic periodontitis with and without diabetes: immunohistochemistry and RT-PCR study. *Arch Oral Biol* 58: 1397-1406, 2013

SIGUA-RODRIGUEZ E.A., DA COSTA RIBEIRO R., DE BRITO A.C., ALVAREZ-PINZON N., DE ALBERGARIA-BARBOSA J.R. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a review of the literature. *International Journal of Dentistry*;: 2014192320, 2014

SILVA L.F., CURRA C., MUNERATO M.S., DEANTONI C.C., MATSUMOTO M.A., CARDOSO C.L., CURI M.M. Surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: literature review. *Oral Maxillofac Surg*. Mar;20(1):9-17, 2016

SILVERMAN, S. L.; LANDESBURG, R. Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. *American Journal of Medicine*, v.122, n.2, p. 33–45, 2009

SONIS S.T., WATKINS B.A., LYNG G.D, et al: Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions

mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol* 45:164, 2009

TSAO, C. et al. Oral Health Risk Factors for Bisphosphonate-Associated Jaw Osteonecrosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v. 71, n.8, p. 1360-1366, 2013

WALTER C. et al., Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Head Face Med.*; 6: 11, 2010

WEBER J.B., CAMILOTTI R.S., PONTE M.E. Efficacy of laser therapy in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): a systematic review. *Lasers Med Sci*. Aug;31(6):1261-72, 2016

WEBER M., BUTTNER-HEROLD M., HYCKEL P., MOEBIUS P., DISTEL L., RIES J., et al.: Small oral squamous cell carcinomas with nodal lymphogenic metastasis show increased infiltration of M2 polarized macrophages—an immunohistochemical analysis. *J Craniomaxillofac Surg* 42:1087-94, 2014

WEHRHAN F., MOEBIUS P., AMANN K., RIES J., PREIDL R., NEUKAM F.W., WEBER M. Macrophage and osteoclast polarization in bisphosphonate associated necrosis and osteoradionecrosis. *J Craniomaxillofac Surg*. Jun;45(6):944-953, 2017

WOLF, A. M.; TILG, H.; GUNSILIUS, E. The effect of zoledronic acid on the function and differentiation of myeloid cells. *Haematologica*, v. 91, n.9, p. 1165–1171, 2006

WOO, S. B.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Systematic Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. *Annals of Internal Medicine*, v. 144, n.10, p. 753-761, 2006

XAVIER DO, AMARAL LS, GOMES M A, ROCHA M A, CAMPOS PR, COTA BD, et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother*;64(3):220–5, 2010

YU, P. et al. Hydrogen-rich medium protects human skin fibroblasts from high glucose or mannitol induced oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 409, n.2, p. 350-355, 2011

ZHANG Y.F., et al. Association of mu-opioid receptor expression with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus* 28, 196–203, 2015

9. ANEXOS

Anexo A: Comprovante de aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Participação do macrófago em modelo experimental de osteonecrose em camundongos Swiss tratados com ácido zoledrônico”**, protocolo 139/17, sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 22 de fevereiro de 2018.

Vigência do projeto	março/2018 – março/2019
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss
Nº de Animais	192
Peso	30 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UFC

Alexandre Havt Bindá

Fortaleza, 26 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666982