



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

ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO NA PERIODONTITE APICAL EXPERIMENTAL EM RATOS**

FORTALEZA

2022

ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO NA PERIODONTITE APICAL EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção de
título de doutor em Odontologia.

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota
Orientador

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D66a do Nascimento, Isabelly Vidal.
Avaliação do efeito da terapia sistêmica crônica com ácido zoledrônico na periodontite apical experimental em ratos / Isabelly Vidal do Nascimento. – 2022.
62 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.

1. Periodontite Periapical. 2. Ácido Zoledrônico. 3. Difosfonatos. 4. Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Difosfonatos. I. Título.

CDD 617.6

ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO NA PERIODONTITE APICAL EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de doutor em Odontologia.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Danna Mota Moreira
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Dr. George Táccio de Miranda Candeiro
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Dedico este trabalho à minha mãe, **Maria Gerda Vidal de Lima** (*in memoriam*), com todo o meu eterno amor e gratidão por tudo que fizestes por mim.

Aos meus filhos **Matheus** e **Davi** que são o minha fortaleza e fonte inesgotável de amor.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, onde me formei, a qual tive o prazer de retornar após a conclusão da minha graduação em Odontologia, na pessoa do Magnífico Reitor, prof. **José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque**.

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

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará**, na pessoa do coordenador, prof. **Vicente de Paulo Aragão Saboia**. Agradeço aos seus professores e funcionários, que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional durante este período.

À **Deus**, meu terapeuta até aqui, por toda força e carinho, foi através da renovação de fé diária que segui, nem sempre firme, nem sempre forte, nem sempre bem, mas consegui.

À minha mãe, de novo, sempre e para sempre, **Maria Gerda Vidal de Lima** (*in memorian*), por tudo que fizeste por mim, seu incentivo incansável em minha educação, seu amor incondicional, sua garra, superação e força demonstrada durante toda vida, em meio à tantas adversidades. O tempo e as palavras nunca serão suficientes para descreverem a mulher que você foi e tudo que fizestes por mim e meus irmãos. Só você e eu sabemos a importância desse momento, a comemoração da minha aprovação no doutorado, foi uma das suas últimas comemorações, eu nunca esquecerei daquele momento, seu sorriso no rosto, tão radiante, “a primeira doutora da família, será minha filha”. E você me sustentou daí de onde a senhora está e me fez chegar aqui.

Ao meu pai, **Assis Gerardo do Nascimento** (*in memorian*), apesar de todos os problemas, eu sei o quanto o senhor tentou e o quanto seu orgulho por mim e meus irmãos moviam sua vida.

Aos meus irmãos, **Nikollas** e, em especial, minha irmã **Emanuelly**, que foi sempre foi uma das minhas primeiras inspirações de superação educacional e profissional, sua dedicação e amor aos estudos sempre me fizeram acreditar que seria possível, tenho muito orgulho de tudo que você se tornou.

Aos meus filhos, **Matheus e Davi**, vocês são os maiores e melhores presentes que Deus me deu, o que parecia adversidade, foi cura e amor. Muito obrigada por encherem meus dias com tanto amor e alegria, principalmente nos momentos mais difíceis, obrigada por serem, agora e para sempre, minhas maiores fontes de força para vencer e seguir em frente.

Aos meus avôs, **Luiz** (*in memoriam*), **Rosalba** (*in memoriam*), **Gerardo** (*in memoriam*) e **Alzira**, pelos exemplos de vida e amor concedido.

Aos meus tios, em especial, meu **tio Pádua, Tio Jorge, Tia Meire e Tia/madrinha Neide e Laerte**, pelo o auxílio e o cuidado prestado à minha mãe, à mim e meus irmãos, em momentos tão difíceis, ao longo de tantos anos.

Aos meus primos por todo o apoio, torcida e momentos partilhados.

Ao meu companheiro de vida, **Ciro Guimarães**, pela a paciência extraordinária, suporte, dedicação, carinho e companheirismo. Obrigada por abraçar o desafio de construir uma família diferente do nosso planejado, mas a melhor que poderíamos ter.

A minha sogra, **Tânia Leite**, pela a imensa ajuda em todos esses anos, que nunca me faltou, por ter sido uma mãe para mim e uma vó que meus filhos tanto precisavam.

Às minhas eternas amigas do coração, **Rebeca, Thinali e Karine**, pelas as conversas, conselhos, momentos de descontração e angustias partilhados. Obrigada por saber que posso contar com vocês sempre.

À **Faculdade de Odontologia** e ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** da **Universidade Federal do Ceará**, seu corpo docente, funcionários e coordenação pelos ensinamentos e assistência prestada.

Ao meu orientador, **Mário Rogério Lima Mota**, muito obrigada por tudo que tens feito, pelos inúmeros aprendizados, pela dedicação e disponibilidade ao longo de todos esses anos. Sou muito grata por todos os ensinamentos e momentos vividos, meu crescimento profissional, grande parte deve-se ao senhor. Obrigada por estar ao meu lado em situações tão importantes e marcantes da minha vida, mil desculpas pelas minhas falhas ao longo desse processo, nesse momento não existem palavras suficientes que me permitam lhe agradecer com devido merecimento.

Ao meu tão querido e amado professor **Fabricio Bitu**, meu primeiro orientador, por tudo que fez e tens feito por mim, desde o início da minha trajetória acadêmica até hoje. Muito obrigada por sempre me encorajar a alçar voos cada vez mais altos, pelas as oportunidades, ensinamentos, confiança e carinho concedidos. Sou muito grata a Deus por tê-lo colocado em meu caminho.

À professora **Ana Paula Negreiros**, muito obrigada pelos ensinamentos, exemplo de mulher, professora, pesquisadora, mãe, dentre tantas outras funções que a senhora exerce tão bem. A senhora é inspiração para mim e tantas outras pessoas.

A todos os professores que participaram nas bancas de qualificação, professora **Paula Goes**, pré-defesa, professor **André Brizeno** e defesa, professores **Renata Leitão**, **Danna Mota**, **George Candeiro**, muito obrigada pela a partilha e imensa contribuição este trabalho.

Ao meu grande amigo e professor **Paulo Goberlânio**, que além de contribuir em quase todas as fases desse trabalho, como banca de qualificação, pré-defesa e defesa, tanto me socorreu nos momentos de desespero. Muito obrigada meu amigo, você é parte imprescindível desta caminhada.

Ao professor **Fábio Wildson** por toda atenção, orientação e ajuda na execução de determinadas etapas deste trabalho.

Ao professor **Eduardo Studart**, pelos os conselhos, ensinamentos clínicos e científicos durante esse período na clínica de Estomatologia.

Aos amigos da pós-graduação, tanto os que ainda estão, quanto os que já concluíram a pós, pelos bons momentos de aprendizado e diversão compartilhados durante esse tempo, em especial, **Pedro Henrique**, nosso PH, pela amizade e companheirismo e a minha querida amiga **Imaculada**, que esteve junto comigo nessa jornada do início ao fim, literalmente, desde de sua iniciação científica e hoje como colegas de pós-graduação, sem sua ajuda, eu não teria conseguido, tenho certeza que sua jornada será brilhante, saiba que sempre terá alguém na torcida e desejando tudo de melhor na sua vida, muito obrigada!

Ao técnico de laboratório **Alceu Machado** e aos técnicos do laboratório do PPGO, **Karine** e **Florindo** pela grande contribuição e ensinamentos nas etapas laboratoriais.

A todos os funcionários da UFC, especialmente, ao **Rui Lino** e minha querida e eterna **Soninha** (*in memorian*), pela sua alegria constante, seu coração enorme, além da

disposição e dedicação em tudo que você fez. É tão difícil chegar naquele balcão da clínica 2 e não a encontrar com aquele sorriso e um café na mão. Nunca vou esquecer das suas palavras de carinho, nos seus últimos momentos, me dando força, quando deveria ser o contrário. Você fez parte da minha trajetória e sempre será lembrada em meu coração.

Aos integrantes da **Iniciação Científica** do laboratório de Patologia Bucal, do **Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)**, **Liga de Oncologia**, **Liga de Infectologia**, bem como os monitores e alunos das disciplinas de **Patologia Bucal e Estomatologia Clínica** pelo convívio e aprendizado.

A clínica **Perboyre Castelo**, na pessoa do Dr. Perboyre Júnior e ao Dr. Erick Fontenele, pela parceria estabelecida na execução das tomografias computadorizadas.

À **Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES**, pelo apoio e estrutura para realização de parte das análises deste estudo.

Ao curso de Odontologia, coordenação, amigos professores, funcionários e alunos do **Centro Universitário Unichristus**, como também pelo suporte estrutural e ajuda oferecida na realização de algumas etapas deste trabalho.

RESUMO

Os bisfosfonatos (BFs) são medicamentos com ação direta sobre o tecido ósseo e suas células. A periodontite apical (PA) é uma das doenças orais de maior prevalência e se caracteriza por uma resposta inflamatória a estímulos nocivos que levam à progressiva perda de estruturas perirradiculares. Atualmente, pouquíssimos estudos buscaram investigar a relação entre o uso sistêmico de BF na PA. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento da periodontite apical em ratos tratados sistemicamente com ácido zoledrônico (AZ). Foram utilizados 128 ratos Wistar machos, divididos aleatoriamente em dois grupos: um grupo tratado com ácido zoledrônico (0,2 mg/kg/semana) e um grupo controle no qual foi administrada solução salina (0,1ml/kg/semana), ambos por via endovenosa, durante três semanas consecutivas. Após um mês da última dose, foi realizada a indução da PA. Na semana seguinte, foi administrada uma dose adicional do fármaco e, posteriormente, os animais foram eutanasiados de acordo com cada período de avaliação (7, 14, 21 e 28 dias). As mandíbulas foram submetidas à avaliação tomográfica, histológica (presença de necrose pulpar, reabsorção óssea, osteonecrose), histomorfométrica (contagem de polimorfonucleares, mononucleares, lacunas de osteócitos vazias e osteoclastos), imunohistoquímica (Ligante do Receptor de Ativação do Fator Nuclear Kappa B [RANKL]), osteoprotegerina [OPG], Fator nuclear kappa B [NFkB p65] e Fator de necrose tumoral alfa [TNF- α] e microscopia eletrônica de varredura associada ao espectrômetro de energia dispersiva (EDS) para quantificação dos elementos nitrogênio, carbono, oxigênio, cálcio e fósforo. Foi considerado um nível de significância de 95% ($p < 0.05$). O tratamento com AZ reduziu significativamente a reabsorção óssea na região apical de dentes acessados endodonticamente, tanto em relação à altura, após 14 ($p = 0.0195$), 21 ($p = 0.0003$) e 28 dias ($p = 0.0003$) quanto em largura após 14 ($p = 0.0002$), 21 ($p = 0.0004$) e 28 dias ($p = 0.0007$) e profundidade após 14 ($p = 0.0009$), 21 ($p = 0.0020$) e 28 dias ($p = 0.0003$). Com relação à lesão apical do lado acessado, o grupo salina apresentou maior área que o grupo AZ nos dias 14 ($p = 0.0058$), 21 ($p = 0.0004$) e 28 ($p = 0.0003$). Histologicamente, no lado acessado, após 21 ($p = 0.0278$) e 28 dias ($p = 0.0163$) do acesso endodôntico, o grupo salina apresentou aumento significativo comparado ao AZ em relação à área da lesão apical. Com relação à contagem de PMN, houve um aumento significativo após 21 ($p = 0.0343$) e 28 ($p = 0.027$) dias no grupo AZ comparado ao salina. Já a contagem de MN mostrou diferença significativa entre os grupos salina e AZ apenas no dia 14 ($p = 0.0137$). Com relação à imunomarcagem de OPG, foi observado um aumento após sete ($p < 0.0001$), 14 ($p = 0.0018$), 21 ($p = 0.0004$) e 28 ($p = 0.0004$) dias no grupo AZ. Já a marcação de RANKL mostrou diferença significativa após 14 ($p = 0.0001$), 21 ($p = 0.0175$) e 28 ($p < 0.0001$) dias, sendo maior no grupo salina que no grupo AZ. As contagens de células positivas para NFkB p65 ($p = 0.0003$) e TNF- α ($p = 0.0373$) mostraram um aumento no grupo AZ após 28 dias. Na análise qualitativa por MEV e EDS, o tratamento com AZ altera aspectos estruturais pela presença de microtrincas e alteração dos níveis de cálcio e fósforo nas regiões apicais dos dentes acessados endodonticamente. Conclui-se que o AZ modificou o desenvolvimento da periodontite apical experimental induzida em ratos, causando inibição da reabsorção óssea. Esse fármaco também levou a uma exacerbação do processo inflamatório agudo, bem como um aumento nos níveis de OPG, NFkB e TNF- α , além de uma diminuição nos níveis de RANKL.

Palavras-chaves: Periodontite Periapical; Ácido Zoledrônico; Difosfonatos; Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Difosfonatos.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BFs) are drugs with direct action on bone tissue and its cells. Apical periodontitis is one of the most prevalent diseases and is characterized by an inflamed response to harmful stimuli that lead to the progressive loss of periradicular structures. Currently, very few studies seek to investigate the relationship between the systemic use of BP in AP. Therefore, the aim of this study was to evaluate the development of apical periodontitis in rats treated systemically with zoledronic acid (AZ). 128 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were randomly divided into two groups: a group treated with zoledronic acid (0.2mg/kg/week) and a control group that was administered saline solution (0.1ml/kg/week), Both intravenously, for 3 consecutive weeks, one month after the last dose, the AP was performed, the following week, animals were then dosed one dose and additionally they will be euthanized according to each evaluation period (7, 14, 21 and 28 days). Bone mandibles were evaluated for pulp necrosis, resorption, osteonecrosis, histomorphometric (polymorphonuclear, mononuclear, empty osteocyte lacunae and osteoclast count), immunohistochemistry (Active Kappa Nuclear Factor Receptor Ligand [RANK], osteoprotegerin [OPG], Nuclear factor- κ B [NF κ B] and Tumor necrosis factor-alpha [TNF- α]) and scanning electron microscopy associated with energy dispersive spectrometer (EDS) for quantification of the elements nitrogen, carbon, oxygen, calcium and phosphorus. A significance level of 95% ($p < 0.05$) was considered. Treatment with accessible height distance significantly reduced bone resorption in the apically region of endodontically accessed teeth, both in terms of height, after 14 ($p = 0.0195$), 21 ($p = 0.0003$) and 28 days ($p = 0.0003$), as in 14 ($p = 0.0002$), 21 ($p = 0.0004$) and 28 days ($p = 0.0007$) and depth after 14 ($p = 0.0009$), 21 ($p = 0.0020$) and 28 days ($p = 0.0003$). Regarding the apical lesion on the accessed side, the saline group presented an area that the AZ group on days 14 ($p = 0.0058$), 21 ($p = 0.0004$) and 28 ($p = 0.0003$). Histologically, on the accessed side, after 21 ($p = 0.0278$) and 28 days ($p = 0.0163$) of endodontic access, the saline group showed a significant increase compared to the AZ in relation to the area of the apical lesion. Regarding PMN count, there was a significant increase after 21 ($p = 0.0343$) and 28 ($p = 0.027$) days in the AZ group compared to saline. The MN count showed a significant difference between the saline and AZ groups only on day 14 ($p = 0.0137$). Regarding OPG immunoexpression, it was increased after seven ($p < 0.0001$), 14 ($p = 0.0018$), 21 ($p = 0.0004$) and 28 ($p = 0.0004$) days in the AZ group. RANKL immunoexpression showed a significant difference after 14 ($p = 0.0001$), 21 ($p = 0.0175$) and 28 ($p < 0.0001$) days it was higher in the saline group than in the AZ group. NF κ B p65 counts of ($p = 0.05$) and TNF- α ($p = 0.0373$) saw an increase in the AZ group after 28 days. In the qualitative analysis by SEM and EDS, treatment with AZ alters structural aspects due to the presence of micro cracks and changes in calcium and phosphorus levels in the apical regions of endodontically accessed teeth. AZ was found to modify the development of experimentally induced periodontitis at a projected, greater value than increased resorption. These processes also led to an exacerbation of the acute inflammatory, as well as an increase in the levels of OPG, NF κ B and TNF- α , in addition to an elevation in the levels of RANKL.

Palavras-chaves: Periapical periodontitis; Zoledronic Acid; Diphosphonates; Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação esquemática do desenho experimental da avaliação do AZ na periodontite apical induzida..... 26
- Figura 2.** Imagem tomográfica representativa dos parâmetros em relação à altura (A), largura (B) e profundidade (C) das áreas avaliadas, obtidas a partir do tomógrafo PreXion 3D e importados para Software de imagem ITK-SNAP..... 29
- Figura 3.** Figura representativa esquemática dos pontos de direcionamento do espectrômetro de energia dispersiva (EDS) segundo as áreas avaliadas (A). Eletrofotomicrografia por MEV no aumento de 200x (B) e com áreas de eleição para análise com EDS no aumento de 500x (C) na região apical de animais em animais tratados com salina ou AZ. Legenda: Raíz dentária (R), Lesão apical (LA), Osso alveolar (AO), áreas de eleição do EDS (quadrado).. 31
- Figura 4.** Análise tomográfica em relação à altura do lado não acessado (A) e acessado (B), largura do lado não acessado (C) e acessado (D) e profundidade do lado não acessado (E) e acessado (F) da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior nos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico submetidos ao modelo experimental de lesão apical. *p<0,05 versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM)37
- Figura 5.** Aspectos tomográficos da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior nos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico submetidos ao modelo experimental de lesão apical e análise tomográfica em relação à área da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior não acessado (A) e acessado (B) nos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico submetidos ao modelo experimental de lesão apical. *p<0,05 versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM)39
- Figura 6.** Aspectos histológicos das áreas da polpa radicular e lesão periapical e análise em relação à área da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior dos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico nos dias 7, 14, 21 e 28 após o acesso endodôntico. Coloração Hematoxilina-eosina 25x. *p<0,05 versus controle no 21º e 28º dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM)..... 42
- Figura 7.** Fotomicrografias representativas da contagem de células inflamatórias e osteoclastos das áreas de lesão periapical após o 7, 14, 21 e 28 dias do acesso endodôntico em animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. Coloração Hematoxilina-eosina 400x. Análise da

contagem de células inflamatórias do tipo polimorfonucleares (A), mononucleares (B) e osteoclastos (C) nos animais tratados com salina ou AZ e submetidos ao modelo experimental de lesão apical (abaixo). *p<0,05 versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM). 43

Figura 8. Imunomarcção de OPG e RANKL das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. 400x (a esquerda). Contagem de células positivas para marcação de OPG (A) e RANKL (B) na região apical em animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. *p<0,05 versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM). 44

Figura 9. Imunomarcção de NFkB e TNF- α das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. 400x (a esquerda). Contagem de células positivas para marcação de NFkB (A) e TNF- α (B) na região apical de animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. *p<0,05 versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM). 45

Figura 10. Eletrofotomicrografia da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura na região apical de animais em animais tratados com salina ou AZ após 7, 14, 21 e 28 dias do acesso endodôntico. MEV 200x. Legenda: Raíz dentária (R), Lesão apical (LA) e Osso alveolar (AO), zonas de microfraturas/trincas (*). 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da quantidade total de animais utilizados por grupos por metodologias a serem utilizadas.....	28
Tabela 2. Descrição de anticorpos primários para realização de imunohistoquímica.....	34
Tabela 3. Análise de dados dicotômicos quanto a presença/ausência de necrose pulpar e radicular, reabsorção óssea apical e microabscesso em animais tratados com salina ou ácido zoledrônico (AZ) e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.....	41
Tabela 4. Análise das quantidades relativas (%) dos átomos de cálcio, fósforo, oxigênio, nitrogênio e carbono da lesão apical e osso circunjacente em animais tratados com salina ou AZ e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Proteína ativadora
AZ	Ácido Zoledrônico
APC	Células apresentadoras de antígenos
BF	Bisfosfonatos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	Diamino benzidina
EDS	Espectrômetro de energia dispersiva
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
G-CFS	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HE	Hematoxilina-Eosina
IL	Interleucina
Kvp	Quilovoltagem
mA	Miliamperagem
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Proteínas inflamatórias de macrófagos
MMP	Metaloproteínases de matriz
MN	Mononucleares
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural killer
OMAM	Osteonecrose dos Maxilares associada a Medicamentos
OPG	Osteoprotegerina
PA	Periodontite Apical
PMN	Polimorfonucleares

RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Bisfosfonatos	16
1.2 Periodontite apical.....	18
1.3 Periodontite apical e bisfosfonatos	21
2. HIPÓTESES	24
2.1 Hipótese nula.....	24
2.2 Hipótese alternativa.....	24
3. PROPOSIÇÃO	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Animais, grupos e doses	26
4.2 Aspectos éticos	27
4.3 Cálculo amostral	27
4.4 Protocolo experimental para indução da periodontite apical.....	28
4.5 Tomografia Computadorizada de feixe cônico	29
4.6 Microscopia eletrônica de varredura e espectrômetro de energia dispersiva.....	30
4.7 Confeção de lâminas e análise histológica	31
4.8 Análise histomorfométrica	32
4.9 Processamento e avaliação imunohistoquímica.....	33
4.10 Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Tratamento com AZ inibe totalmente o aparecimento de achados dimensionais tomográficos em lesões apicais de ratos submetidos ao acesso endodôntico experimental	36
5.2 Tratamento com AZ reduz o tamanho histológico das lesões apicais, porém aumenta a migração de células inflamatórias durante desenvolvimento de lesões apicais em ratos submetidos a acesso endodôntico experimental	40
5.3 Tratamento com AZ deprime a razão RANKL/OPG, como também aumenta a expressão de TNF- α e NF κ B, em ratos submetidos a acesso endodôntico experimental.....	43
5.4 Tratamento com AZ parece alterar aspectos estruturais e químicos em ratos submetidos ao modelo de periodontite apical experimental.....	45
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BFs) são medicamentos amplamente utilizados no controle de doenças ósseas, como metástases osteolíticas, hipercalcemia por malignidades, doença de Paget e osteoporose (XIONG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2013). Esses medicamentos possuem uma estrutura análoga ao pirofosfato inorgânico e, por isto, possuem uma alta afinidade com hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), principal componente inorgânico do tecido ósseo (XIONG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2013).

Os BFs podem ser classificados quanto à presença de nitrogênio em sua estrutura e também pela sua via de administração. O zoledronato (AZ: ácido zoledrônico), administrado por via intravenosa, e alendronato, administrado por via oral, são exemplos de BFs nitrogenados mais potentes utilizados no tratamento do câncer e distúrbios do esqueleto, respectivamente (XIONG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2013).

O mecanismo de ação dos BFs aminados envolve uma potente ação sobre as células osteoclásticas através da indução da apoptose destas a partir da inibição da enzima intracelular farnesil-difosfato-sintase da via do mevalonato, fazendo com que não ocorra a prenilação (principalmente a geranylgeranilação) de pequenas proteínas que se ligam a GTP, as GTPases, que são essenciais para o tráfego de vesículas e manutenção da integridade do citoesqueleto (KANG *et al.*, 2013, MOLON *et al.*, 2014).

Esse efeito faz com que ocorra uma redução do turnover ósseo, aumento da massa óssea e da mineralização, o que leva à diminuição da reabsorção óssea e um aumento da densidade óssea mineral nos pacientes sob uso dessas drogas, comprometendo a qualidade do tecido ósseo (XIONG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2013). Além disso, os BFs podem permanecer na sua forma não metabolizada por longos períodos de tempo no tecido ósseo (XIONG *et al.*, 2010).

Apesar dos grandes benefícios da terapia com BFs, em 2004, foi relatado pela primeira vez um importante efeito adverso, a osteonecrose dos maxilares associados ao uso de bisfosfonatos (ONMB) (KANG *et al.*, 2013).

A ONMB se apresenta como osso necrótico exposto por mais de oito semanas que não se cura, no qual o paciente fez ou faz uso de BFs e não apresenta metástase óssea na região dos maxilares e nenhum histórico de radioterapia na região de cabeça e pescoço (XIONG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2013; CHEONG *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2016). Sinais e sintomas, como dor, presença de sequestro ósseo, fístula, sangramentos, parestesia e fraturas podem estar associados (MOLON *et al.*, 2014; de BARROS SILVA *et al.*, 2015). O tratamento é agressivo, envolve o desbridamento do osso necrótico, e de alto risco, o que torna o prognóstico imprevisível (de BARROS SILVA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2016).

Recentemente, esta condição foi reclassificada como osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamentos (OMAM), que vão englobar tantos os BFs como outros fármacos anti-reabsortivos e anti-angiogênicos, sendo, então, a ONMB uma subclassificação desta (CHEONG *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2016).

Embora a epidemiologia permaneça indeterminada, a prevalência da ONMB tem aumentado nos últimos anos, principalmente em pacientes que fazem ou fizeram uso de BF de forma endovenosa, sendo o AZ o mais associado a esta condição (CHEONG *et al.*, 2014; KRIMMEL *et al.*, 2014; de BARROS SILVA *et al.*, 2015). O AZ causa dano a diversos tipos células, tais como as células epiteliais, fibroblastos (SCHEPER *et al.*, 2009), osteoblastos (NAIDU *et al.*, 2008), macrófagos (SCHELLER *et al.*, 2011) e neutrófilos (KUIPER *et al.*, 2012).

As principais características histopatológicas descritas na literatura são a presença de necrose óssea, a partir da presença de lacunas de osteócitos vazias, sequestros ósseos, presença de infiltrado inflamatório, principalmente próximo a zonas de infecção, a descontinuidade do epitélio e tecido conjuntivo exposto, também pode apresentar reação periosteal sobre a cortical óssea, exibindo padrão ósseo desorganizado (ANTONI *et al.*, 2018.) Ademais, a presença de osteoclastos disformes e/ou não aderidos à superfície óssea também pode estar presente. (JOBKE *et al.*, 2014).

Inúmeros estudos têm sido realizados a fim de elucidar a patogênese desta complicação, no entanto, seus mecanismos permanecem incertos (XIONG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2013, MOLON *et al.*, 2014). Alguns autores relataram potenciais fatores de risco para ONMB, como a ocorrência de trauma dentoalveolar, tempo e via de administração do fármaco (XIONG *et al.*, 2010; CHEONG *et al.*, 2014). Hipóteses como toxicidade ao epitélio oral, alta remodelação dos

ossos gnáticos, efeito anti-angiogênico, presença de biofilme oral, infecção e inflamação também têm sido propostas (KANG *et al.*, 2013; CHEONG *et al.*, 2014; de BARROS SILVA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2016).

Histórico de extração dentária e/ou presença de doenças orais inflamatórias, como a periodontite e a periodontite apical (PA), parecem ser um fator precipitante ao desenvolvimento da osteonecrose, já que a maioria dos casos relatados estão associados a algumas dessas comorbidades (XIONG *et al.*, 2010; MOLON *et al.*, 2014; CHEONG *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2016; KRIMMEL *et al.*, 2014).

Cerca de 50% dos casos de ONMB estavam relacionados à extração dentária prévia (SONG *et al.*, 2016). A maioria dos procedimentos de extração dentária são resultados de doenças periodontais e/ou periapicais anteriores que se tornaram irreparáveis, o que podem predispor e/ou exacerbar as áreas afetadas para desenvolvimento de ONMB, mesmo antes da extração dentária (SONG *et al.*, 2016).

A hipótese de que as alterações dento-alveolares são fatores predisponentes para o desencadeamento de ONMB é afirmada pelos achados de Hoff *et al.* (2008) que descreveram um risco de até sete vezes maior, para desenvolver ONMB, em pacientes que apresentaram abscesso periodontal ou apical na área afetada.

Além disso, Krimmel *et al.* (2014) relatou que 38% dos pacientes avaliados em seu estudo apresentaram a periodontite apical como causa precipitante da ONMB. Portanto, a periodontite apical pode corresponder a uma doença intimamente relacionada à ONMB.

1.2 Periodontite apical

A periodontite apical é uma das doenças de origem inflamatória oral mais prevalentes observada em todo o mundo (TIBÚRCIO-MACHADO *et al.*, 2021). A doença se caracteriza por uma resposta do hospedeiro a agentes nocivos, como bactérias patogênicas oriundas do processo da cárie (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; LIU *et al.*, 2014). As bactérias agem colonizando os canais radiculares, levando a uma destruição dos tecidos pulpare e posteriormente ao desenvolvimento de uma

lesão nos tecidos periapicais (STASHENKO *et al.*, 1994; GRAUNAITE; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; LIU *et al.*, 2014).

A patogênese da doença é bastante complexa, envolve uma cascata de diversos fatores relacionados à resposta imunológica (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Essa resposta imunológica ocorre a partir da contaminação da polpa dentária, onde se inicia o processo de defesa, o que leva ao recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos para a câmara pulpar e, em seguida, atinge os tecidos perirradiculares (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

Após a liberação de toxinas e mediadores inflamatórios pulpares na região apical, é, então, iniciado um segundo processo de defesa do hospedeiro no local, este, geralmente, encontra-se limitado ao ligamento periodontal e ao tecido ósseo esponjoso circunvizinho, evoluindo para o osso adjacente (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Essa resposta se assemelha bastante à ocorrida anteriormente na polpa dentária, ou seja, se caracteriza pela produção e liberação de mediadores inflamatórios. As citocinas e quimiocinas são mediadores secretadas por células presentes nos tecidos lesados, que tem ação na modulação da atividade celular durante o processo inflamatório, alterando as funções celulares e/ou recrutando células de defesa para a região afetada (XIONG *et al.*, 2010; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012).

Os leucócitos PMN e os macrófagos estão envolvidos no processo da imunidade inata, são considerados a primeira linha de defesa e também são recrutados, inicialmente, a partir da ativação do sistema complemento e seus subprodutos (TAKAHASHI, 1998; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Os linfócitos T e B fazem parte da imunidade específica e são as células predominantes em lesões periapicais crônicas (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

À medida que a inflamação pulpar progride, os tecidos do ligamento periodontal e o osso circunvizinho acabam sendo atingidos, o que leva à destruição de ambos os tecidos e à formação de uma lesão apical, podendo se apresentar na forma de tecido de granulação ou cistos (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012). A reabsorção óssea ocorre a partir da liberação de enzimas de degradação de matriz extracelular e proliferação dos osteoclastos

(TEIXEIRA, 2007). As enzimas de degradação podem ser tanto as colagenases, gelatinases, metaloproteinases de matriz (MMP) e as proteases de serina (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

A integridade do tecido ósseo está diretamente relacionada com o equilíbrio de funções dos osteoblastos e osteoclastos sob condições fisiológicas normais (SILVA *et al.*, 2007; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012). Os osteoclastos são células de origem hematopoiética da linha monócito-macrófago conduzidos por quimiocinas até o ambiente afetado. A ativação dos osteoclastos ocorre através da ligação do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) com o seu ligante RANKL (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA *et al.*, 2007).

As citocinas pró-inflamatórias, diretamente envolvidas na patogênese da periodontite apical, como a IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e IL-17 estimulam a reabsorção óssea a partir da proliferação, diferenciação e ativação de osteoclastos, o que leva ao desenvolvimento da lesão apical (XIONG *et al.*, 2010; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008).

O TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) é produzido por diferentes tipos de células e age ativando células de defesa e estimulando a reabsorção óssea (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014). As respostas relacionadas ao TNF- α ocorrem por meio de ligação específica a receptores presentes na membrana de vários tipos de células. Esses receptores diferem nas suas afinidades de ligação, fazendo com que ocorra apoptose, ativação do NF- κ B (Fator nuclear kappa B) e a produção de mediadores pró-inflamatórias (POPA, *et al.*, 2007).

O NF- κ B desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção, como, por exemplo, na produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, como também na regulação da proliferação e apoptose celular (POPA, *et al.*, 2007).

O processo de reabsorção óssea está diretamente ligado à diferenciação, à atração e à ativação de osteoclastos a partir do desequilíbrio no balanço de osteoprotegerina (OPG), RANK e RANKL (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), presente em várias células, é uma citocina essencial para a indução da osteoclastogênese e também age induzindo a formação e a liberação de quimiocinas que amplificam este processo, exacerbando a

reabsorção óssea (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA *et al.*, 2007; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

O RANK é o receptor que traduz as ações do RANKL, se apresenta como uma proteína de superfície celular presente nas células precursoras de osteoclastos e, quando ativado causa a maturação dos osteoclastos (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA *et al.*, 2007; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

A interação RANK-RANKL é contra regulada pela OPG que é um receptor transmembrana antagonista natural da reabsorção óssea, sua principal função é inibir a diferenciação e reduzir a sobrevivência dos osteoclastos a partir da sua ligação ao RANKL (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; KONDO *et al.*, 2008).

A produção e liberação de RANKL e OPG são controladas por estímulos sistêmicos e locais, como produtos bacterianos, mediadores inflamatórios, hormônios esteróides e medicamentos (BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

1.3 Periodontite apical e bisfosfonatos

Atualmente, pouquíssimos estudos buscaram investigar a relação entre o uso sistêmico de BF na progressão e desenvolvimento da PA. Destes, a maioria avalia seu potencial de risco para desenvolvimento da ONMB.

Xiong *et al.* (2010) avaliou o pré-tratamento com alendronato (0,25 mg/kg/dia) por via subcutânea durante sete dias antes da indução da PA experimental, o que levou a uma inibição da perda óssea periapical com 28 dias após a indução da lesão, como também houve uma diminuição do número de células osteoclásticas em relação ao grupo controle, no entanto, nenhum caso de osteonecrose foi observado.

Um estudo anterior que buscou avaliar o efeito do ácido zoledrônico (200 µg/kg) por via intraperitoneal (3x/semana) durante oito semanas, o que corresponde a dois anos de tratamento em humanos, começando uma semana antes da indução da periodontite apical em camundongos, revelou, em um único momento avaliado, uma diminuição no tamanho da lesão

e um aumento na quantidade de células osteoclásticas nos animais tratados com AZ, além disto, estes apresentaram uma prevalência de osteonecrose de 88% e de exposições óssea de 33% (KANG *et al.*, 2013).

Esse estudo mostrou alta prevalência de osteonecrose, todavia, a dose de ácido zoledrônico administrada é três vezes maior do que a dose usualmente utilizada em estudos experimentais anteriores com BF (KANG *et al.*, 2013). Ademais, a via de administração adotada não é a mesma utilizada na clínica médica (via endovenosa) e o período de avaliação foi em apenas um momento.

França *et al.* (2017) verificou que os animais que receberam ácido zoledrônico, uma dose semanal intraperitoneal por quatro semanas antes ou após a indução da lesão, apresentaram lesões apicais menores que os grupos controles após 28 dias, além disso, a necrose óssea ou qualquer alteração morfológica não foram observadas em nenhum animal.

Pacheco *et al.* (2018) analisou ratos tratados com AZ em 2 doses diferentes por via intraperitoneal e foi verificado que, após cinco semanas da indução da lesão apical, uma menor atividade de remodelação óssea nos grupos tratados com AZ, quando comparado ao controle, como também a presença de osso necrótico e inflamação, foi mais evidente no grupo de maior dose de AZ.

Também foi observado uma maior absorção de AZ tanto nos sítios de periodontite apical como nos de exodontia em animais que receberam uma dose (200 µg/kg) depois de um, três, cinco e sete dias da indução da lesão/exodontia. Portanto, pode-se sugerir que áreas de maior turnover ósseo podem estar expostas a maiores doses de BF, o que pode explicar sua maior susceptibilidade à ONMB (CHEONG *et al.*, 2014).

Outro estudo que buscou avaliar a periodontite apical previamente à exodontia, ou seja, como um fator agravante no desenvolvimento da ONMB em animais tratados com zolendronato por via endovenosa (125 µg/kg – 2x/semana), durante sete semanas consecutivas, mostrou que a PA preexistente aumentou a ocorrência de osteonecrose dos maxilares após a extração dentária (SONG *et al.*, 2016).

Ainda assim, há poucas evidências sobre o real impacto da administração dos BFs de forma sistêmica na progressão da periodontite apical. Devido ao seu mecanismo de ação, esses fármacos podem influenciar diretamente tanto na patogênese quanto no reparo de lesões ósseas,

podendo também influenciar no prognóstico do tratamento das mesmas (XIONG *et al.*, 2010; ALLEN *et al.*, 2001; HIKITA *et al.*, 2009; TOUSSAINT *et al.*, 2009; AGUIRRE *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2010).

Sabe-se que o AZ pode desregular o sistema imunológico, aumentar o número de células inflamatórias e níveis de citocinas (ROSSINI *et al.*, 2012; NORTON *et al.*, 2012; WELTON *et al.*, 2013). Já foi observado que o ácido zoledrônico modificou o perfil inflamatório das células pulpares, através do aumento no número de macrófagos, além de levar ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e iNOS), citocinas que estão diretamente envolvidas no processo de desenvolvimento da periodontite apical (SILVA *et al.*, 2016).

A maioria dos estudos experimentais está relacionada com desenvolvimento da ONMB e utiliza a extração dentária como fator precipitante, contudo, sabe-se que uma fração significativa de ONMB ocorre na ausência de exodontias prévias e que a dose, a via de administração e o tempo estão diretamente relacionadas à sua ocorrência (KANG *et al.*, 2013; PACHECO *et al.*, 2018).

Outrossim, os poucos estudos que relacionam o uso de bisfosfonatos e periodontite apical buscaram observar somente a periodontite apical como fator de risco para ONMB, não avaliaram o curso temporal da doença. Além do mais, algumas das doses utilizadas estavam acima da empregada na prática clínica, como também a via de administração não é a mesma preconizada para os pacientes que fazem uso desta medicação, o que poderia levar a resultados sub ou superestimados.

Portanto, observou-se a necessidade de avaliar o efeito do ácido zoledrônico na progressão da periodontite apical através de um modelo animal que utilizasse dose, tempo e via de administração compatíveis com as praticadas na clínica médica.

2. HIPÓTESES

2.1 Hipótese nula

A terapia sistêmica crônica com ácido zoledrônico não interfere no desenvolvimento da periodontite apical experimental em ratos.

2.2 Hipótese alternativa

A terapia sistêmica crônica com ácido zoledrônico provoca alterações no desenvolvimento da periodontite apical experimental em ratos.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o desenvolvimento da periodontite apical em ratos tratados sistemicamente com ácido zoledrônico.

3.2 Objetivos específicos

- 1 Analisar, através de exames imaginológicos, o tamanho da lesão e do espaço do ligamento periodontal nos sítios de periodontite apical experimental e na região apical de dentes não acessados de animais tratados e não tratados com ácido zoledrônico.
- 2 Observar e comparar histologicamente o desenvolvimento da periodontite apical experimental em relação à presença de reabsorção óssea, de necrose pulpar, de osteonecrose e ao tamanho da lesão apical.
- 3 Investigar os sítios de periodontite apical experimental em relação ao número de osteoclastos, contagem de polimorfonucleares e mononucleares e de lacunas de osteócitos vazias em animais tratados e não tratados com ácido zoledrônico.
- 4 Analisar a imunexpressão de RANKL, OPG, TNF- α e NF- κ B p65 nos sítios com periodontite apical experimental.
- 5 Investigar as alterações de superfície e a composição química dos sítios de periodontite apical experimental por microscopia eletrônica de varredura e espectrômetro de energia dispersiva, em animais tratados ou não com ácido zoledrônico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais, grupos e doses

Foram utilizados um total de 128 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com peso inicial entre 150 - 180g. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12h, temperatura de 20-25°C. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: um grupo no qual foi administrado ácido zoledrônico 0,2mg/kg/semana, via endovenosa (veia caudal).

A dose de AZ utilizada foi o equivalente a uma dose mensal (4 mg) para tratamento de mieloma múltiplo, a qual foi calculada sendo equivalente a 0,60 mg/kg para os animais desta linhagem, essa dose foi obtida através do software Dose Calculator, Conversion Chemotherapy de Humanos para Animais, fornecido gratuitamente pela Food e Drug Administration (<http://www.accessdata.fda.gov>). O peso corporal e a área de superfície foram os parâmetros utilizados para a conversão farmacológica da dose humana de AZ para a dose animal. Em seguida, esta dose foi dividida em uma administração semanal de 0,20 mg/kg durante três semanas. Já no grupo controle, foi administrado 0,1 ml/kg de solução salina (NaCl 0,9%) seguindo o mesmo protocolo de uma dose semanal, durante três semanas (de BARROS SILVA *et al*, 2015).

Em ambos os grupos, a medicação (AZ ou salina) foi administrada durante três semanas consecutivas e, após um mês da última dose, foi realizada a indução da periodontite apical. Na semana seguinte da indução da lesão, foi administrada uma dose adicional (Adaptado de de BARROS SILVA *et al*, 2015). Posteriormente, os animais foram eutanasiados de acordo com cada tempo de avaliação 7, 14, 21 e 28 dias (Figura 1).

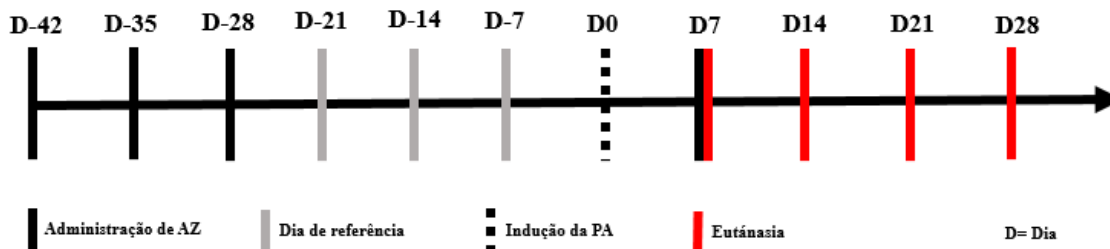


Figura 1: Representação esquemática do desenho experimental da avaliação do AZ na periodontite apical induzida.

4.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo de número nº 2387310818. O estudo seguiu as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experimentes) check list (KILKENNY *et al.*, 2010) para estudos em animais, como também foram adotadas condutas éticas para minimizar o sofrimento dos animais com base nos princípios dos 3R (Reduction, Refinement, Replacement). Todos os animais foram manejados com respeito e de forma adequada à espécie, tendo suas necessidades de transporte, alojamento, condições ambientais, nutrição e cuidados veterinários atendidas.

4.3 Cálculo amostral

Baseado no estudo de KANG *et al.* (2013), que observou, em animais submetidos a modelo de lesão apical, que o grupo tratado com ácido zoledrônico apresentou maior frequência de reação periosteal (94%) quando comparado a um grupo tratado com solução salina (6%). Estima-se necessário avaliar um total de oito ratos por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente com 95% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste trabalho.

Tendo em vista que parte das metodologias de análise provocam alterações irreversíveis aos espécimes, fez-se necessário duplicar a quantidade de animais por grupo. Os grupos ainda foram subdivididos em quatro subgrupos de oito animais cada de acordo com os dias de eutanásia (7, 14, 21 e 28 dias) após a indução da lesão, totalizando 128 animais (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição da quantidade total de animais utilizados por grupos por metodologias a serem utilizadas.

	GRUPO TESTE (ÁCIDO ZOLEDRÔNICO)		GRUPO CONTROLE (SALINA)	
DIA 7	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)
DIA 14	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)
DIA 21	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)
DIA 28	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)	8 ANIMAIS (TC, MEV)	8 ANIMAIS (AH, IH)
TOTAL	128 ANIMAIS			

Legenda: Tomografia computadorizada (TC), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Análise histológica (AH) e Imunohistoquímica (IH).

4.4 Protocolo experimental para indução da periodontite apical

A indução da periodontite apical foi realizada de acordo com um método descrito por WANG e STASHENKO, 1991. Após anestesia realizada com quetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal, as polpas dos primeiros molares inferiores esquerdo foram expostas com uma broca do tipo carbide de ¼ de diâmetro (JET®) em alta rotação sem refrigeração. A broca foi ativada até que todo seu diâmetro penetrasse na câmara pulpar. Em seguida, a câmara pulpar foi explorada por uma lima endodôntica do tipo kerr série especial número 10 (Maillefer®). Posteriormente, os dentes foram deixados expostos ao meio bucal durante todo o experimento e o molar inferior direito foi utilizado como controle (TEIXEIRA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014). Todos os procedimentos foram realizados por um único operador previamente treinado que desconhecia os grupos experimentais.

Após eutanásia dos subgrupos (sobredose de Quetamina e Xilazina) nos dias estipulados (7, 14, 21 e 28), as hemimandíbulas foram avaliadas quanto à presença de osso exposto na região do primeiro molar inferior e em seguida foram removidas cirurgicamente e armazenadas em meios específicos de acordo com as metodologias empregadas descritas anteriormente (metade das amostras de cada subgrupo foi armazenada em Formol neutro a 10% durante 48

horas e a outra metade foi lavadas com água destilada, secos à temperatura ambiente e armazenados em freezer -4°C).

4.5 Tomografia Computadorizada de feixe cônico

Em seguida, as mandíbulas foram escaneadas através de tomografia computadorizada Cone Beam. As imagens foram adquiridas utilizando um tomógrafo PreXion 3D Inc. (San Mateo, CA, EUA), usando os seguintes parâmetros técnicos: 90 kVp, 4mA, voxel de 0,1 mm. A tensão de tubo foi de 90 kVp e a corrente de 4 mA. Posteriormente, as imagens foram convertidas no formato DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) e importados para Software de imagem ITK-SNAP versão 3.8.0 (EUA) para gerar imagens tridimensionais (3D) e multiplanares e a reconstrução da imagem.

Para quantificar a perda óssea periapical, as imagens foram orientadas de modo que o eixo da raiz mesial do primeiro molar inferior fique paralelo aos planos coronais e sagitais. Foi delimitada uma distância, em linha reta, entre o ápice radicular ao osso alveolar periapical nos cortes sagital e coronal, em relação à altura, largura e profundidade da lesão apical/ligamento periodontal nas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior tanto para o lado acessado quanto para o contralateral saudável (adaptado de WAYAMA *et al.*, 2015) (Figura 2A, B e C).

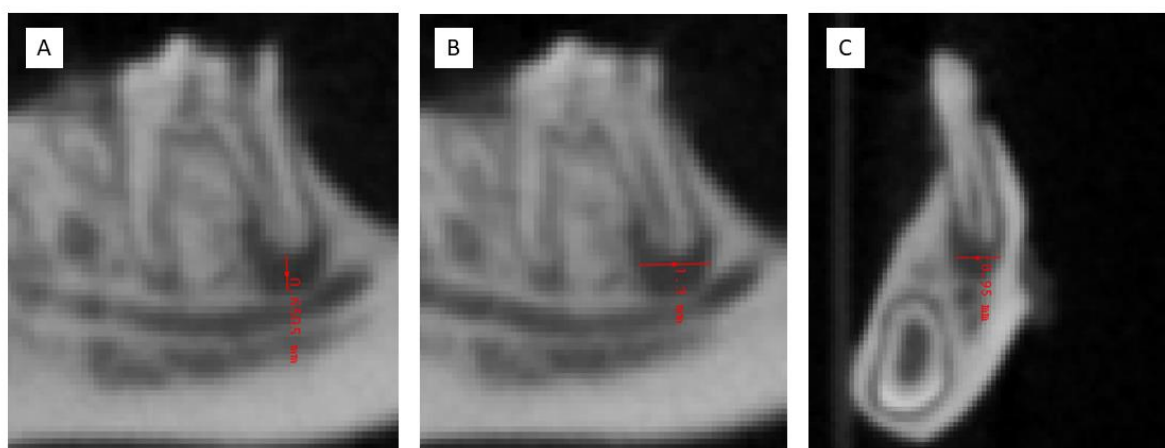


Figura 2. Imagem tomográfica representativa dos parâmetros em relação à altura (A), LARGURA (B) e profundidade (C) das áreas avaliadas, obtidas a partir do tomógrafo PreXion 3D e importados para Software de imagem ITK-SNAP.

Também foi realizada uma análise, em triplicata, da área radiolúcida em mm nos sítios de periodontite apical/ligamento periodontal, próximo à raiz mesial e distal, através do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*), por meio do software de análise de imagem *ImageJ*® (Instituto Nacional de Saúde, EUA) e foi considerada, como unidade amostral de cada animal, a média aritmética das três mensurações (Adaptado de SILVA *et al.*, 2015).

Todos os dados foram expressos a partir da média±EPM das unidades amostrais de cada subgrupo.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura e espectrômetro de energia dispersiva

As amostras de osso mandibular foram seccionadas de acordo com a área de interesse (primeiro molar inferior e área perirradicular), utilizando uma cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 4000, Buehler®,Uzwil, Suíça) e disco diamantado sob irrigação com água destilada e em baixa velocidade (150RPM). Posteriormente, foram polidas com uma sequência de lixas de papel abrasivas de baixa granulação (1600, 1800, 2000) sob irrigação e durante 30 segundos cada.

Ao final das etapas de secção e polimento, as amostras foram observadas em estereomicroscópio (S8APO, Leica Microsystems®) para confirmação de visualização e polimento satisfatório da área de interesse para a realização das leituras. Em seguida, as amostras foram dispostas em cuba ultrassônica durante 10 minutos para a remoção de resíduos e posteriormente secas em papel absorvente.

Posteriormente, os espécimes foram metalizados com ouro através de um Metalizador Quorum QT150ES (Quorum Technologies Ltd., Lewes, East Sussex, Reino Unido) para realização de análise através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Quanta 450-FEG (FEI), no qual foram obtidas as eletrofotomicrografias no aumento de 200x para análise descritiva e, logo em seguida, foi realizada a análise com espectrômetro de energia dispersiva (EDS) no aumento de 500x (Koninklijke Philips, Amsterdam, The Netherlands) (Figura 3).

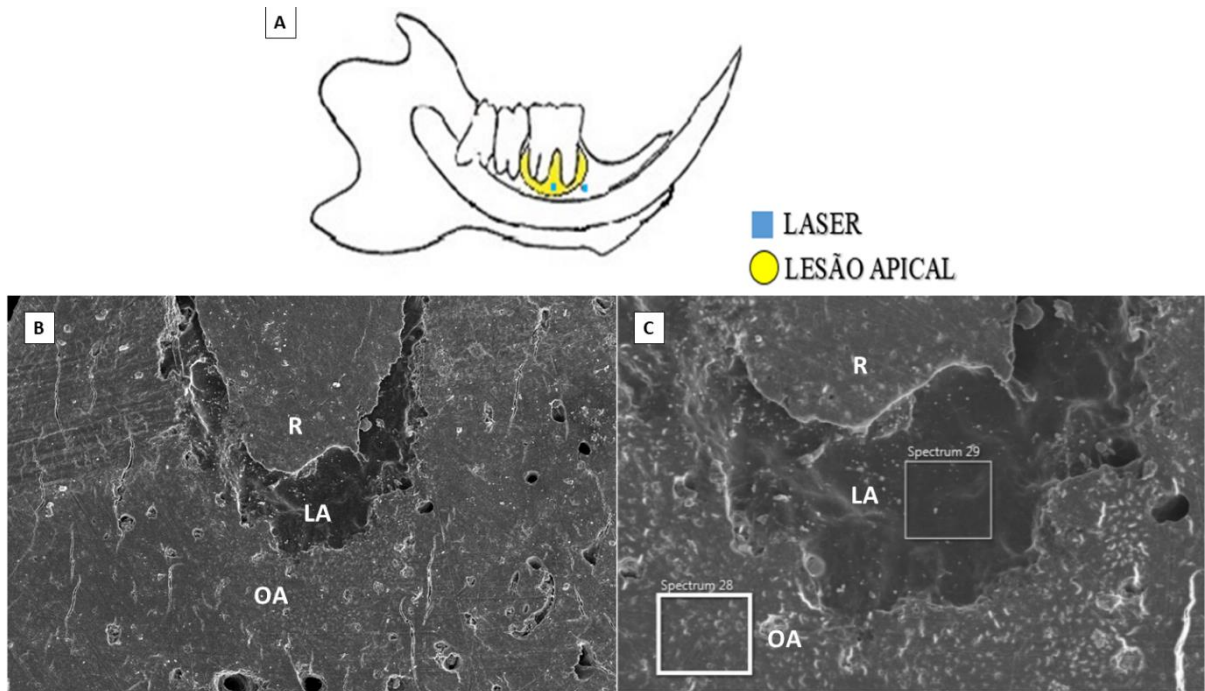


Figura 3. Figura representativa esquemática dos pontos de direcionamento do espectrômetro de energia dispersiva (EDS) segundo as áreas avaliadas (A). Eletrofotomicrografia por MEV no aumento de 200x (B) e com áreas de eleição para análise com EDS no aumento de 500x (C) na região apical de animais tratados com salina ou AZ.

Legenda: Raíz dentária (R), Lesão apical (LA), Osso alveolar (AO), áreas de eleição do EDS (quadrado).

Foi realizada uma análise qualitativa e descritiva, na qual foram avaliadas possíveis alterações de superfície e composição química dos espécimes em duas regiões, de cada animal, uma na área da lesão apical e outra no osso circunjacente (Figura 3). A análise de composição foi realizada com EDS a partir da leitura da energia de raio-X emitida pela amostra após o seu bombardeio, cada elemento químico apresenta uma energia de emissão bem definida o que permite sua classificação.

Foram observadas as quantidades relativas (%) dos átomos de nitrogênio, carbono, oxigênio, cálcio e fósforo das amostras e foram expressos na forma de média percentual (Adaptado de CARVALHO, 2017).

4.7 Confeção de lâminas e análise histológica

As hemimandíbulas foram descalcificadas em solução EDTA 10% (pH 7,3; NaOH, PA), durante 30 dias, sendo mantidas em suspensão por todo período. Em seguida, o material foi incluído em parafina por processamento automatizado PT05 LupTec®, cortado em espessura

de 4 µm e corado por Hematoxilina-eosina em lâminas montadas com Entellan®. As secções incluíram as raízes e o ápice dos primeiros molares inferiores.

Os primeiros molares inferiores e os tecidos adjacentes foram analisados seguindo os seguintes parâmetros: presença ou ausência de necrose pulpar coronária, necrose pulpar radicular e reabsorção óssea periapical. Os dados foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual (do NASCIMENTO *et al.*, 2022).

4.8 Análise histomorfométrica

Foi realizada uma análise quantitativa a partir da seleção e fotografia de 10 campos de um mesmo espécime em aumento de 400x junto ao periápice dentário através de um microscópio com câmera acoplada (Motic BA310 Microscope with Moticom 2000 2.0 M Pixel USB 2.0 com câmera acoplada software Motic Plus 2.0, Motic Medical Diagnostic Systems Co.®, Hong Kong). Foram realizadas as contagens dos números de células inflamatórias (Polimorfonucleares e Mononucleares) (do NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Além disso, outros cinco campos (400x) também foram selecionados na região óssea adjacente à lesão apical e contado o número de osteoclastos e de lacunas de osteócitos vazias. Todas as contagens foram realizadas com auxílio da ferramenta Plugin “Cell Counter” do software ImageJ® (do NASCIMENTO *et al.*, 2022).

As características morfológicas adotadas para o presente estudo foram as descritas a seguir (Adaptado de RAHDE, 2010; BRIZENO, 2013, de BARROS SILVA *et al.*, 2016; do NASCIMENTO *et al.*, 2022):

- **Polimorfonucleares:** células de núcleo segmentado e morfologia multilobulada.
- **Mononucleares:** células sem núcleo segmentado e morfologia unilobulada.
- **Osteoclastos:** células grandes com citoplasma eosinofílico com três ou mais núcleos.
- **Lacunas de osteócitos vazias:** lacuna óssea com ausência de osteócito.

O somatório das células do tipo polimorfonucleares e mononucleares, como também dos osteoclastos e de lacunas vazias existentes nos dez/cinco campos por animal, foi

considerado como uma unidade amostral. Os dados foram expressos na forma de média±EPM das unidades amostrais de cada subgrupo (do NASCIMENTO *et al.*, 2022).

A área da lesão apical do primeiro molar inferior acessado também foi mensurada histometricamente por um sistema de processamento de imagem que consistia em um microscópio com câmera acoplada (Motic BA310 Microscope with Moticom 2000 2.0 M Pixel USB 2.0 com câmera acoplada software Motic Plus 2.0, Motic Medical Diagnostic Systems Co.®, Hong Kong). Os dados foram expressos na forma de média±EPM das unidades amostrais de cada subgrupo (do NASCIMENTO *et al.*, 2022).

4.9 Processamento e avaliação imunohistoquímica

Foram realizados cortes de 4µm dispostos sobre lâminas silanizadas para realização de imunohistoquímica através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (adaptado de HSU *et al.* 1981) para RANKL, OPG, TNF- α e NF- κ B.

Após desparafinização e reidratação, foi realizada recuperação antigênica pela técnica de aquecimento em banho-maria, onde as lâminas foram acondicionadas em recipientes de polipropileno, contendo solução tampão de citrato 10 mM (pH = 6,0) e submetidas a aquecimento. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos) e, em seguida, foi realizado o bloqueio de proteína com BSA 5% por 20 minutos. Posteriormente, foi feita a incubação com anticorpo primário durante 16 horas (incubação overnight) em câmara úmida segundo suas especificações (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição de anticorpos primários para realização de imunohistoquímica

Anticorpo primário	Marca	Especificação	Diluição	Controle Positivo	Frasco
NF-κB p65	Abcam®	Rabbit polyclonal to NF-κB (ab16502)	1:200	Processos ulcerados de mucosa jugal de ratos	100 µg
TNF-α	Abcam®	Rabbit polyclonal to TNF alpha (ab6671)	1:100	Processos ulcerados de mucosa jugal de ratos	100 µg
RANKL	Abcam®	Rabbit polyclonal to RANKL (ab216484)	1:100	Tecidos de baço de rato	100 µg
OPG	Abcam®	Rabbit polyclonal to Osteoprotegerin (ab183910)	1:100	Tecido cardíaco lisado de ratos	100 µg

Após lavagem com PBS, o anticorpo secundário biotilado (Histofine®) foi incubado durante 30 minutos e, depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase conjugada por 30 minutos, lavagem com PBS, seguida da revelação com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) por cinco minutos (Dako®). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos e montadas com Entellan®.

Para avaliação microscópica, foram selecionados e fotografados cinco campos em um aumento de 400x na porção periapical circundante ao ápice da raiz mesial e distal. Foi realizada a contagem do número de células com coloração citoplasmática e/ou nuclear positivas para imunomarcagem com o auxílio da ferramenta Plugin 'Cell Counter' do software ImageJ® 1.8.0 (*National Institute of Health*) (do NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Todas as análises foram realizadas por um único operador, devidamente treinado, que desconhecia os grupos experimentais. O resultado foi expresso como média±EPM do somatório

de todos os campos analisados das unidades amostrais de cada subgrupo (do NASCIMENTO *et al.*, 2022).

4.10 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos e quantitativos foram submetidos ao teste ANOVA-2-way seguido do pós-teste de Bonferroni e expressos em forma de média e erro padrão da média. Os dados dicotômicos (ausência ou presença) foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism 5.0®, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1 Tratamento com AZ inibe o aparecimento de achados dimensionais tomográficos em lesões apicais de ratos submetidos ao acesso endodôntico experimental

A análise tomográfica evidenciou que a altura do ligamento periodontal, do lado não acessado, não apresentou diferença significativa entre os grupos salina e AZ após sete ($p=0.0778$), 14 ($p=0.0524$), 21 ($p=0.2503$) ou 28 ($p=0.7400$) dias (Figura 4A). No lado acessado, não houve diferença entre os dois grupos no dia sete ($p=0.8637$), a partir do 14° ($p=0.0195$), no 21° ($p=0.0003$) até o 28° dia ($p=0.0003$), o grupo salina (0.43 ± 0.04 , 0.60 ± 0.04 e 0.60 ± 0.046 mm, respectivamente) apresentou aumento significativo desta medida em relação ao grupo AZ (0.25 ± 0.05 , 0.33 ± 0.02 e 0.25 ± 0.03 mm, respectivamente) (Figura 4B). Esse aumento ocorreu significativamente a partir do 21° dia no grupo salina ($p<0.0001$) em relação ao sétimo dia. Já no grupo AZ, não houve nenhum aumento significativo dessa medida entre nenhum dos dias analisados ($p=0.3462$).

Em relação à largura do ligamento periodontal, do lado não acessado, não houve diferença significativa entre os grupos salina ou AZ após sete ($p=0.6934$), 14 ($p=0.0574$), 21 ($p=0.0783$) ou 28 ($p=0.0535$) dias (Figura 4C). No lado acessado, não houve diferença significativa entre os dois grupos no dia sete ($p=0.9904$), após o 14° ($p=0.0002$), 21° ($p=0.0004$) e 28° dia ($p=0.0007$) o grupo salina (1.09 ± 0.06 , 1.20 ± 0.09 e 1.37 ± 0.14 mm, respectivamente) apresentou aumento significativo desta medida em relação ao grupo AZ (0.52 ± 0.06 , 0.64 ± 0.03 e 0.55 ± 0.07 mm, respectivamente) (Figura 4D). Esse aumento ocorreu significativamente a partir do 14° dia no grupo salina ($p<0.0001$) em relação ao sétimo dia. Já no grupo AZ, não foi observado nenhum aumento significativo dessa medida entre nenhum dos dias analisados ($p=0.3461$).

Quanto a profundidade do ligamento periodontal, do lado não acessado, não houve diferença significativa entre os grupos salina ou AZ após sete ($p=0.0605$), 14 ($p=0.2458$), 21 ($p=0.1169$) ou 28 ($p=0.8157$) dias (Figura 4E). No lado acessado, não houve diferença significativa entre os dois grupos após sete dias ($p=0.5707$), a partir do 14° ($p=0.0009$), 21° ($p=0.0020$) e 28° ($p=0.0003$) dia, o grupo salina (0.91 ± 0.05 , 0.95 ± 0.06 e 1.27 ± 0.12 mm, respectivamente) apresentou aumento significativo desta medida comparado ao grupo AZ (0.65 ± 0.02 , 0.62 ± 0.04 e 0.50 ± 0.04 mm, respectivamente) (Figura 4F). Esse aumento ocorreu significativamente a partir do 14° dia no grupo salina ($p<0.0001$) em relação ao sétimo dia. Já

no grupo AZ, não foi observado nenhum aumento significativo dessa medida entre nenhum dos dias analisados ($p=0.3481$).

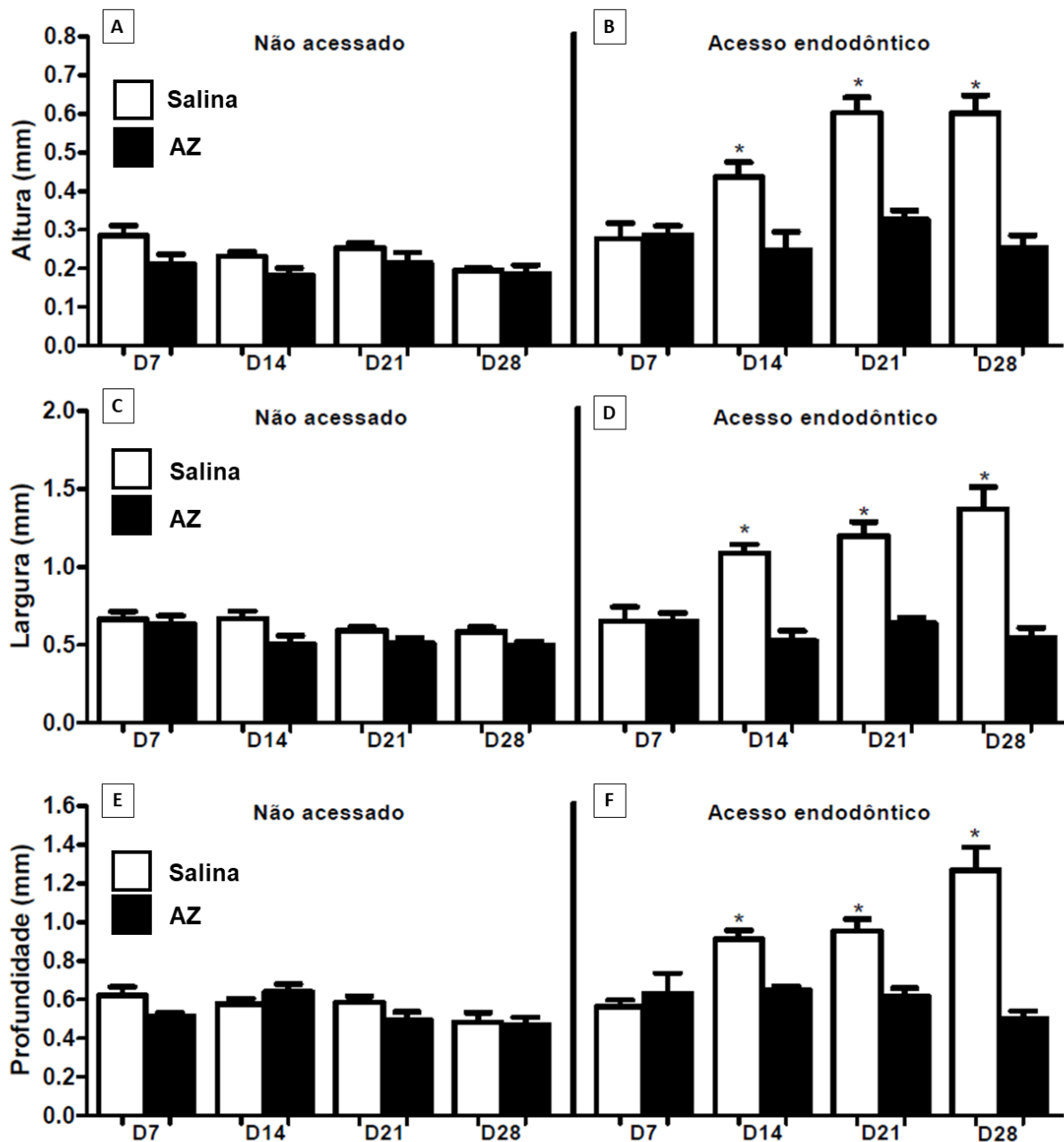


Figura 4. Análise tomográfica em relação à altura do lado não acessado (A) e acessado (B), largura do lado não acessado (C) e acessado (D) e profundidade do lado não acessado (E) e acessado (F) da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior nos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico submetidos ao modelo experimental de lesão apical. * $p < 0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM).

A análise tomográfica ainda mostrou, com relação a área apical do ligamento periodontal, do lado não acessado, que, tanto após sete (0.18 ± 0.01 vs. 0.13 ± 0.01 mm², $p=0.0004$) como após 14 (0.16 ± 0.02 vs. 0.11 ± 0.01 mm², $p=0.043$), 21 (0.17 ± 0.01 vs. 0.12 ± 0.01 mm², $p=0.0063$) e 28 (0.16 ± 0.01 vs. 0.10 ± 0.01 mm², $p=0.0066$) dias, o grupo salina apresentou maior área média que o grupo tratado com AZ (Figura 5A).

No lado acessado, apesar de não haver diferença significativa na área média entre os dois grupos no sétimo dia ($p=0.2375$), o grupo salina apresentou maior área que o grupo AZ no 14° (0.52 ± 0.10 vs. 0.14 ± 0.01 mm², $p=0.0058$), 21° (0.74 ± 0.09 vs. 0.20 ± 0.02 , $p=0.0004$) e 28° dia (0.71 ± 0.08 vs. 0.19 ± 0.02 mm², $p=0.0003$) (Figura 5B). O aumento ocorreu significativamente a partir do 14° dia no grupo salina ($p=0.0014$) em relação ao sétimo dia. Já no grupo AZ, não foi observado nenhum aumento significativo dessa medida entre nenhum dos dias analisados ($p=0.1384$).

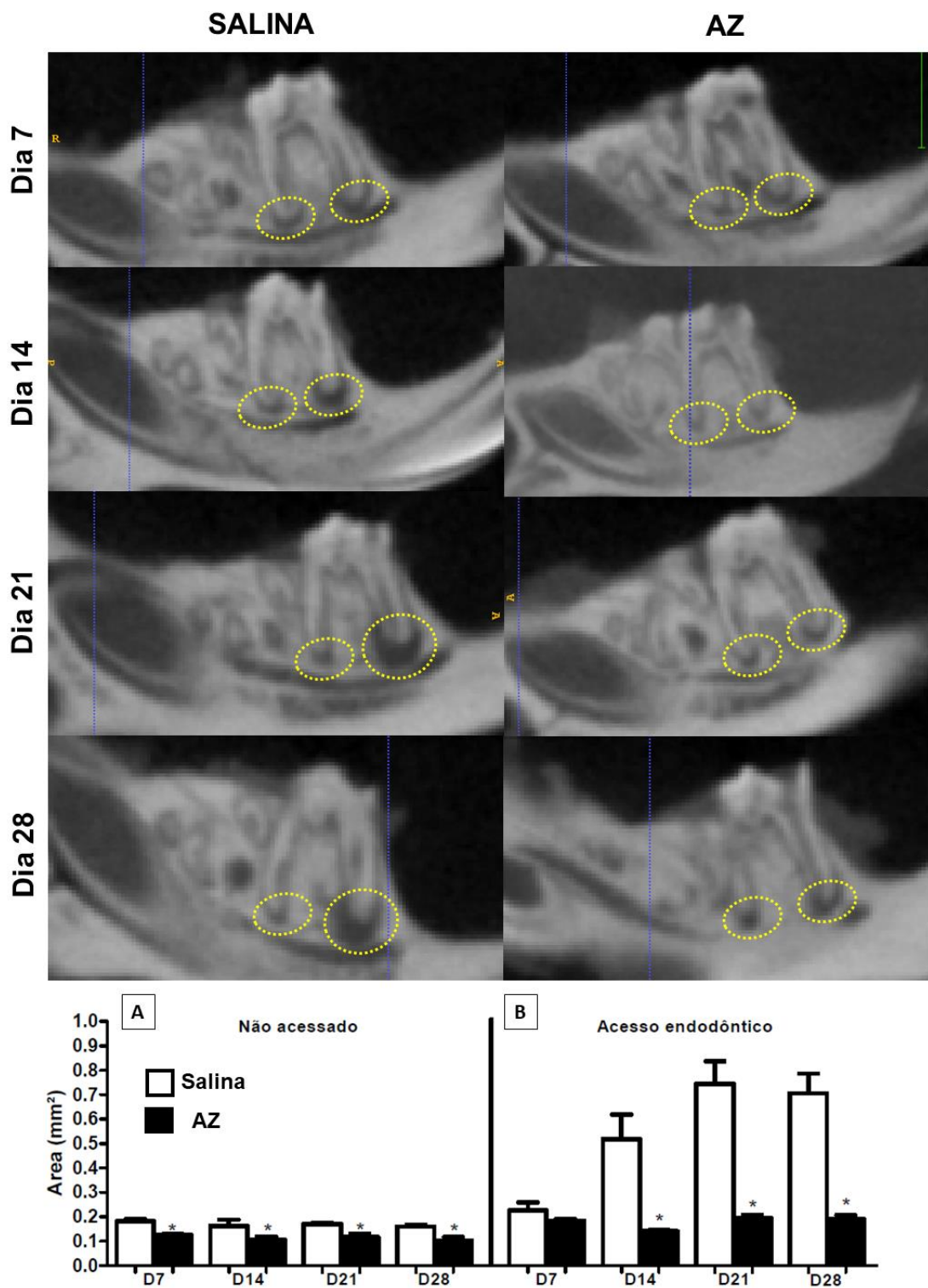


Figura 5. Aspectos tomográficos da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior nos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico submetidos ao modelo experimental de lesão apical e análise tomográfica em relação à área da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior não acessado (A) e acessado (B) nos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico submetidos ao modelo experimental de lesão apical. * $p < 0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media \pm EPM).

Legenda: área mensurada (pontilhado amarelo).

5.2 Tratamento com AZ reduz o tamanho histológico das lesões apicais, porém aumenta a migração de células inflamatórias durante desenvolvimento de lesões apicais em ratos submetidos a acesso endodôntico experimental

Histologicamente, todas as amostras apresentaram necrose pulpar coronária nos grupos salina e AZ. Já a necrose da polpa radicular foi observada significativamente a partir do dia 21 tanto no grupo salina ($p=0,044$) como no grupo AZ ($p=0,037$) sem diferença entre os grupos (Tabela 3). A presença de reabsorção também foi observada significativamente a partir do dia 21 tanto no grupo salina ($p=0,016$) como no grupo AZ ($p=0,031$), semelhante à presença de abscesso periapical ($p=0,042$ e $p=0,034$, respectivamente) sem diferença entre os grupos (Tabela 3).

Em relação ao tamanho da lesão apical, não houve diferença significativa entre os dois grupos após sete dias ($p=0.7902$) e 14 dias ($p=0.0802$), no entanto, após 21 ($p=0.0278$) e 28 ($p=0.0163$) dias do acesso endodôntico, o grupo salina (659100 ± 162300 e $855800\pm181800 \mu\text{m}^2$, respectivamente) apresentou aumento significativo comparado ao AZ (265600 ± 40170 e $363400\pm71610 \mu\text{m}^2$, respectivamente) (Figura 6). O aumento ocorreu significativamente a partir do 21º dia no grupo salina ($p=0.0313$), em relação ao sétimo dia. Já no grupo AZ não foi observado nenhum aumento significativo dessa medida entre nenhum dos dias analisados ($p=0.2876$). Não houve diferença estatística no lado não acessado entre os dois grupos em nenhum dos momentos avaliados ($p>0.05$).

Com relação à contagem de PMN, após sete ($p=0.4239$) e 14 ($p=0.2635$) dias após o acesso, não houve diferença significativa entre os grupos salina e AZ, mas, após 21 ($p=0.0343$) e 28 ($p=0.027$) dias, o grupo AZ apresentou aumento significativo comparado ao grupo salina (140.7 ± 37.02 vs 50.60 ± 14.21 e 56.00 ± 9.83 e 136.40 ± 34.09 , respectivamente) (Figura 7A). Esse aumento ocorreu significativamente a partir do 21º dia tanto no grupo salina ($p=0.0025$) como no grupo AZ ($p=0.0006$) em relação ao sétimo dia.

Já a contagem de MN apresentou um aumento significativo do grupo AZ em relação ao grupo salina no dia 14 (22.50 ± 3.96 vs 9.00 ± 2.19 , $p=0.0137$) (Figura 7B). O aumento ocorreu significativamente a partir do 28º dia no grupo salina ($p=0.007$) e no 14º dia no grupo AZ ($p<0.0001$) em relação ao sétimo dia. Adicionalmente, não houve diferença na contagem de osteoclastos entre os grupos salina e AZ em nenhum dia após o acesso endodôntico ($p>0.05$), apesar dos dados mostrarem uma tendência ao aumento no grupo AZ nos dias sete e 21 (Figura

7C). A presença de exposição óssea, de osteonecrose, bem como lacunas de osteócitos vazias, não foram encontradas na região avaliada em nenhum espécime de ambos os grupos.

Tabela 3: Análise de dados dicotômicos quanto à presença/ausência de necrose pulpar e radicular, reabsorção óssea apical e microabscesso em animais tratados com salina ou ácido zoledrônico (AZ) e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.

	Tempo (Dias)				p-Valor
	7	14	21	28	
Necrose pulpar coronária					
Salina	8 (100.0%)	8 (100.0%)	8 (100.0%)	8 (100.0%)	1.000
AZ	8 (100.0%)	8 (100.0%)	8 (100.0%)	8 (100.0%)	1.000
p-Valor	1.000	1.000	1.000	1.000	
Necrose pulpar radicular					
Salina	2 (25.0%)	4 (50.0%)	6 (75.0%)†	8 (100.0%)†	0.014
AZ	4 (50.0%)	4 (50.0%)	7 (88.0%)†	8 (100.0%)†	0.048
p-Valor	0.317	1.000	1.000	1.000	
Reabsorção óssea apical					
Salina	2 (25.0%)	4 (50.0%)	7 (88.0%)†	8 (100.0%)†	0.016
AZ	1 (13.0%)	2 (25.0%)	6 (75.0%)†	7 (88.0%)†	0.031
p-Valor	1.000	0.137	1.000	1.000	
Microabscesso					
Salina	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (50.0%)†	4 (50.0%)†	0.042
AZ	0 (0.0%)	1 (13.0%)	4 (50.0%)†	5 (63.0%)†	0.034
p-Valor	1.000	1.000	1.000	1.000	

†p<0,05 versus D7, Fisher's exact test or Pearson's chi-square test (n, %)

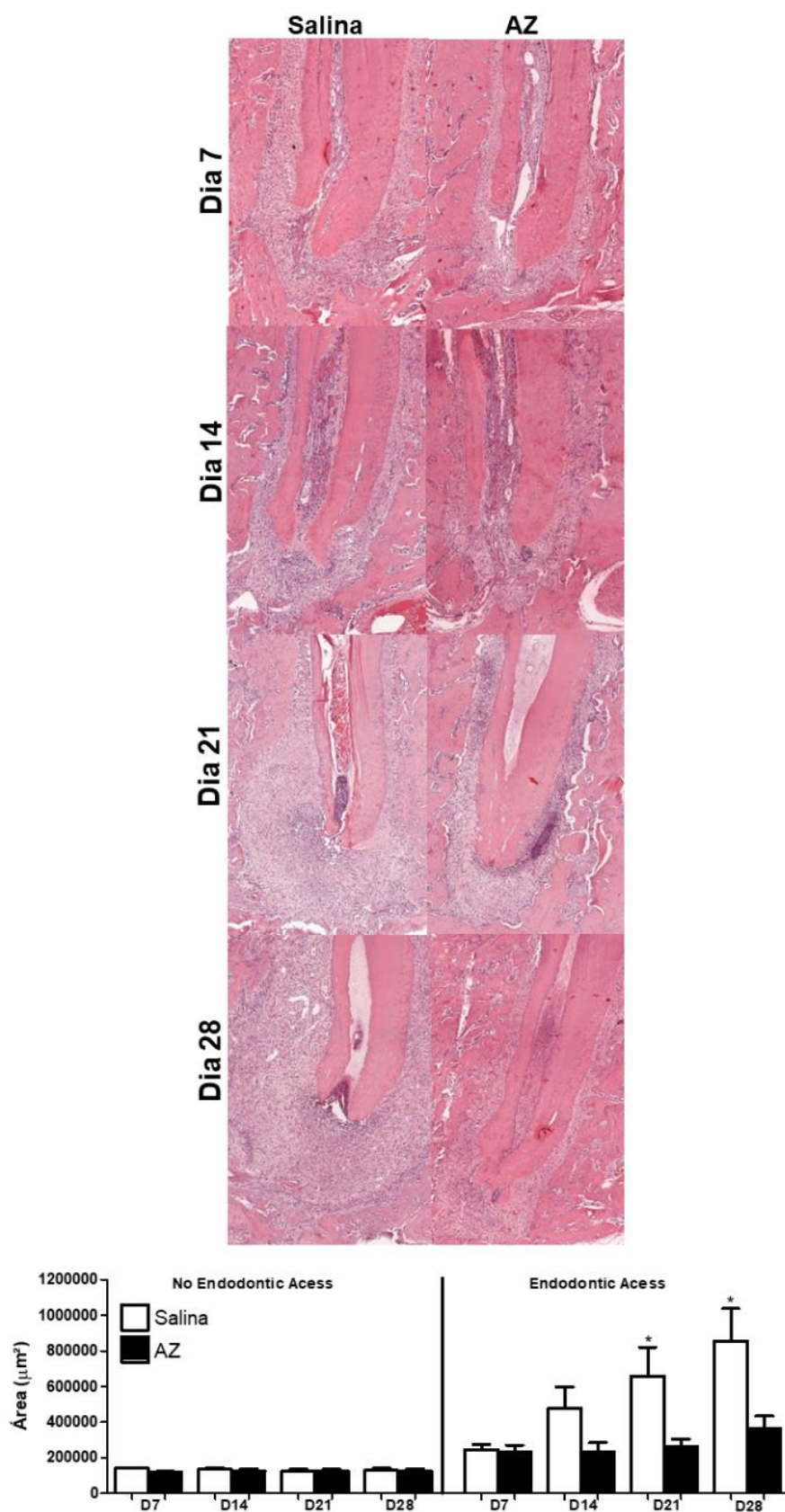


Figura 6. Aspectos histológicos das áreas da polpa radicular e lesão periapical e análise em relação à área da região apical das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior dos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico nos dias 7, 14, 21 e 28

após o acesso endodôntico. Coloração Hematoxilina-eosina 25x. * $p < 0,05$ versus controle no 21° e 28° dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM)

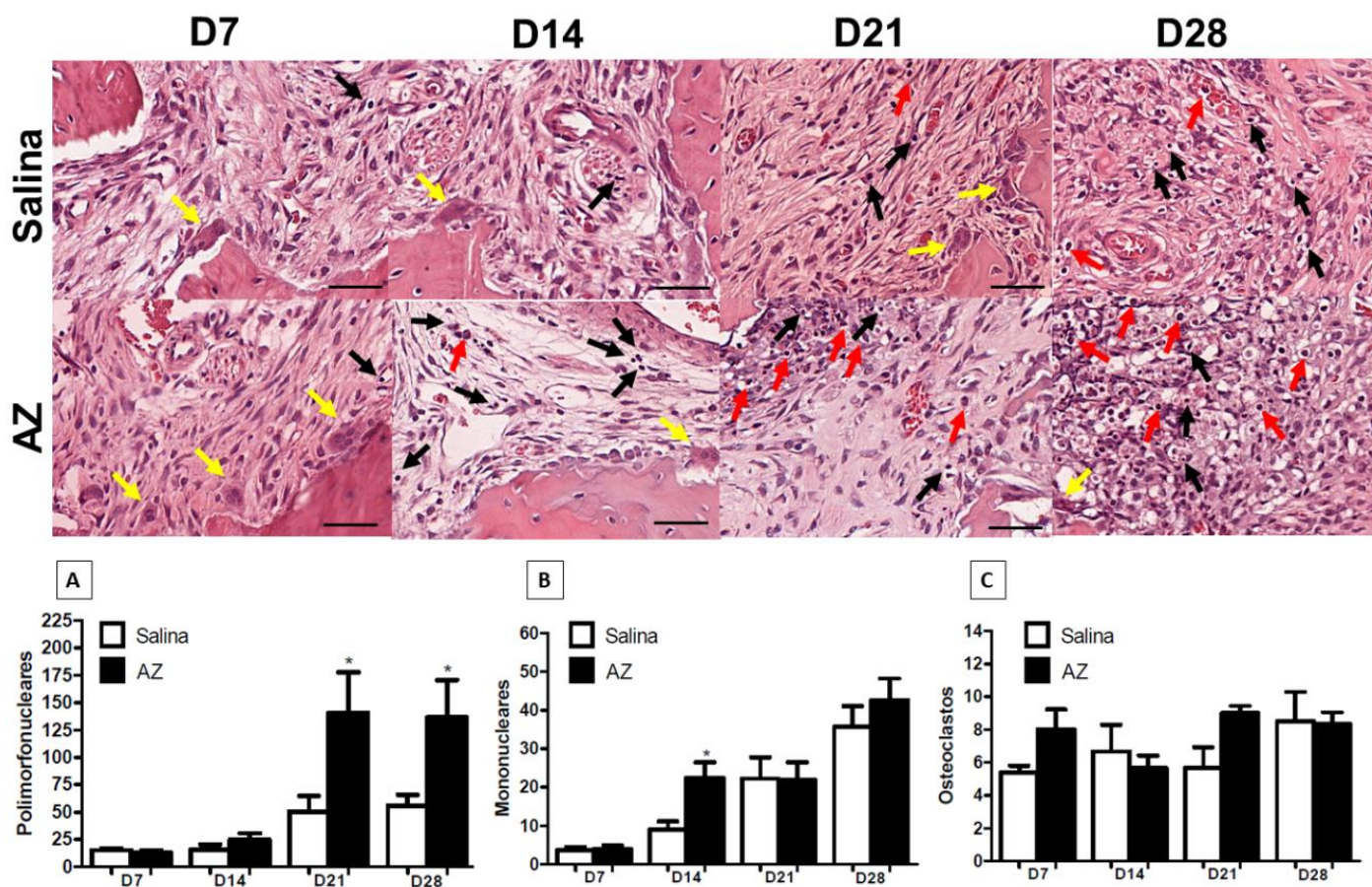


Figura 7. Fotomicrografias representativas da contagem de células inflamatórias e osteoclastos das áreas de lesão periapical após o 7, 14, 21 e 28 dias do acesso endodôntico em animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. Coloração Hematoxilina-eosina 400x. Análise da contagem de células inflamatórias do tipo polimorfonucleares (A), mononucleares (B) e osteoclastos (C) nos animais tratados com salina ou AZ e submetidos ao modelo experimental de lesão apical (abaixo). * $p < 0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM).

Legenda: Polimorfonucleares (seta vermelha), Mononucleares (seta preta) e osteoclastos (seta amarela).

5.3 Tratamento com AZ deprime a razão RANKL/OPG, como também aumenta a expressão de TNF- α e NF κ B, em ratos submetidos a acesso endodôntico experimental

Com relação à imunoexpressão de OPG, ela foi aumentada após sete (109.00 ± 21.15 vs 467.60 ± 41.39 , $P < 0.0001$), 14 (109.00 ± 21.15 vs 467.60 ± 41.39 , $p = 0.0018$), 21 (249.80 ± 37.75 vs 552.30 ± 55.72 , $p = 0.0004$) e 28 (248.80 ± 56.95 vs 521.00 ± 61.37 , $p = 0.0004$) dias no grupo AZ em relação ao grupo salina (Figura 8A). Esse aumento foi significativo no grupo salina a partir do 14° dia ($p = 0.0063$), em relação ao sétimo dia, e sem variação significativa no grupo AZ ($p = 0.7503$). Já a imunoexpressão de RANKL não mostrou diferença significativa após sete dias

do acesso endodôntico ($p=0.7862$), mas, após 14 (148.30 ± 6.41 vs 66.00 ± 11.63 , $p=0.0001$), 21 (49.33 ± 11.35 vs 10.50 ± 4.91 , $p=0.0175$) e 28 (43.00 ± 5.81 vs 1.67 ± 0.56 , $P<0.0001$) dias, ela foi maior no grupo salina que no grupo AZ (Figura 8B). Tanto no grupo salina ($p=0.00054$) como no grupo AZ ($p<0.0001$) essa imunexpressão começou a reduzir significativamente após 21 dias em relação ao sétimo dia.

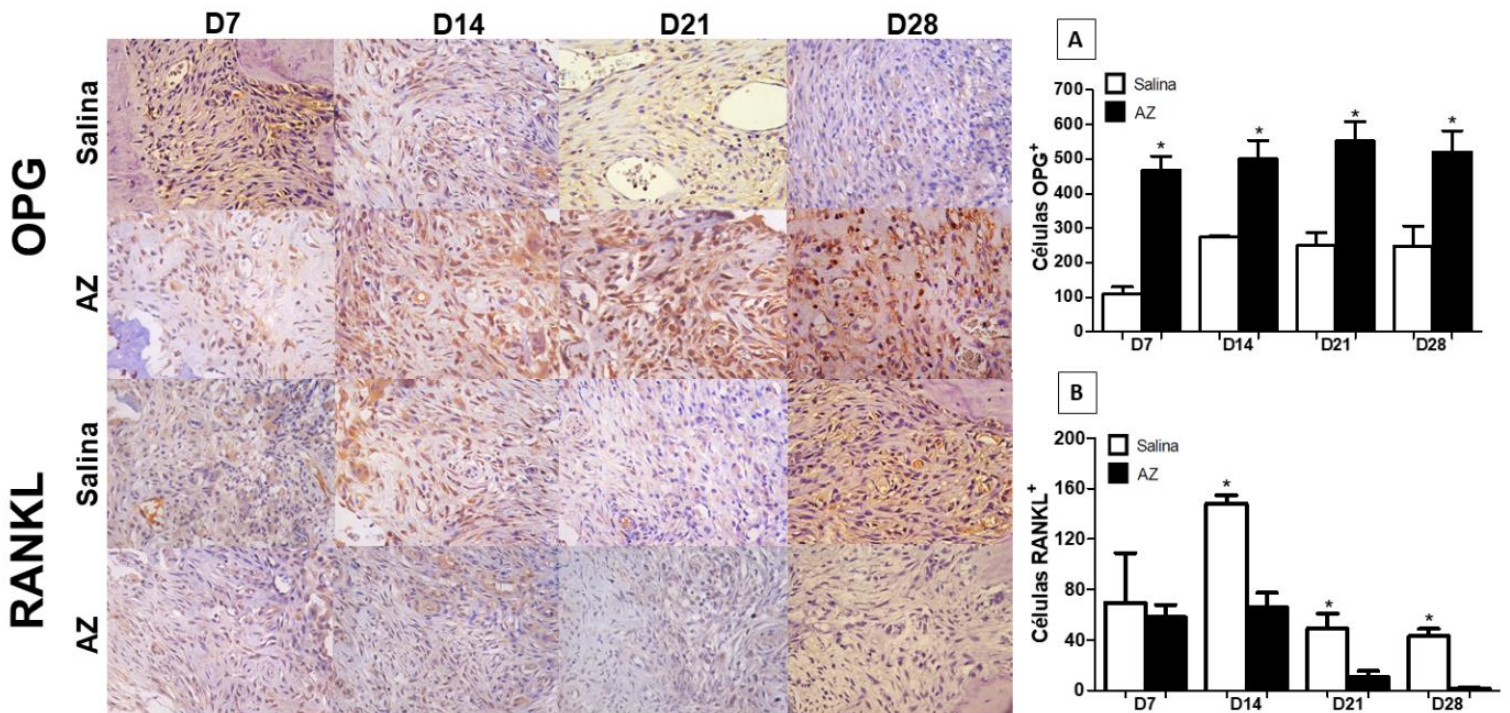


Figura 8. Imunomarcacão de OPG e RANKL das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. 400x (à esquerda). Contagem de células positivas para marcação de OPG (A) e RANKL (B) na região apical em animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. * $p<0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media \pm EPM).

A imunexpressão para NF κ B p65 não mostrou diferença significativa entre os grupos salina e AZ após sete ($p=0.0716$), 14 ($p=0.8391$) e 21 ($p=0.2201$) dias do acesso, mas, após 28 dias, o grupo AZ (286.00 ± 8.76) apresentou maior expressão que o grupo salina (116.00 ± 25.56 , $p=0.0003$). No grupo salina, o aumento ocorreu significativamente após o 21º dia, em relação ao sétimo dia, retornando aos valores basais após o 28º dia do acesso. Já no grupo AZ, o aumento ocorreu significativamente também após 21º dia, em relação ao sétimo dia, permanecendo esses valores elevados após 28º dia ($p<0.0001$) (Figura 9A). Já a imunexpressão de TNF- α não mostrou diferença significativa entre os grupos salina e AZ após sete ($p=0.0563$), 14 ($p=0.0984$) e 21 ($p=0.4412$) dias do acesso, mas, após 28 dias, o grupo AZ

(255.30±32.92) apresentou maior expressão que o grupo salina (124.00±41.57, $p=0.0373$) (Figura 9B). Tanto no grupo salina ($p=0.0160$) como no grupo AZ ($P<0.0001$) esse aumento ocorreu significativamente após o 21º dia em relação ao sétimo dia.

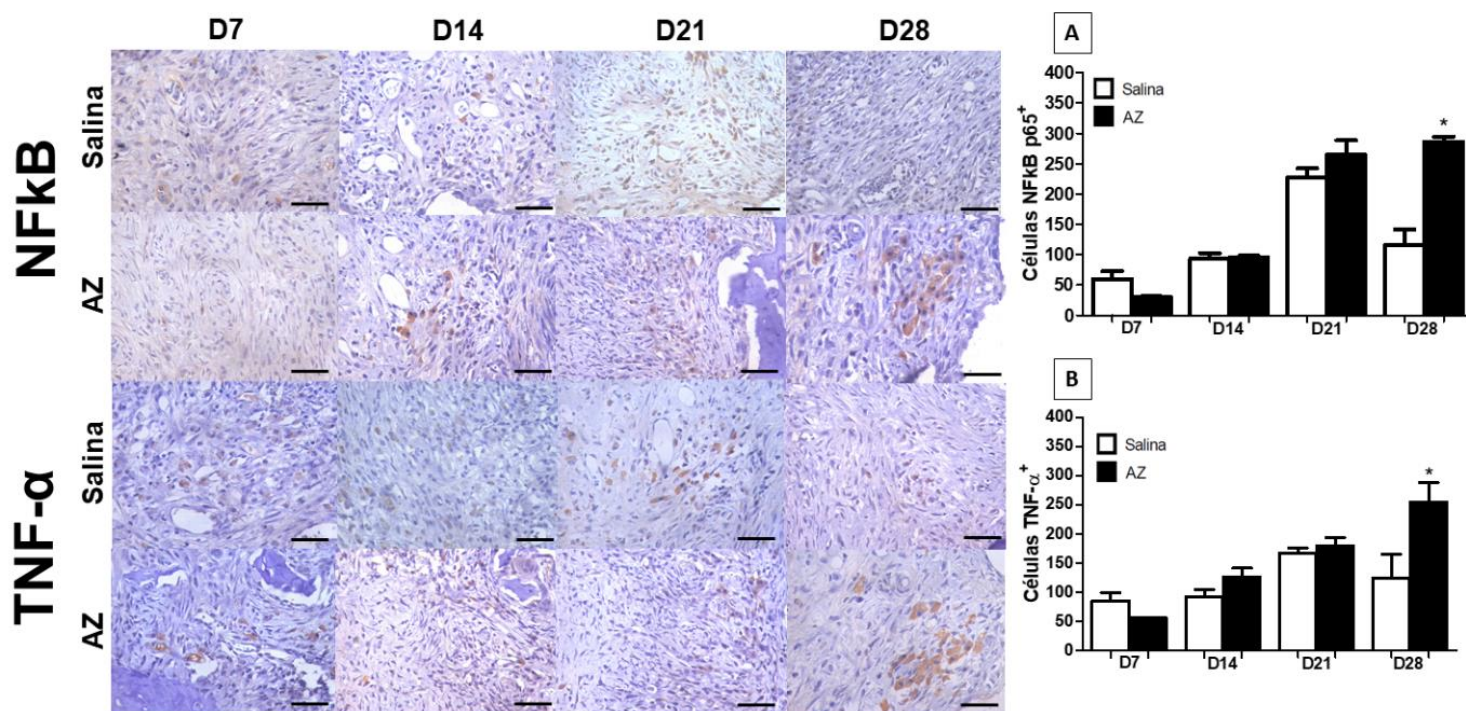


Figura 9. Imunomarcacão de NFkB p65 e TNF- α das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. 400x (a esquerda). Contagem de células positivas para marcao de NFkB (A) e TNF- α (B) na região apical de animais tratados com salina ou ácido zoledrônico. * $p<0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM).

5.4 Tratamento com AZ altera aspectos estruturais e químicos em ratos submetidos ao modelo de periodontite apical experimental

As imagens do MEV mostraram que, de forma geral, os animais tratados com ácido zoledrônico apresentaram um menor tamanho da lesão apical quando observadas as imagens do grupo salina em todos os períodos de tempo analisados. Também  possível observar um padrão menos trabecular, mostrando uma aparência óssea mais compacta nos animais tratados com AZ.

Foi visualizado um aspecto mais aprofundado nas áreas da lesão apical no grupo salina. Esse aspecto é bem evidenciado a partir do dia 21 após o acesso endodôntico, em contrapartida,

os animais tratados com bisfosfonatos apresentaram uma rarefação óssea mais superficial. Também foi possível observar um aspecto mais pronunciado de microfraturas/trincas no osso circunvizinho à lesão apical, como também redução dos espaços medulares, após 21 e 28 dias do acesso endodôntico no grupo tratado com AZ (Figura 10).

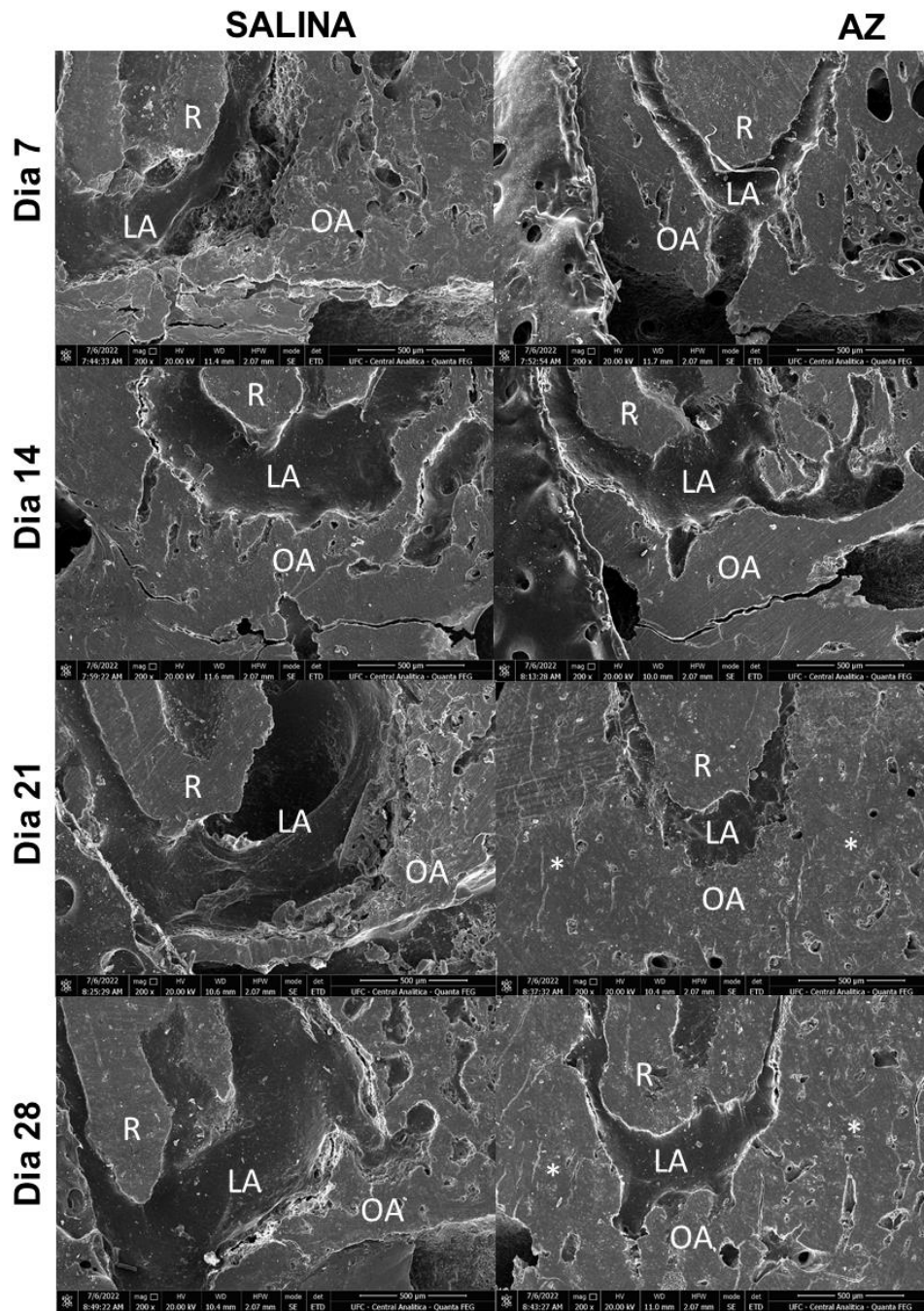


Figura 10. – Eletrofotomicrografia da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura na região apical de animais tratados com salina ou AZ após 7, 14, 21 e 28 dias do acesso endodôntico. MEV 200X.

Legenda: Raiz dentária (R), Lesão apical (LA) e Osso alveolar (AO), zonas de microfraturas/trincas (*).

Na avaliação composicional, foi visto que os valores médios de cálcio diminuem na área da lesão, em relação ao osso circunvizinho, tanto no grupo salina como no grupo AZ (Tabela 4). No entanto, no grupo AZ, há uma diminuição maior na área da lesão quando comparado ao grupo salina, porém, no osso adjacente, os valores de cálcio são maiores no grupo AZ que no grupo salina em todos os períodos observados (Tabela 4). Achados semelhantes são vistos em relação aos níveis de fósforo e oxigênio (Tabela 4).

Já em relação ao nitrogênio, os valores médios aumentam na área da lesão, em relação ao osso circunvizinho, tanto no grupo salina como no grupo AZ (Tabela 4). Esse aumento é um pouco mais pronunciado nas regiões da lesão apical no grupo AZ quando comparado ao grupo salina, todavia, este fenômeno se inverte na região do osso circunvizinho, onde se observa maiores níveis de nitrogênio no grupo salina. Esses mesmos achados também são observados quando avaliados os níveis de carbono (Tabela 4).

Tabela 4: Análise das quantidades relativas (%) dos átomos de cálcio, fósforo, oxigênio, nitrogênio e carbono da lesão apical e osso circunjacente em animais tratados com salina ou AZ e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.

	Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
	Lesão apical	Osso alveolar	Lesão apical	Osso alveolar	Lesão apical	Osso alveolar	Lesão apical	Osso alveolar
CÁLCIO (Ca)								
Salina	7.93%	19.65%	2.32%	25.98%	1.78%	23.67%	1.59%	18.35%
AZ	1.98%	20.83%	1.64 %	28.61%	1.23%	24.75%	0.84%	24.28%
FÓSFORO (P)								
Salina	3.97%	9.43%	0.95%	11.05%	0.64%	10.90%	0.89%	9.11%
AZ	1.09%	10.21%	1.10%	12.47%	1.15%	11.53%	0.45%	11.32%
OXIGÊNIO (O)								
Salina	37.69%	38.84%	30.56%	35.99%	32.80%	38.86%	32.39%	45.86%
AZ	34.52%	47.55%	31.18%	36.59%	26.44%	39.98%	29.83%	41.38%
NITROGÊNIO (N)								
Salina	15.06%	9.34%	19.79%	7.35%	18.41%	5.91%	18.25%	6.18%
AZ	16.96%	8.03%	19.84%	6.00%	21.77%	4.93%	21.52%	5.72%
CARBONO (C)								
Salina	34.55%	21.87%	46.39%	18.97%	45.79%	25.71%	45.99%	19.49%
AZ	44.61%	20.48%	45.05%	15.49%	47.80%	17.99%	46.67%	16.43%

Dados expressos em forma de média percentual.

6. DISCUSSÃO

O número de prescrições de bisfosfonatos é crescente a cada ano, com amplas indicações que vão desde à osteoporose a tratamentos oncológicos. O uso clínico disseminado se dá devido a sua capacidade antirreabsortiva, capaz de inibir a dissolução dos cristais de hidroxiapatita (RUSSELL *et al.*, 2008). Logo, doenças de envolvimento ósseo podem sofrer influência direta do uso dessa medicação, como é o caso de algumas doenças orais.

Atualmente, ainda há poucas evidências sobre o real impacto da administração dos BFs em diversas doenças orais, como a periodontite apical. Devido ao seu mecanismo de ação, esses fármacos podem influenciar diretamente tanto na biologia do desenvolvimento, no processo de reparo, no prognóstico como no tratamento da periodontite apical.

O presente estudo buscou investigar se o uso sistêmico de ácido zoledrônico pode influenciar no processo de desenvolvimento da periodontite apical, pois esta é de cunho infecto-inflamatório, associada à destruição óssea local, fatores estes influenciados com o uso de bisfosfonatos (XIONG *et al.*, 2010).

Vários estudos empregam o modelo de periodontite apical experimental induzida, feito a partir da exposição pulpar à microflora oral, levando à infecção (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Além disso, o fármaco, a dose e a sua via de administração adotada foram baseados nos conceitos utilizados no estudo de de Barros Silva *et al.* (2015) que utilizou dose e via de administração compatíveis com o uso clínico deste fármaco.

Não foram visualizadas lacunas de osteócitos vazias, bem como osso exposto ou sinais de osteonecrose dos maxilares nos períodos e dose avaliados. Corroborando com os achados deste trabalho, no estudo de França *et al.*, (2017), não foi observada a presença de osteonecrose, nem alterações morfológicas sugestivas da condição em ratos tratados com AZ com periodontite apical induzida após quatro e oito semanas. Achados semelhantes foram observados em animais tratados com alendronato na periodontite apical em ratas ovariectomizadas, onde não foi evidenciada osteonecrose (XIONG *et al.*, 2010). Em outro estudo, a periodontite apical experimental associada ao uso de AZ não causou diretamente a osteonecrose, mas exacerbou o quadro de necrose óssea após exodontias (SONG *et al.*, 2016).

A maioria dos procedimentos de extração dentária são resultados de doenças infecto-inflamatórias, como a periodontite e/ou a periodontite apical, que se tornaram irreparáveis.

Estas doenças inflamatórias preexistentes podem predispor e/ou exacerbar as áreas afetadas para desenvolvimento de ONMB mesmo antes da extração destes elementos dentários (CHEONG *et al.*, 2014).

Na maioria dos estudos em que há incidência de osteonecrose, apesar de baixa, quando comparado a estudos experimentais que utilizam a exodontia como fator precipitante da osteonecrose, a dose utilizada está bem acima do empregado neste estudo (não compatível com o uso clínico), assim como o período de avaliação é mais avançado (KANG *et al.*, 2013; WAYAMA *et al.*, 2015; PACHECO *et al.*, 2018). Sabe-se que a ocorrência de osteonecrose dos maxilares está diretamente relacionada ao fármaco, dose, tempo e fator precipitante (de BARROS SILVA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2016).

Portanto, as divergências quanto à prevalência de ONMB nos estudos podem ser explicadas pela variação da dose e tempo avaliado, como também pelo método de diagnóstico utilizado, em que muitas vezes só a presença de lacunas de osteócitos vazias é considerada, sem citar a presença ou não de osso exposto. Vale ressaltar também que este modelo não mimetizou traumas gerados por instrumentação e tratamento endodôntico, o que, talvez, pudesse influenciar na ocorrência de osteonecroses tardias, ou seja, após o período de tempo avaliado de 28 dias.

No modelo experimental do presente estudo, constatou-se que o tratamento com ácido zoledrônico altera o desenvolvimento da PA e levou a uma menor perda óssea periapical quando comparado ao grupo controle, como demonstrado nas avaliações imaginológicas e histológicas.

Xiong *et al.* (2010) avaliaram o efeito do tratamento com alendronato na periodontite apical em ratas ovariectomizadas, sendo observada uma perda óssea reduzida com 28 dias após a indução da lesão. Kang *et al.* (2013) mostraram que o ácido zoledrônico, em altas doses, o equivalente a um ano de tratamento, por via intraperitoneal, levou a uma diminuição no tamanho da lesão apical após oito semanas.

Wayama *et al.*, (2015) avaliaram o efeito do tratamento com ácido zoledrônico aplicado por quatro semanas em ratas ovariectomizadas na periodontite apical, sendo observada uma redução da perda óssea após 30 dias da indução da lesão. Outros estudos também mostraram que animais tratados com ácido zoledrônico apresentaram inibição da perda óssea apical experimentalmente induzida (FRANÇA *et al.*, 2017; PACHECO *et al.*, 2018).

A inibição da reabsorção radicular no grupo tratado com AZ pode ser explicada pela sua fácil incorporação no tecido mineralizado, como também pela sua disponibilidade por grandes períodos de tempo no tecido ósseo. Além disso, o fármaco atua diretamente nos osteoclastos, levando à inibição/apoptose dessas células e, indiretamente, em osteoblastos, estimulando-os (TROELTZSCH *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2015).

No presente trabalho, também foi observado um aumento da atividade inflamatória aguda a partir do 21º dia durante o desenvolvimento de lesões apicais em ratos submetidos a acesso endodôntico, tanto no grupo salina como no grupo AZ. Este aumento foi significativo no grupo tratado com ácido zoledrônico quando comparado ao grupo salina. Ainda foi evidenciado um aumento significativo de células mononucleares no grupo tratado com AZ no 14º dia após o acesso endodôntico.

Pacheco *et al.*, (2018) relataram intenso infiltrado inflamatório agudo em ratos tratados com AZ em altas doses após indução da periodontite apical experimental num período de oito semanas. Song *et al.*, (2016) mostraram intenso infiltrado inflamatório no ápice dental de animais tratados com AZ após 21 dias da indução da lesão apical.

De Barros Silva *et al.* (2015) relataram um aumento de células inflamatórias polimorfonucleares em ratos tratados com AZ após 28 dias de exodontia experimental. Outro estudo demonstrou um aumento no número de polimorfonucleares neutrófilos em ratos tratados com AZ submetidos à exodontia dentária (de BARROS SILVA *et al.*, 2016). Em outro trabalho, que utilizou um modelo de periodontite experimental, os ratos tratados com AZ também demonstraram aumento no número de células polimorfonucleares quando comparados ao grupo controle (de BARROS SILVA *et al.*, 2017).

O aumento do número de neutrófilos no local da lesão favorece o estresse oxidativo, devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio associadas à liberação de citocinas pró-inflamatórias, o que, conseqüentemente, propicia a ocorrência da necrose óssea a longo prazo.

Este estudo não mostrou diferença na contagem de osteoclastos entre os grupos salina e AZ em nenhum dia após o acesso endodôntico apesar de inibir a reabsorção óssea. Alguns trabalhos também não evidenciaram diferenças no número de células osteoclásticas após tratamento com BF na periodontite apical induzida (KANG *et al.*, 2013). Também não foi evidenciado o aumento dessa célula em mandíbulas de animais que receberam ácido zoledrônico sem nenhuma intervenção associada (MOLON *et al.*, 2014).

Anteriormente, já foi demonstrado que há redução do número de células osteoclásticas na região apical em animais que receberam alendronato, o que justificaria a redução da perda óssea no local (XIONG *et al.*, 2010).

Contudo, há divergências, na literatura, em relação a este achado. Song *et al.* (2016) relataram um aumento no número dessas células após tratamento com ácido zoledrônico no mesmo modelo. O aumento de células TRAP+/ osteoclásticas também já foi observado em um outro estudo experimental envolvendo bisfosfonatos e modelo de osteonecrose experimental induzido por exodontia (de BARROS SILVA *et al.*, 2016).

Essa variação de resultados pode ser explicada devido aos diferentes tipos de BFs avaliados, doses, via de administração, momento da avaliação, como também ao método empregado para análise. Essa elevação no número de osteoclastos parece estar relacionada à ocorrência de osteonecrose, o que não foi observado neste estudo.

Sabe-se que os bisfosfonatos inibem diretamente as células osteoclásticas, em contrapartida, o processo natural da patogênese da PA envolve o estímulo de mediadores pró-inflamatórios no local da doença. No presente estudo, foi visto ainda uma elevação de TNF- α e NFkB somente após 28 dias, estes mediadores também estimulam a reabsorção óssea a partir da proliferação de osteoclastos, portanto, talvez, em um período maior que 28 dias, um aumento do número de osteoclastos no sítio da lesão pudessem ser encontrados nos animais tratados com AZ.

Estudos anteriores, utilizando animais tratados com AZ em um modelo de osteonecrose associado à exodontias, relataram um aumento significativo da imunomarcagem para TNF- α e NFkB quando comparado ao grupo controle (de BARROS SILVA *et al.*, 2016). Em um estudo de periodontite experimental também foi observado o aumento de imunomarcagem para TNF- α e NFkB, bem como outros mediadores pró-inflamatórios, em animais tratados com ácido zoledrônico (de BARROS SILVA *et al.*, 2017). Sabe-se que a quimiotaxia de neutrófilos está associada a níveis elevados de mediadores inflamatórios, como IL-1 e o TNF- α , como também o aumento de neutrófilos contribuem para a elevação dos níveis de espécie de reativas de oxigênio, o que leva ao estímulo da migração de mais células inflamatórias (KUIPER JWP, FORSTER C, SUN C, *et al.*, 2012).

Nos animais tratados com AZ, a imunomarcagem para OPG mostrou-se elevada durante todos os períodos avaliados. Já os níveis de RANKL foram maiores no grupo salina após 14 dias da indução da lesão endodôntica.

Células periodontais tratadas com bisfosfonatos apresentaram maiores níveis de OPG e menores de RANKL (TIPTON, SESHUL, DABBOUS, 2011). Em um estudo que avaliou os níveis séricos plasmáticos de RANKL e OPG em pacientes com osteonecrose dos maxilares, foi observado que os níveis de RANKL eram menores e os de OPG foram mais altos nesses pacientes quando comparados ao controle saudável. Porém, esses valores não apresentaram diferenças significantes quando avaliado os diferentes estágios da osteonecrose dos maxilares (BAGAN *et al.*, 2017). Çankaya *et al.* (2013) relataram que ratos tratados cronicamente com zoledronato exibiram valores de RANKL reduzidos e níveis aumentados de OPG na região de mandíbula de ratos sem nenhum tipo de intervenção.

Su *et al.* (2015) observaram aumento nos níveis de OPG e redução de RANKL em animais tratados com AZ e dexametasona após a exodontia do primeiro molar. Outro estudo, que utilizou AZ de forma crônica por 14 semanas, em ratos submetidos à exodontia, mostrou uma redução da expressão de RANKL e da razão RANKL/OPG nos animais que desenvolveram osteonecrose ou não quando comparados ao grupo controle. Essa redução foi mais evidente nos animais que desenvolveram a osteonecrose (KIM *et al.*, 2016).

Em relação a análise microestrutural, observada por MEV, pode-se observar diferenças em relação à extensão e profundidade na região da lesão apical, como também achados semelhantes a microtrincas na região do osso circunvizinho de animais tratados com AZ. Também foram verificadas alterações na proporção de cálcio, fósforo, oxigênio, nitrogênio e carbono nas regiões no periápice dentário nos animais tratados com AZ e submetidos ao acesso endodôntico. A redução de cálcio na lesão apical, bem como o aumento de oxigênio e de fósforo no osso podem estar associados à retenção desses íons no osso em função da interrupção da reabsorção óssea promovida pelo ácido zoledrônico.

Kim *et al.*, (2016) avaliaram a presença de microtrincas através de MEV em amostras de ratos tratados com AZ submetidos à extração dentária, onde foi visto um aumento destes achados, tanto em animais que desenvolveram ou não a osteonecrose. Achado semelhante foi encontrado noutro estudo que avaliou amostras de osso de pacientes que fizeram uso de BF, sendo observado um aumento no número de fissuras como resultado ao uso destes

medicamentos, principalmente em pacientes que desenvolveram osteonecrose (HOEFERT *et al.*, 2009).

Essa alteração poderia estar relacionada a um favorecimento da contaminação bacteriana no local, predispondo a ocorrência de infecções, fístula e exposição óssea nos maxilares. Adicionalmente, a supressão da remodelação óssea causada pelo uso de BF poderia levar a um acúmulo de microdanos no tecido ósseo (HOEFERT *et al.*, 2010). Entretanto, a falta de estudos que avaliam os aspectos microestruturais e composicionais dos maxilares sob uso de bisfosfonatos não nos permite inferir maiores considerações.

Foi observado que não houve grandes variações composicionais em ratos tratados com AZ submetidos à fratura óssea de fêmur experimental, apesar de ser possível observar reduções dos níveis de cálcio e fósforo na região de fratura quando comparado com região não fraturada. No entanto, também foi visto um aumento da rigidez e diminuição da porosidade na área de cicatrização da fratura. Porém, o número reduzido de amostras foi uma grande limitação do estudo (PERDIKOURI, TÄGIL, ISAKSSON, 2015). Outros estudos, usando EDS ou outros métodos de medição, relataram níveis de composição mineral óssea de Ca (20-27%), P (10,5-12,5%) semelhantes aos encontrados neste estudo (AKESSON *et al.*, 1994).

O osso é um tecido com propriedades biomecânicas determinadas por sua estrutura e conteúdo orgânico/mineral, que, por sua vez, pode variar dependendo do local anatômico ou idade do tecido. Os bisfosfonatos, além de inibir os osteoclastos, retardar ou diminuir a reabsorção óssea, causam um aumento da mineralização tecidual média (BURR *et al.*, 2003). Aumentos na mineralização causam fragilidade ao tecido, o que o torna mais propenso a iniciar microfissuras e também reduz sua capacidade de absorção de energia, tornando-o mais propenso a fraturas. Alterações nas características minerais podem contribuir para uma melhor compreensão de doenças ósseas e, até mesmo, dos possíveis efeitos adversos do tratamento.

Os estudos existentes com bisfosfonatos associados à periodontite apical baseiam-se na avaliação da predisposição e ao risco de osteonecrose dos maxilares e não sua possível modificação da resposta inflamatória no desenvolvimento desta patogênese, como demonstrado no presente estudo. Não existe na literatura, até o presente momento, trabalhos que avaliem a progressão do desenvolvimento da lesão apical associado ao uso de bisfosfonatos, como o ácido zoledrônico. Limitações, como diferentes bisfosfonatos, doses, via de administração,

inviabilizam a comparação dos resultados oriundos destes estudos com diferentes metodologias.

Apesar dos BFs reduzirem a reabsorção óssea, vale ressaltar que estes alteram o perfil celular inflamatório e causam um desequilíbrio do eixo RANKL/OPG nas fases iniciais deste modelo, como elevação posterior de TNF- α e NFkB. Isto, a longo prazo ou aliado a fatores adicionais, pode predispor à ocorrência de osteonecrose.

Sendo assim, destaca-se a necessidade de estudos crônicos com períodos de avaliação maiores e traumas adicionais, como irrigação e instrumentação endodôntica, e que investiguem outros mediadores inflamatórios associados à osteonecrose dos maxilares.

7. CONCLUSÃO

O ácido zoledrônico utilizado de forma sistêmica alterou o desenvolvimento da periodontite apical experimental induzida em ratos.

Nenhum animal apresentou aspectos compatíveis com a osteonecrose dos maxilares. O tratamento com AZ levou a uma redução da reabsorção óssea periapical induzida. Também elevou o influxo de PMN após 21 e 28 dias, e de MN após 14 dias, bem como desregulou o eixo RANL/OPG em todos os períodos de tempo avaliados, como elevação tardia, após 28 dias, de TNF- α e NF κ B. Ademais, o uso de BF parece alterar a estrutura óssea pelo aumento de microtrincas, diminuição dos espaços medulares e alteração da sua composição.

REFERÊNCIAS

- AKESSON, K. et al. Energy-dispersive X-ray microanalysis of the bone mineral content in human trabecular bone: a comparison with ICPEs and neutron activation analysis. **Calcif Tissue Int**, v.55, p.236–239, 1994.
- ANDRADE, T. A. *et al.* The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, n.10, p.1036–1047, out. 2011.
- ANTONI, C. C. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw, osteoradionecrosis, and osteomyelitis: a comparative histopathological study. **Brazilian Oral Research**, v. 32, 3 maio 2018.
- BAGAN, L. *et al.* Serum levels of RANKL and OPG, and the RANKL/OPG ratio in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: are they useful biomarkers for the advanced stages of osteonecrosis?. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, 2017.
- BEHARI, J.; BEHARI, J. Changes in bone histology due to capacitive electric field stimulation of ovariectomized rat. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 130, n. 6, p. 720-725, dez. 2009.
- BELIBASAKIS, G. N.; RECHENBERG, D. K.; ZEHNDER, M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. **International Endodontic Journal**, v.46, p.99 – 111, ago. 2012.
- BETTES, P. S. L. **Análise comparativa histológica e tensiométrica entre a cicatrização de feridas cutâneas tratadas com o adesivo octil-2-cianoacrilato e com sutura intradérmica em ratos.** 2003. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BEURDEN, A. *et al.* Periodic acid Schiff loops and blood lakes associated with metastasis in cutaneous melanoma. **Melanoma Research**, v. 22, n. 6, p. 424-429, dez. 2012.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n.2, p.139-146, maio 2008.
- BRIZENO, L. A. C. **Avaliação da cicatrização em modelo de úlcera em mucosa oral de ratos portadores de diabetes mellitus induzida por aloxano.** 2013. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- BURR, D. B. et al. Tissue mineralization is increased following 1-year treatment with high doses of bisphosphonates in dogs. **Bone**, v. 33, n.6, 960–969, 2003.

CHEONG, S. *et al.* Bisphosphonate Uptake in Areas of Tooth Extraction or Periapical Disease. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 12, p. 2461 – 2468, dez. 2014.

CINTRA, L. T. A. *et al.* Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. **International Endodontic Journal**, v.47, p.228 – 37, ago. 2014.

CREMERS, S. *et al.* Pharmacology of bisphosphonates. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 1052-1062, 28 fev. 2019.

ÇANKAYA, M. *et al.* The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 9, p. 1134-1139, set. 2013.

DE BARROS SILVA, P. G. *et al.* Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n.9, p. 1237 – 1245, set. 2015.

DE BARROS SILVA, P. G. *et al.* Chronic treatment with zoledronic acid increases inflammatory markers in periodontium of rats. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 20 set. 2017.

DE BARROS SILVA, P. G. *et al.* Immune cell profile of dental pulp tissue treated with zoledronic acid. **International Endodontic Journal**, v. 50, n.11, p.1067-1076, nov. 2017.

DO NASCIMENTO, I. V. *et al.* Chronic systemic corticosteroid therapy influences the development of pulp necrosis and experimental apical periodontitis, exacerbating the inflammatory process and bone resorption in rats. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 6, p. 646-659, 15 abr. 2022

FRANÇA, T. R. T. *et al.* Effects of Zoledronic Acid in Experimental Periapical Lesions in Rats: an imaging and histological analysis. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 5, p. 566-572, set. 2017.

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. **Journal of Oral Maxillofacial Research**, v. 2, jan. 2014.

HOEFERT, S. *et al.* Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, n. 3, p. 271-284, 18 jun. 2009.

HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **Journal of Molecular Medicine**, v.79, p.243 – 53, ago. 2001.

- HOFF, A. *et al.* Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 23, n.6, p. 826–836, jun. 2008.
- JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 264-271, jun. 2013.
- JOBKE, B. *et al.* Bisphosphonate-osteoclasts: changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. **Bone**, v. 59, p. 37-43, fev. 2014.
- JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.
- KANG, B. *et al.* Periapical Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 7, p. 1631 – 1640, jul. 2013.
- KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 5, n. 11, p. 898-907, nov. 2017.
- KIM, J. W. *et al.* Biomarkers for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 18, n. 2, p. 281–291, 2016.
- KIM, J. W., *et al.* Role of microcracks in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Clinical oral investigations**, v. 20, n. 8, 2251–2258, 2016.
- KIMACHI, K. *et al.* Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.383, p.297 – 308, jan. 2011.
- KONDO, T. *et al.* Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.103, n.1, p.335 – 45, jan. 2008.
- KRIMMEL, M. *et al.* Does dental and oral health influence the development and course of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ)? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 18, n.2, p. 213 – 218, jun. 2014.
- 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.532–9, jan. 2012.
- LIU, L. *et al.* The expression of MCP-1 and CCR2 in induced rats periapical lesions. **Archives of Oral Biology**, v.59, p.492 – 9, mar. 2014.
- MARTINS, C.A. *et al.* Effects of Alendronate on Osteoclast Formation and Activity In Vitro. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 1, p. 45-49, jan. 2015.
- MATSUI, H. *et al.* Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. **International Endodontic Journal**, v.44, n.8, p.739 – 45, ago. 2011.

MEYER-HOFFERT, U; WIEDOW, O. Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. **Current Opinion in Hematology**, v. 18, n.1, p. 19-24, jan. 2011.

MOLON, R. S. de *et al.* Spontaneous Osteonecrosis of the Jaws in the Maxilla of Mice on Antiresorptive Treatment: A Novel ONJ Mouse Model. **Bone**, v.68, p.11-19, nov. 2014.

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

NORTON, J. T. *et al.* Cutting Edge: nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. **Journal of Immunology**, v.188, n.7, p.2977–80, abr. 2012.

OLIVEIRA, C. M. B. de *et al.* Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n.2, p.255 –265, 2011.

PACHECO, V. N. *et al.* Nitrogen-containing bisphosphonate therapy-Part II: assessment of alveolar bone tissue inflammatory response in rats-a blind randomized controlled trial. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 99, n. 5, p. 258-263, out. 2018.

PERDIKOURI, C., TÄGIL, M., & ISAKSSON, H. Characterizing the composition of bone formed during fracture healing using scanning electron microscopy techniques. **Calcified tissue international**, v.96, n.1, 11–17, 2015.

POPA, C., *et al.* The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **The Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 751-762, 2007.

PRIETO, A. K. C. **Metabolismo oxidativo sérico em ratos diabéticos com lesão periapical**. 2014. Dissertação (Mestrado em Endodontia) — Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

RAHDE, N. D. M. **Efeitos dos bisfosfonatos nitrogenados sobre o osso alveolar**. 2010. Tese (Doutorado em Estomatologia) — Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

ROSSINI, M., *et al.* Circulating $\gamma\delta$ T cells and the risk of acute-phase response after zoledronic acid administration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.27, n.1, p.227–30, jan. 2012.

RUSSELL, R. G. G. *et al.* Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 6, p. 733-759, 24 jan. 2008.

SHELLER, E. L. *et al.* Zoledronic acid inhibits macrophage SOCS3 expression and enhances cytokine production. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.112, n.11, p.3364–72, nov. 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.667–76, mar. 2009.

SILVA, T. A. *et al.* Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v.86, p.306 – 19, mar. 2007.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v.18, p.267 – 80, fev. 2008.

SODEK J, MCKEE ME. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology**, v. 24, p.99-126, 2000.

SONG, M. *et al.* Preexisting Periapical Inflammatory Condition Exacerbates Tooth Extraction–induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw Lesions in Mice. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 11, p. 1641 – 1646, nov. 2016.

STASHENKO, P. *et al.* Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v.78, p.494 – 502, out. 1994.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D’SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 9, n. 4, p.498 – 521, nov. 1998.

SU, J. *et al.* The effects of bisphosphonate on the remodeling of different irregular bones in mice. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 44, n. 8, p. 638-648, 5 nov. 2014.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **International Endodontic Journal**, v.31, p.311 – 25, nov. 1998.

TIBÚRCIO-MACHADO, C. S. *et al.* The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, 54(5), 712–735, 2021.

TIMM, L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231 - 239, 2005.

TIPTON, D. A.; SESHUL, B. A.; DABBOUS, M. K. Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 1, p. 39-47, 5 jan. 2011.

TROELTZSCH, M. *et al.* Root Resorption Caused by Jaw Infiltration of Multiple Myeloma: report of a case and literature review. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 8, p. 1260-1264, ago. 2014.

WANG, C. Y.; STASHENKO, P. Kinetics of bone-resorbing activity in induced periapical lesions. **Journal Dental Research**, v.70, p.1362- 1366, set. 1991.

WANG, L.; PENG, B. Correlation between platelet-derived growth factor B chain and bone resorption in rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.33, p.709 – 11, maio 2007.

WAYAMA, M. T. *et al.* Diminished Progression of Periapical Lesions with Zoledronic Acid in Ovariectomized Rats. **Journal of Endodontics**, v.41, n.12, p.2002-2007, dez. 2015.

WELTON, J. L. *et al.* Monocytes and cd T cells control the acute-phase response to intravenous zoledronate: insights from a phase IV safety trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.28, p.464–71, 2013.

XIONG, H. *et al.* Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v.43, n.6, p.485-91, jun. 2010.

XIONG, H.; WEI, L.; PENG, B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.35, p.216 – 20, jan. 2009.

ZHANG, Y. H. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.563 – 8, out. 2000.

ANEXO



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA PERIODONTITE APICAL EXPERIMENTAL EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 2387310818 (000004), sob a responsabilidade de **Mário Rogério Lima Mota** e equipe: **ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO**; **JOSÉ RONILDO LINS DO CARMO FILHO**; **MARIA IMACULADA DE QUEIROZ RODRIGUES** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 16/10/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF CHRONIC SYSTEMIC THERAPY WITH ZOLEDRONIC ACID IN EXPERIMENTAL APICAL PERIODONTITIS IN RATS", utilizing 128 Heterogenics rats (128 males), protocol number CEUA 2387310818 (000004), under the responsibility of **Mário Rogério Lima Mota** and team; **ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO**; **JOSÉ RONILDO LINS DO CARMO FILHO**; **MARIA IMACULADA DE QUEIROZ RODRIGUES** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 10/16/2018.

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

Vigência da Proposta: de 10/2018 a 07/2019

Área: **Departamento de Clínica Odontológica**

Origem: **Biotério Setorial da FAMED**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 6 semanas**

N: **128**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Local do experimento: **Biotério setorial da FAMED e Laboratório multidisciplinar da faculdade de odontologia da UFC**

Fortaleza, 16 de outubro de 2018

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

Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará