



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

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEXAMETASONA E DA NIMESULIDA NA
QUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

FORTALEZA

2015

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEXAMETASONA E DA NIMESULIDA NA
QUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- O46a Oliveira, Camila Carvalho de.
Avaliação do efeito da dexametasona e da nimesulida na quimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico em ratos./ Camila Carvalho de Oliveira. – 2015.
118 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Departamento de Odontologia; Programa de Pós-Graduação em Odontologia; Mestrado em Odontologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Clínica Odontológica.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Bisfosfonatos. 2. Dexametasona. 3. Anti-Inflamatórios. I. Título.

CDD 616.632

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEXAMETASONA E DA NIMESULIDA NA
QUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Wagner Vasconcelos Freire Filho

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus, pela fé, força e coragem nessa caminhada.

Aos meus pais, Dulce e Joaquim, por ensinarem o valor da educação e do conhecimento.

AGRADECIMENTO

A **Deus**, por ser fonte inesgotável de força e inspiração. Por ser guia, luz e esperança; por ser motivação em seguir o caminho da bondade e da fé.

A meus pais, **Dulce e Joaquim**, pela dedicação, apoio, paciência e incentivo em todas as etapas de minha vida e, principalmente, por acreditarem e investirem em mim.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo, alegrias e aprendizados partilhados. Principalmente, à gêmea, **Milena**, por me ensinar, nas semelhanças e diferenças, a dividir uma vida.

A **Anderson Chagas**, meu namorado, que, de forma especial e carinhosa, foi compreensivo e paciente. Obrigada por ser meu porto seguro.

Aos amigos **Manuela, Jéssica, Lana, Caio, Adriano, Paulo, Lidiane, Bruna, Danielle, Danieli e Juliana** por serem incentivadores dessa conquista, por perdoarem a ausência de diversos momentos e por, mesmo assim, serem firmes nessa amizade.

À minha orientadora, **Professora Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, exemplo de profissional dedicada, a quem nutro profunda admiração pessoal e que é inspiração de docente e cirurgiã-dentista. Obrigada pela disponibilidade, dedicação e incentivo. Serei sempre grata pelo crescimento científico e pelas lições éticas, morais e pessoais transmitidas. E ficarão sempre na memória os sorrisos, a amizade e os momentos de descontração.

Ao **Professor Mário Rogério Lima Mota**, por, além de exercer sua prática docente com maestria, ser tão disponível, humano e estar sempre disposto a ajudar e dirimir as dúvidas mais inusitadas, transmitindo a enorme gama de conhecimentos que tem com muita empolgação.

Ao **Professor Fabrício Bitu Sousa**, pela vivência e os ensinamentos clínicos e laboratoriais, pelo exemplo de profissional humano e por me ensinar a ter visão crítica ponderada sobre as questões científicas.

Ao **Professor Ronaldo de Albuquerque**, por investir com confiança nessa linha de pesquisa experimental, pela disponibilidade em nos direcionar e pelo vínculo formado com o Laboratório de Patologia Bucodental.

À minha turma de mestrado, **Alexssandra, Ana Laryssa, Cristina, Erasmo, Érico, Haniery, Kátia, Nadine, Nara, Rômulo**, por partilhar aprendizados, disciplinas e momentos bons em meio à vida corrida. Eu jamais poderia pensar que formaríamos a melhor turma de mestrado desse Programa de Pós-graduação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Bucodental **Ana Laryssa, Artur, Breno, Carol, Clarissa, Mariana, Ealber, Erasmo, Filipe, Malena, Mariana Canuto, Thales, Thâmara** pela amizade, companhia e troca de experiências.

Aos meus amigos de fé, irmãos camaradas, **Paulo Goberlânio e Ernando**, por compartilharem todos os momentos de execução dessa pesquisa, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação, pela doação e pela amizade forte.

À amiga **Mariana Araújo**, pela amizade e parceria inabaláveis, pelo companheirismo, pelo exemplo de simplicidade e maturidade e por nunca medir esforços para me estender a mão.

Ao aluno de pós-graduação **André Brizeno**, por toda a ajuda, o aprendizado em patologia e por ser exemplo de que não há limites para o conhecimento.

Aos alunos de iniciação científica **Elisa, Gisele, Amanda, Tasso, Joyce e Lirya** pela equipe que formamos para execução de todas as pesquisas. Agradeço por todo o esforço e abdicção de atividades pessoais e, principalmente, por terem se tornado grandes amigos, que transformaram momentos tensos em momentos de alegria e de boas lembranças.

Aos integrantes do **Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)** e **monitores de Patologia Bucal** pelas experiências e aprendizados compartilhados e pela confiança nas minhas condutas.

Ao **Professor Fábio Wildson**, pela disponibilidade em ajudar sempre e me incentivar durante essa caminhada. Obrigada pelo ser humano, forte, inteligente e humilde, o que nos faz aprendizes sempre.

Aos **Professores Ricardo Martins, Mônica Studart, Andréa Aguiar, Thyciana Ribeiro e Haroldo Beltrão** pela admiração e pela inspiração em me tornar docentes dedicados e engajados como vocês.

Ao **Professor Perboyre Castelo** por ceder gentilmente acesso à radiografia periapical digital.

Ao **Laboratório de Hematologia** do Curso de Farmácia pela disponibilidade na realização dos exames hematológicos.

Ao **Laboratório de Oncologia Experimental** pelo apoio físico-estrutural para o desenvolvimento desse estudo.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFC, Clínica de Estomatologia e Laboratório de Patologia Bucodental** por serem fundamentais ao meu crescimento científico e profissional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

RESUMO

Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB) não possui fisiopatologia definida, porém tem sido associada a eventos pró-inflamatórios. Dexametasona (DEX) e nimesulida (NIM), anti-inflamatórios (AIs) esteroideal e não-esteroideal, respectivamente, reduzem mediadores da inflamação. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dexametasona e da nimesulida na quimioneecrose no osso mandibular associada ao ácido zoledrônico (AZ) em ratos. OMB foi induzida em ratos Wistar (n=40) por administração de AZ e exodontia do primeiro molar inferior (grupos OMB). Foram administradas, por gavagem, DEX (0,04; 0,4 e 4 mg/kg) ou salina 24 h, ou NIM (10,3 mg/kg) 24 e 12 h antes de cada infusão de AZ, por oito semanas. Grupos Controles (n=40) receberam apenas tratamento com AIs ou salina. Foram realizadas análises da variação de massa corpórea (VMC) e hematológica semanalmente. Tempo cirúrgico e número de fraturas radiculares foram medidos para avaliar a dificuldade de exodontia. Após o sacrifício (dia 70), mandíbulas e órgãos foram excisados. Com as mandíbulas, foram feitas radiografias digitais para mensuração da área radiolúcida sugestiva de necrose e, posteriormente, lâminas histológicas (hematoxilina-eosina) para análise histomorfométrica. Rim, fígado, baço e estômago foram pesados, para expressar o índice do órgão, e submetidos a processamento histológico para análise histopatológica. O grupo OMB DEX 4 mg/kg apresentou tempo cirúrgico superior em relação ao salina. Na análise radiográfica, houve maior área radiolúcida nos grupos OMB em relação aos controles ($p < 0,05$). A análise histomorfométrica revelou osso desvitalizado, com lacunas de osteócitos vazias, osteoclastos apoptóticos, colônias bacterianas e infiltrado inflamatório nos animais que receberam AZ, enquanto que, nos controles, foi visto osso cicatricial e neoformado. Os grupos OMB-DEX 0,4 e 4 mg/kg apresentaram maior número de colônias bacterianas e polimorfonucleares neutrófilos quando comparado ao salina-OMB ($p < 0,05$). Já no grupo OMB-Nimesulida foi visto menos infiltrado inflamatório neurofílico ($p < 0,05$). A análise hematológica revelou que grupos OMB apresentaram alterações sugestivas de anemia, associada à leucocitose, que foi reduzida com o tratamento com DEX. A análise da VMC revelou menor peso de ratos OMB tratados com AIs em relação aos controles no dia 13 ($p < 0,05$). Os tratamentos com DEX 4 mg/kg e NIM, associados ou não ao AZ, pareceram causar maiores danos em estômago e fígado. No rim, o tratamento com AIs em animais submetidos à OMB foram observados numerosos cilindros-hialinos, e no baço, a DEX causou atrofia da polpa branca, associado à redução do índice esplênico. Assim, os

tratamentos com AIs não pareceram ser eficazes em prevenir a OMB. A infusão de AZ foi relacionada à ocorrência de anemia, leucocitose e perda de peso no 13º dia.

Palavras-chave: Osteonecrose associada a bisfosfonatos. Dexametasona. Anti-inflamatórios.

ABSTRACT

Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw (OMB) has no defined pathophysiology, but has been linked to proinflammatory events. Dexamethasone (DEX) and nimesulide (NIM), steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents (AIs), respectively, reduce inflammation mediators. The aim of this study was to evaluate the effect of dexamethasone and nimesulide in the chemonecrosis on jawbone associated with zoledronic acid (AZ) in rats. OMB was induced in male Wistar rats (n=40) by AZ administration and by extraction of the first left molar (OMB groups). DEX (0.04, 0.4, 4 mg/kg) or saline was administered, by gavage, 24 h, or NIM (10.3 mg/kg), 24 h and 12 h before each infusion of ZA, for eight weeks. Controls groups (n=40) received just treatment with AIs or saline. The body mass variation and hematological analyses were conducted weekly. Surgical time and number of fractured roots were measured to assess the difficulty of dental extraction. After the sacrifice (day 70), jaws and organs were excised. Digital x-rays of the jaws were made to measure the suggestive radiolucent area of necrosis and, later, histological slides were made (hematoxylin-eosin) to histomorphometric analysis. Kidney, liver, spleen and stomach were weighed, to express the organ index, and, after, these were submitted to histological processing for histopathological analysis. The group OMB DEX 4 mg/kg presented higher surgical time compared to saline. Radiographic analysis showed higher radiolucent area in the OMB groups compared to controls ($p < 0.05$). Histomorphometric analysis revealed devitalized bone with of empty osteocytes lacunae, apoptotic osteoclasts, bacterial colonies and inflammatory infiltrate in the animals from AZ, whereas in the control animals, was visualized healing and new bone formation. The OMB DEX 0.4 and 4 mg/kg groups had the greatest number of bacterial colonies ($p < 0.05$) and neutrophils when they were compared with the saline-OMB. Already on the OMB-Nimesulide group was seen less inflammatory infiltrate ($p < 0.05$). The OMB groups showed anemia associated with leukocytosis, which was reduced by DEX administration. VMC analysis revealed lower weight of rats OMB treated with AIs compared to controls on day 13 ($p < 0.05$). Treatments with DEX 4 mg/kg and NIM, associated or not to AZ, seemed cause worse damage in the stomach and liver. In the kidney, treatment with AI in OMB animals was observed numerous hyaline-cylinders. In the spleen, DEX caused atrophy of the white pulp, associated with splenic index. Thus, treatment with AIs was not effective in prevention OMB. AZ infusion was associated with the occurrence of anemia, leukocytosis, and weight loss in 13 days.

Keywords: Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw. Dexamethasone. Anti-Inflammatory Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura química geral dos bisfosfonatos.....	20
Figura 2 –	Mecanismo de ação dos bisfosfonatos.....	22
Figura 3 –	Inibição da via do mevalonato por aminobisfosfonatos.....	23
Figura 4 –	Protocolo experimental simplificado.....	41
Figura 5 –	Análise da dificuldade cirúrgica.....	50
Figura 6 –	Área radiolúcida, em pixels, presente no sítio de exodontia dos grupos controles e grupos OMB tratados com dexametasona ou nimesulida no dia 70.....	51
Figura 7 –	Aspectos radiográficos do sítio de exodontia dos animais controle e submetidos à osteonecrose tratados com diferentes regimes de anti-inflamatórios.....	52
Figura 8 –	Análise histomorfométrica do sítio de exodontia de ratos controles e submetidos à OMB.....	55
Figura 9 –	Aspectos histológicos do sítio de exodontia em animais OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes.....	56
Figura 10 –	Avaliação da variação de massa corpórea de animais submetidos à OMB e/ou tratados com anti-inflamatórios controles correspondentes.....	66
Figura 11 –	Índices dos órgãos dos animais controle e OMB.....	68
Figura 12 –	Fotomicrografia do estômago de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes.....	71
Figura 13 –	Fotomicrografia do fígado de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes.....	74
Figura 14 –	Fotomicrografia do rim de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes.....	77
Figura 15 –	Fotomicrografia do baço de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área sob a curva de parâmetros hematológicos dos grupos controles e OMB	63
Tabela 2 – Parâmetros de análise toxicológica gástrica.....	70
Tabela 3 – Parâmetros de análise toxicológica hepática.....	73
Tabela 4 – Parâmetros de análise toxicológica renal.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADAMTS-13	Do inglês, <i>A Desintegrin And Metalloprotease with eight Thrombo Spondin-1-like</i>
AINEs	Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclica
AP-1	Proteína Ativadora-1
APAF-1	Fator de Ativação de Protease Apoptótica-1
ATP	Adenosina Trifosfato
AZ	Ácido Zoledrônico
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico básico
BFs	Bisfosfonatos
CBG	Globulinas de ligação a corticoides
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COX	Ciclo-oxigenase
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
C57BL6	C57Black6
DEX	Dexametasona
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
eNOS	Óxido Nítrico Sintetase endotelial
EPM	Erro Padrão Médio
EV	Endovenosa
FPP	Farnesil Pirofosfatase
GCs	Glicocorticoides
GGPP	Geranil Pirofosfatase
GMPc	Guanosina Monofosfato cíclico

GREs	Elementos Responsivos aos Glicocorticoides
GTP	Guanosina Trifosfato
HSP	Proteína de choque térmico
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzida
I κ B	Inibidor de κ B
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
NF κ B	Fator Nuclear κ B
NIM	Nimesulida
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
OMB	Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos
OPG	Osteoprotegerina
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio-1
PGI ₂	Prostaciclina ou Prostaglandina I ₂
PGs	Prostaglandinas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-hidroxiquinase
PTPs	Proteínas Tirosina Fosfatases
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B
RDW	Índice de anisocitose
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula de adesão vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Bisfosfonatos	21
2.2 Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB)	26
2.3. Anti-inflamatórios	31
2.3.1 Glicocorticoides	31
2.3.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)	35
3 JUSTIFICATIVA	38
4 OBJETIVOS	39
4.1 Geral	39
4.2 Específicos	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 Animais	40
5.2 Modelo de Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos	40
5.3 Protocolo de tratamento com anti-inflamatórios (Dexametasona e Nimesulida) ...	41
5.4 Grupos Experimentais	42
5.4.1 Grupos Controle	42
5.4.2 Grupos OMB	43
5.5 Análise da Dificuldade Cirúrgica	44
5.6 Análise Radiográfica Digital (mandíbulas)	44
5.7 Confeção de lâminas histológicas e estudo histomorfométrico das mandíbulas ...	45
5.8 Coleta de sangue e análise hematológica	45
5.9 Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais	46
5.9.1 Análise da variação de massa corpórea	46
5.9.2 Índices hepático, renal, esplênico e gástrico	46
5.9.3 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço	46
5.9.3.1 Estômago	47
5.9.3.2 Fígado	47
5.9.3.3 Rim	48
5.9.3.4. Baço	48
5.10 Análise estatística	48
6 RESULTADOS	50

6.1	Análise da Dificuldade Cirúrgica	50
6.2	Análise Radiográfica Digital (mandíbulas)	52
6.3	Estudo histomorfométrico das mandíbulas	54
6.4	Análise de Parâmetros Hematológicos	58
6.4.1	<i>Eritrograma (Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito)</i>	58
6.4.2	<i>Índice de anisocitose (RDW)</i>	59
6.4.3	<i>Plaquetometria</i>	60
6.4.4	<i>Leucograma (Leucócitos, Linfócitos, Neutrófilos e Monócitos)</i>	61
6.5	Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais	64
6.5.1	<i>Análise da variação de massa corpórea</i>	64
6.5.2	<i>Índices dos órgãos</i>	67
6.5.2.1	<i>Índice Gástrico</i>	67
6.5.2.2	<i>Índice Hepático</i>	67
6.5.2.3	<i>Índice Renal</i>	67
6.5.2.4	<i>Índice Esplênico</i>	68
6.5.3	<i>Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço</i>	69
6.5.3.1	<i>Estômago</i>	69
6.5.3.2	<i>Fígado</i>	72
6.5.3.3	<i>Rim</i>	75
6.5.3.4	<i>Baço</i>	78
7	DISCUSSÃO	80
8	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos são agentes antirreabsortivos bastante efetivos no tratamento de doenças ósseas metabólicas e metástases ósseas, sendo utilizados com frequência em pacientes com mieloma múltiplo, metástases ósseas de tumores de órgãos sólidos e em pacientes com osteoporose ou doença de Paget (ALLEGRA et al., 2007; AAPRO et al., 2008; WALTER et al., 2010). Em decorrência do seu principal mecanismo de ação ser a indução de apoptose de osteoclastos ou de sua perda de função, os bisfosfonatos, são fármacos úteis e realmente eficazes em impedir a reabsorção de osso (LI, DAVIS, 2003, RUSSELL, 2007). Entretanto, com isso, esses fármacos impedem que o osso seja remodelado, uma vez que, antes de ser neoformado, o osso necessita ser reabsorvido. Essa propriedade se faz ainda mais importante quando existem fatores indutores de remodelação óssea, como traumas e reações inflamatórias.

Os ossos maxilares estão em constante estímulo de forças mastigatórias, além de serem induzidos à remodelação em casos de exodontias ou inflamações locais, pela doença periodontal e pela infecção periapical (KATZ, 2005; TSAO et al., 2013). Nesses casos, impedido o remodelamento, o osso fica exposto à infecção e a produtos da inflamação local, gerando dano tecidual, que pode culminar em necrose óssea (MASHIBA et al., 2005; AGHALOO et al., 2013). Essa condição é conhecida como Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB), um grave efeito adverso do uso desses agentes.

Embora a OMB não possua etiopatogenia bem descrita, sabe-se que fatores locais e sistêmicos podem influenciar em sua ocorrência. Dentre esses fatores de risco, destacam-se reações inflamatórias locais (HOFF et al., 2008) e sistêmicas, como a anemia e o diabetes mellitus, que possuem influência na resposta imunológica do hospedeiro, aumentando a prevalência de OMB (BARASCH et al., 2011). Além disso, a administração endovenosa de aminobisfosfonatos é capaz de produzir resposta inflamatória no organismo, ocasionando sintomas como febre, fadiga, mal-estar e sintomas gastrintestinais (REID et al., 2010).

Assim, sabendo que essa condição representa risco aos pacientes que fazem uso de bisfosfonatos, sem haver protocolo de tratamento bem estabelecido (DIEGO et al., 2007), faz-se importante investigar mecanismos farmacológicos eficazes na sua prevenção. Nesse contexto, supõe-se que fármacos anti-inflamatórios podem proporcionar uma condição inflamatória modulada, o que poderia atuar como terapia preventiva efetiva ao desenvolvimento da OMB.

A dexametasona, como um anti-inflamatório esteroidal, é capaz de inibir a inflamação sob diferentes vias (RHEN, CIDLOWSKI, 2004), o que pode mostrar efetividade quando associada à infusão de bisfosfonatos. Entretanto, sabe-se que esse fármaco, em doses altas e administrado de forma crônica, atua como um fator de risco para a ocorrência de OMB (BARASCH et al., 2011). A nimesulida, por sua vez, é um anti-inflamatório não esteroidal, capaz de inibir a degradação do ácido araquidônico pelas enzimas ciclo-oxigenases (COX), sobretudo pela COX-2 (SHAZ, MURRAY, FITZGERALD, 1999). A COX-2 é chamada de COX-indutiva, por estar mais atuante em situações onde reações inflamatórias são induzidas, atuando de forma mais específica contra a inflamação e reduzindo a ocorrência de efeitos adversos (O'NEILL, FORD-HUTCHINSON, 1993; BISCARINI et al., 1998).

Assim, os anti-inflamatórios, esteroidais e não-esteroidais, assumem um importante papel no controle da inflamação, o que poderia contribuir para a redução do risco de OMB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BFs) são fármacos potentes inibidores da reabsorção óssea, constituídos por uma estrutura semelhante ao pirofosfato endógeno. Diferentemente desse composto, os BFs contêm dois grupos fosfonatos ligados um a um ao átomo de carbono central (estrutura P-C-P), o que lhes confere alta resistência à degradação enzimática e maior tempo de meia vida (ROGERS et al., 2000; RUSSELL, CROUCHER, ROGERS, 2007). Diversos grupos químicos podem ser acrescentados à estrutura por meio de duas ligações covalentes adicionais ao átomo de carbono central, dando origem a uma enorme gama de possíveis estruturas aos BFs (ROGERS et al., 2000) e conferindo diferentes propriedades a esses fármacos. O grupo R1 determina a afinidade dos BFs pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência e atividade farmacológica (FLEISCH, 1998). De acordo com sua estrutura química, os bisfosfonatos podem ser classificados em bisfosfonatos que contêm nitrogênio (aminobisfosfonatos) ou que não contêm nitrogênio em sua composição (não-aminobisfosfonatos) (FLEISCH, 1998; RUSSELL et al., 1999). Assim como o pirofosfato, os BFs formam uma estrutura tridimensional, a qual é capaz de se ligar a íons metálicos bivalentes, tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} . Essa ligação ocorre de maneira bidentada, através da coordenação de um átomo de oxigênio a partir de cada grupo de fosfonato com o cátion bivalente. A afinidade ao cálcio pode ser aumentada ainda mais se uma das cadeias laterais (R1) é um grupo hidroxila (-OH) ou amina primária (-NH₂) (aminobisfosfonatos), porque isto permite a formação de uma conformação tridentada a qual é capaz de se ligar mais efetivamente à molécula de Ca^{2+} (JUNG, BISZA, FLEISCH, 1973) (Figura 1).

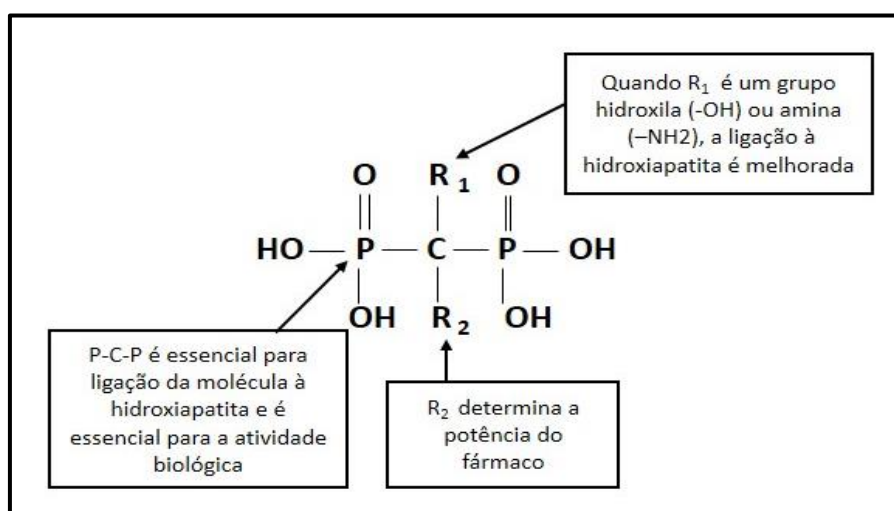


Figura 1. Representação esquemática da estrutura química geral dos bisfosfonatos. (Adaptado de Russell et al., 1999).

Esses fármacos previnem a reabsorção óssea através da inibição da atividade metabólica de osteoclastos e da indução de apoptose dessas células, sendo potentes agentes antirreabsortivos (LI, DAVIS, 2003; RUSSELL, CROUCHER, ROGERS, 2007). Os BFs têm uma afinidade elevada para a hidroxiapatita nos ossos, sendo rapidamente eliminados da circulação sistêmica e se instalando sobre superfícies minerais ósseas, particularmente nos sítios de atividade dos osteoclastos (SATO et al., 1991). Quando osteoclastos estão em atividade reabsortiva, forma-se um microambiente ácido, o que pode facilitar a liberação do BF da superfície do osso, dando origem a altas concentrações de bisfosfonato locais (ROGERS et al., 1999). O BF pode então ser internalizado por osteoclastos, culminando em inibição da sua atividade. Essa inibição pode ser consequência de um efeito tóxico direto, envolvendo retração osteoclástica, condensação e fragmentação celular, o que resulta em apoptose (SELANDER et al., 1996). Alternativamente, a inibição de sua atividade pode ocorrer devido à perturbação do tráfico vesicular intracelular pelo BF (ALAKANGAS et al., 2002), o que pode então conduzir, por exemplo, à desorganização do citoesqueleto de actina e à perda de anéis de actina, que fazem parte do arranjo estrutural dessas células, ou a distúrbios na borda enrugada de osteoclastos (SELANDER et al., 1996). Postula-se que os BFs possam ainda apresentar efeitos adicionais em células precursoras de osteoclastos, evitando o recrutamento, diferenciação e fusão dessas células (BOONEKAMP et al., 1986). Sabe-se que ocorre ainda efeito inibitório sobre a proliferação de osteoblastos (VITTE, FLEISCH, GUENTHER, 1996) e, sendo essas células fundamentais à formação de osteoclastos, devido à interação entre diversas moléculas, a formação dessas também fica prejudicada (Figura 2). Os bisfosfonatos não-aminados, por sua vez, são metabolizados no interior de osteoclastos em análogos de adenosina trifosfato (ATP) contendo metileno. Esses análogos acumulam-se dentro das células, pois são incapazes de serem hidrolisados, e seu acúmulo inibe numerosas enzimas metabólicas intracelulares, o que leva à citotoxicidade e a apoptose dessas células (SELANDER et al., 1996). Particularmente, os bisfosfonatos que contêm nitrogênio em sua composição química inibem a via do mevalonato, suprimindo a farnesil pirofosfatase (FPP) e a geranil pirofosfatase (GGPP), o que prejudica a produção de colesterol e lípidios isoprenóides, além de impedir a prenilação de pequenas GTPases (Ras, Rho, Rac) (ROGERS et al., 2000), o que causa a desregulação de processos celulares importantes para os osteoclastos. Como consequência desses efeitos, os osteoclastos podem ter sua função perdida, decorrente da perda da borda enrugada, necessária para a reabsorção óssea e da destruição do citoesqueleto de actina (SELANDER, LEHENKARI, VAANANEN, 1994), desregulando o transporte intracelular e a organização da arquitetura celular, o que conduz

a apoptose (HUGHES et al., 1995; GREEN, 2004) (Figura 3). Outras enzimas que podem ser inibidas pelos BFs são a esqualeno sintase, afetando a biossíntese do colesterol, que pode atuar na formação da borda enrugada, e as proteínas tirosina fosfatases (PTPs), que equilibram a atividade de tirosina-quinases em vias de transdução de sinal iniciadas pelos fatores de crescimento, insulina e outros estímulos (RODAN, FLEISCH, 1996). Foi demonstrado que a apoptose induzida por BFs em osteoclastos envolve mudanças morfológicas características, perda de potencial de membrana da mitocôndria e ativação de caspases, sendo que a caspase-3 parece ser a principal caspase efetora ativada no processo (BENFORD et al., 2001). Esses mecanismos de ação adicionais conferem aos aminobisfosfonatos um potencial antirreabsortivo significativamente maior do que os não-aminobisfosfonatos (RUSSELL, CROUCHER, ROGERS, 2007; AAPRO et al., 2008).

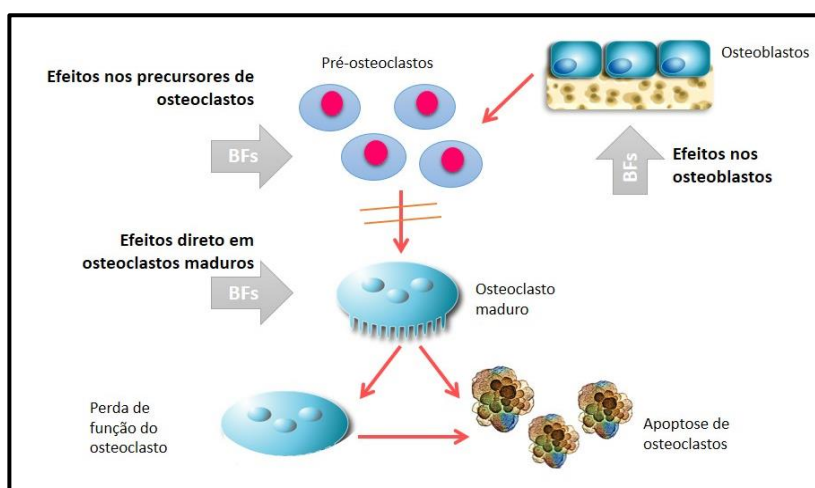


Figura 2. Mecanismo de ação dos bisfosfonatos. Os bisfosfonatos atuam por efeitos diretos em precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros, causando sua perda de função e apoptose. Além disso, atua em osteoblastos, impedindo que esse ative a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros (Adaptado de Rogers et al., 2000)

Devido a sua potente ação antirreabsortiva, os BFs tornaram-se uma alternativa para o tratamento de uma variedade de doenças ósseas, sendo os mais importantes agentes utilizados em doenças metabólicas de osso e metástases ósseas (WALTER et al., 2010). Fármacos dessa classe têm sido administrados com frequência em pacientes com mieloma múltiplo (ALLEGRA et al., 2007) ou metástases ósseas oriundas de tumores de órgãos sólidos (AAPRO et al., 2008) e em pacientes com a doença de Paget ou osteoporose (ALLEGRA et al., 2007). Assim, observam-se redução da ocorrência de eventos esqueléticos, tais como fraturas e a necessidade de radiação ou operações de estabilização, prevenção de episódios de hipercalcemia, redução da dor, e, por conseguinte, obtenção de impacto positivo na qualidade de vida dos pacientes acometidos por essas doenças (WALTER et al., 2010).

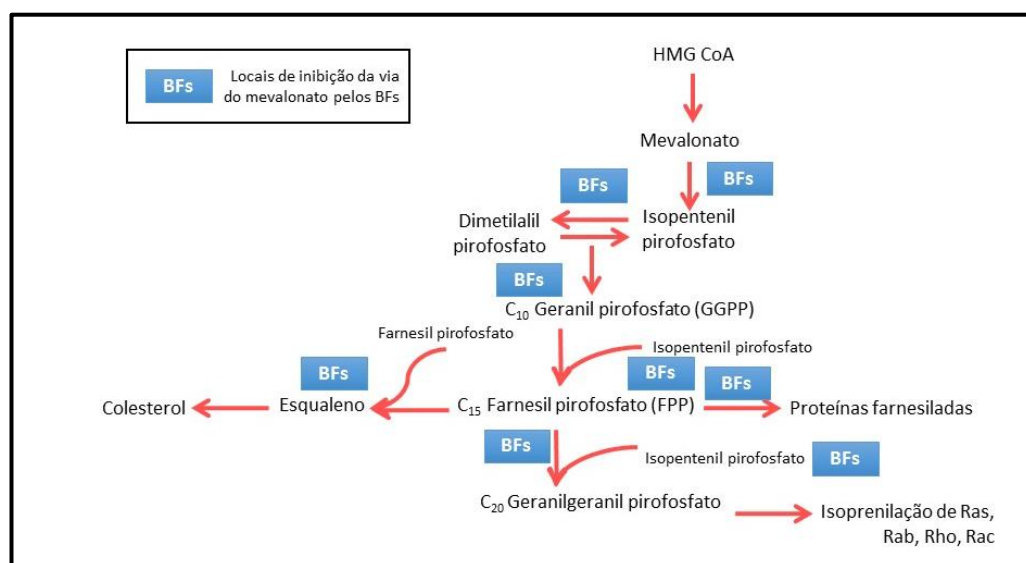


Figura 3. Inibição da via do mevalonato por aminobisfosfonatos. Aminobisfosfonatos podem inibir a vida do mevalonato em diferentes pontos, levando à perda da borda enrugada e apoptose de osteoclastos (Adaptado de Russell et al., 1999).

Os BFs são capazes de produzir efeitos em outras células, além de osteoclastos, como, por exemplo, em células tumorais. Em decorrência dessa vantagem, os aminobisfosfonatos, especificamente, têm sido bastante administrados por via endovenosa (EV) para tratamento da doença óssea metastática, sobretudo para tumores de órgãos sólidos, dentre esses mama, próstata, rim e pulmão (ALLEGRA et al., 2007; AAPRO et al., 2008). Os efeitos antitumorais dessa terapia ocorrem a partir da indução de apoptose de células tumorais, inibição da adesão de células tumorais na matriz extracelular, da sua proliferação e da invasão tumoral, devido ao bloqueio da prenilação de pequenas GTPases (SHIPMAN et al., 1998; CLÉZARDIN, 2005). Além disso, foi demonstrado que o ácido zoledrônico foi capaz de inibir *in vitro* a proliferação de células endoteliais humanas estimuladas com soro fetal bovino, fator do crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e fator do crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo um potente inibidor da angiogênese (WOOD et al., 2002), mecanismo essencial ao crescimento tumoral. Além disso, o ácido zoledrônico tem mostrado excelentes resultados na redução e atraso da morbidade esquelética e as complicações decorrentes da doença óssea metastática, sendo, por conseguinte, utilizado por mais de 15 anos para melhorar os resultados de pacientes com metástases ósseas de tumores sólidos (AAPRO et al., 2008).

O ácido zoledrônico (AZ) é um aminobisfosfonato derivado imidazólico heterocíclico de terceira geração. É o mais potente dos bisfosfonatos, possuindo cerca de 10.000 vezes a potência do etidronato (FERNANDES, LEITE, LANÇAS, 2005). Esse

fármaco é administrado por via EV, em uma infusão de 4 ou 5 mg do fármaco por cerca de 15 minutos. Ao final da administração, sua concentração plasmática eleva-se rapidamente, seguido de um declínio, apresentando, após 24 h, concentração plasmática de 1%. Cerca de 56% do AZ liga-se a proteínas plasmáticas e o mesmo praticamente não é acumulado no organismo. O fármaco não sofre metabolização e é eliminado em sua forma inalterada pelos rins, através de um processo trifásico, que resulta de duas fases de eliminação rápidas e uma fase longa, com tempo de meia-vida estimado em 146 horas (RUSSEL et al., 1999; LYSENG-WILLIAMSON, 2008).

Apesar de seus efeitos benéficos, estudos baseados em relatos retrospectivos e prospectivos associam BFs, principalmente de uso EV, à osteonecrose de maxilares (VANNUCCHI et al., 2005; FICARRA et al., 2005; WANG et al., 2007).

2.2 Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB)

Em meados de 1850, começou a ser descrita uma afecção em operários de fábricas de fósforos que tinham contato com o fósforo branco. Essa condição atingia os ossos mandibular e maxilar, era relacionada a um sítio de infecção, como um alvéolo pós-exodontia ou um dente cariado, causando dor, inflamação de tecidos gengivais adjacentes, por vezes, formação de abscessos, e, posteriormente, necrose óssea, sendo chamada de doença do fosfato, necrose por fósforo dos maxilares ou pelo termo em inglês “*phossy jaw*” (STOCKMAN, 1899; HUGHES, BARON, BUCKLAND, 1962). Postula-se que a *phossy jaw* poderia ocorrer a partir da liberação de vapores nocivos, como o ozônio e o peróxido de hidrogênio, no processo de oxidação que ocorria na fabricação de fósforo (STOCKMAN, 1899). Esses compostos nocivos penetrariam nos ossos maxilares e, juntos com a microbiota oral, dariam origem à infecção com formação de sequestros ósseos (HUGHES, BARON, BUCKLAND, 1962). Subsequentemente, o desenvolvimento de fósforos de segurança, que usam fósforo vermelho amorfo, levou a um declínio da *phossy jaw*, após 1850 (HELLSTEIN, MAREK 2005).

Em 2003, uma condição que tem algumas semelhanças com *phossy jaw* começou a ser relatada em pacientes em quimioterapia (MARX, 2003; WANG, GOODGER, POGREL, 2003). Uma característica comum entre os pacientes afetados por essa doença era a terapia continuada com aminobisfosfonatos (MARX, 2003; RUGGIERO et al., 2004), sendo, então, atribuído o termo “osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos” (HELLSTEIN, MAREK 2005).

A Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB) é definida como uma exposição de osso necrótico na região maxilofacial, por mais de oito semanas em pacientes em uso de bisfosfonatos sem história prévia de radioterapia (KHOSLA et al., 2007). BFs inibem a reabsorção de osso mediada pelos osteoclastos e, conseqüentemente, diminuem o *turnover* ósseo, aumentando assim a densidade mineral óssea e reduzindo o risco de fraturas. No entanto, o efeito supressivo dos BFs sobre a renovação do tecido ósseo em períodos mais longos pode debilitá-lo, inibindo a remoção de células danificadas do osso normal e aumentando a mineralização óssea, o que resulta em osteonecrose (BALDI et al., 2009). Alguns fatores parecem influenciar na probabilidade do desenvolvimento da OMB, como a potência do bisfosfonato utilizado, duração do tratamento com bisfosfonatos por via endovenosa, manipulação odontológica, higiene oral deficiente, idade do paciente e localização (mandíbula ou maxila) (WOO, HELLSTEIN, KALMAR, 2006). Mesmo sendo

bem descrita a ocorrência de OMB, a patogênese desse processo continua pobremente conhecida (WALTER et al., 2010; RUGGIERO, 2013).

Embora a etiologia do OMB pareça ser multifatorial, sofrendo a influência de diversos fatores locais para seu desenvolvimento, duas teorias têm sido consideradas para explicar o mecanismo desta complicação. A principal teoria sugere que OMB é causada pela cessação da remodelação óssea e *turnover* ósseo, consequência da inibição osteoclástica provocada pelos BFs (MASHIBA et al., 2005), especialmente na crista alveolar, onde a remodelação óssea é superior quando comparada com outras partes do esqueleto (HUJA et al., 2006), resultando num maior acúmulo de fármaco nesta região. Esse aumento da concentração local de bisfosfonatos poderia influenciar as células no microambiente local tais como osteoblastos, células endoteliais e fibroblastos, o que contribuiria para alterações da cicatrização de feridas após uma lesão, culminando clinicamente em OMB (WALTER et al., 2010). A segunda teoria baseia-se apenas em evidências experimentais, em que o pamidronato e o ácido zoledrônico tem demonstrado efeito inibitório da neoangiogênese capilar (SANTINI et al., 2002), o que pode resultar em uma necrose avascular (WALTER et al., 2010), além de os BFs possuírem a capacidade de reduzir o número de células progenitoras endoteliais circulantes (ALLEGRA et al., 2007). Indícios apontam que a maioria dos casos relatados de OMB está associada ao uso de aminobisfosfonatos por pacientes que estão em tratamento para o mieloma múltiplo ou câncer de mama (WOO, HELLSTEIN, KALMAR, 2006). A capacidade que o ácido zoledrônico tem demonstrado em diminuir a proliferação de células endoteliais induzida por soro, FGFb e VEGF em modelo de angiogênese em tecido mole (WOOD et al., 2002), pode ser positivo para a atuação desse fármaco como agente antitumoral, porém pode contribuir para o desenvolvimento da OMB.

Além do uso de aminobisfosfonatos, seja por via endovenosa ou oral, sobretudo por mais de 3 anos, sabe-se também que processos inflamatórios, decorrente de exodontias em dentes com infecções periapicais prévias (MARX et al., 2005; HOFF et al., 2008), e/ou de dentes com periodontite (AGHALOO et al., 2011) têm se mostrado como predisponentes ao desenvolvimento da OMB (RUGGIERO et al., 2009; KANG et al., 2013). Embora não atue como um fator iniciador, a inflamação dos tecidos periodontais está presente na maioria dos casos de OMB (AGHALOO et al., 2011). Em condição de normalidade, a reação inflamatória gerada induz a reabsorção óssea alveolar e permite a organização de uma resposta imune eficaz. Na presença de BFs, também há a formação de tecido inflamado associado à doença periodontal, entretanto a atividade osteoclástica é muito reduzida. Como resultado, o osso alveolar envolvido no processo inflamatório não pode ser reabsorvido e, conseqüentemente,

fica exposto a um ambiente rico em toxinas bacterianas, citocinas inflamatórias e estresse oxidativo, o que é altamente tóxico para células ósseas, provocando necrose (AGHALOO et al., 2011).

Foi demonstrado em estudos em humanos que reações inflamatórias são decorrentes da administração de aminobisfosfonatos (LESCLOUS et al., 2009; ROSSINI et al., 2012), além de conjuntamente ocorrerem modificações no perfil hematológico dos pacientes tratados (ROSSINI et al., 2012). Corroborando essa hipótese, estudos experimentais em modelo de peritonite associaram o uso de BFs ao aumento de citocinas inflamatórias, como Interleucina (IL)-1 e ao aumento do recrutamento de polimorfonucleares neutrófilos (NORTON et al., 2012). Já estudos clínicos demonstraram que os níveis de IL-1 β estão significativamente associados à ocorrência de OMB (TSAO et al., 2013). O uso desses fármacos leva também à ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ e à liberação de interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF- α), devido ao bloqueio da enzima FPP, o que provoca um acúmulo dos intermediários dessa via em monócitos, culminando na ativação dessas células e na liberação dessas substâncias (ROELOFS et al., 2010). Esses achados demonstram que pode ocorrer um estado inflamatório no organismo a partir da administração crônica desse tipo de fármaco.

Foi visto ainda que a ocorrência de OMB esteve relacionada ao aumento dos níveis de IL-6, o que estimula a atividade osteoclástica, aumentando a relação RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B)/OPG (Osteoprotegerina), e à redução do VEGF (MOZZATI et al., 2013). Além disso, estudos demonstram a capacidade de anti-inflamatórios fracos, como o paracetamol e o ibuprofeno, contribuírem na prevenção de sintomas desse evento, como pirexia, cefaleia e dores musculares (WARK et al., 2012). Sugere-se ainda que o alendronato, bisfosfonato aminado utilizado no tratamento da osteoporose e administrado por via oral, aumente a produção de IL-1 β induzida por *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria periodontopatogênica, via ativação da caspase-1, o que pode contribuir para o desenvolvimento de osteomielite dos maxilares associada a BFs e outros efeitos inflamatórios secundários (DENG et al., 2009). Adicionalmente, essa desregulação inflamatória gerada pela administração de BFs, pode aumentar também os níveis de óxido nítrico, mediador que está envolvido na ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B), culminando, em elevadas concentrações, em apoptose de osteócitos (ALMEIDA et al., 2010), o que pode contribuir para a patogênese da OMB.

A OMB pode ser vista como uma área de osso necrótico e avascular exposto que também pode incluir uma infecção secundária. A gengiva ou as mucosas adjacentes ao osso

necrótico encontram-se inflamadas e sensíveis normalmente, limitando a higiene oral e levando a um aumento no tamanho do defeito quando é realizado o debridamento cirúrgico. Os tecidos moles circundantes podem ser facilmente traumatizados por microfraturas na superfície óssea necrótica, levando a ulceração e dor constante (MIGLIORATI, SIEGEL, ELTING, 2006). Um aumento na mobilidade do dente também pode ocorrer em dentes adjacentes como resultado do processo necrótico.

Como clinicamente a OMB pode assumir diversas apresentações, a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) organizou uma classificação para OMB, a fim de orientar as diretrizes de tratamento racional e coletar dados para avaliar o prognóstico em pacientes usuários de BFs (RUGGIERO et al., 2009). A estratificação consiste nos seguintes estágios: o estágio 0, em que os pacientes não apresentam evidências clássicas de necrose óssea, mas relatam sintomas não-específicos ou clínicos e radiográficos que sugerem esse diagnóstico. Dentre os sintomas, estão dores ósseas ou odontalgias não atribuídas a causas odontogênicas, associada a fístulas ou mobilidade dentária não explicada por doença periodontal. Radiograficamente, é possível observar aumento do espaço do ligamento periodontal e alterações no padrão trabecular ósseo. O estágio 1 é caracterizado por osso exposto e necrosado em pacientes assintomáticos sem nenhuma evidência de infecção. Já no estágio 2, o paciente apresenta osso exposto e necrosado com presença de infecção e sintomatologia dolorosa. No estágio mais grave (estágio 3), além das características do estágio 2, o paciente deve apresentar uma ou mais das seguintes características: osso necrótico exposto estendendo-se além da região de osso alveolar, fratura patológica, fístula extra-oral, comunicação nasal/oral, osteólise estendendo-se até a borda inferior da mandíbula ou ao seio maxilar (RUGGIERO et al., 2009). Mesmo podendo haver evidências de OMB em estágios precoces, essa condição geralmente só é diagnosticada quando há evidência clínica de exposição óssea, em estágios avançados. Nesse momento, o osso exposto frequentemente está associado à sintomatologia dolorosa e à infecção e supuração (POZZI et al., 2007; DINIZ-FREITAS et al., 2012).

Embora existam diversas tentativas, não há modalidade terapêutica realmente efetiva para ser aplicada com segurança nessa condição, sendo considerado um tratamento extremamente difícil por alguns autores (DIEGO et al., 2007). Nesses casos, sugere-se a utilização de antibióticos tópicos e sistêmicos e, em estágios mais avançados, a associação dessa terapêutica ao debridamento cirúrgico (RUGGIERO et al., 2009). Entretanto, metade dos pacientes tratados com descontinuação do BF, antibioticoterapia local e/ou sistêmica, oxigenoterapia hiperbárica ou debridamento cirúrgico mantêm quadro clínico inalterado,

alguns necessitam de reintervenção cirúrgica extensa e apenas 3% dos casos tratados com uma dessas modalidades evoluem para cura (POZZI et al., 2007; DIEGO et al., 2007; DEL CONTE et al., 2010). O desafio do cirurgião-dentista é tratar a OMB mesmo na ausência de terapêuticas preventivas e curativas adequadas, o que torna essa condição ainda mais preocupante, pois a exposição óssea aumenta a possibilidade de infecção local, podendo evoluir para infecção sistêmica e sepse, principalmente em pacientes imunocomprometidos sistemicamente (MIYAZAKI et al., 2012).

Diversos modelos experimentais de indução de OMB em animais têm sido desenvolvidos na tentativa de elucidar sua etiopatogênese e de propor terapias realmente eficazes na prevenção ou tratamento dessa condição. A maioria desses estudos utiliza a infusão de aminobisfosfonatos aliada à administração de dexametasona, provocando um dano aos tecidos orais através de exodontia (HIKITA et al., 2009; SONIS et al., 2009; BI et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2010; LÓPEZ-JORNET et al., 2011; ABTAHI et al., 2012; CONTE-NETO et al., 2012; MARINO et al., 2012; ALLEN, CHU, RUGGIERO, 2013; CONTE-NETO et al., 2013; JABBOUR et al., 2014). Alguns estudos demonstram, ainda, o desenvolvimento de OMB através de modelos experimentais de periodontite (AGHALOO et al., 2011; AGUIRRE et al., 2012). Enquanto outros observam a capacidade de indução de OMB mesmo em ratos que não foram submetidos a injúrias nos tecidos orais (SENEL et al., 2010; MOLON et al., 2014). Esses estudos demonstram, histologicamente, presença de infecção, inflamação e osso desvitalizado, com lacunas de osteócitos vazias nos sítios de indução da OMB (HIKITA et al., 2009; SONIS et al., 2009; SENEL et al., 2010; AGUIRRE et al., 2012). Mesmo com a realização de todas essas investigações experimentais, nenhum dos modelos de OMB foi capaz de desvendar, de maneira concreta, a etiopatogênese dessa condição. Ainda, alguns desses modelos não foram capazes de evidenciar a formação de uma condição semelhante à OMB, mas descreveram atraso cicatricial em alvéolos pós-exodontia (KOBAYASHI et al., 2010). A utilização de doses pontuais de bisfosfonatos, por vezes aleatórias, diferentes vias de administração e falta de um protocolo experimental baseado no regime terapêutico clínico de BFs utilizados no tratamento das malignidades, não permite investigar de forma segura os mecanismos envolvidos com o desenvolvimento dessa condição. Assim, estudo anterior desenvolvido por esse grupo de pesquisa, evidenciou a indução de OMB através de uma curva dose-resposta de ácido zoledrônico, com a dose inicial desse fármaco e regime terapêuticos empregados semelhantes ao uso clínico, revelando alterações radiográficas e histopatológicas compatíveis com OMB (SILVA, 2013).

Considerando a inflamação como processo potencial para o desencadeamento da OMB e sabendo que essa é uma condição com patogênese ainda indefinida, sem protocolo de tratamento estabelecido (DEL CONTE et al., 2010; POZZI et al., 2007), representando risco de infecção grave, faz-se importante investigar mecanismos farmacológicos eficazes para impedir seu desenvolvimento. A partir disso, pode-se hipotetizar que a associação de anti-inflamatórios junto ao bisfosfonato modularia o processo inflamatório associado à infusão deste fármaco e possivelmente evitaria ou interferiria no desenvolvimento da OMB.

2.3. Anti-inflamatórios

2.3.1 Glicocorticoides

Glicocorticoides (GCs) são fármacos anti-inflamatórios potentes, utilizados no tratamento de desordens inflamatórias, imunológicas e neoplásicas, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e mieloma múltiplo, respectivamente. A eficácia clínica dos glicocorticoides sintéticos provém da sua capacidade de mimetizar os corticosteroides naturais. Inflamação, dor, infecção e estresse mental, por exemplo, levam à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Esses estímulos causam excitação do hipotálamo, que então libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH). O CRH, por sua vez, estimula a síntese e liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. O ACTH estimula o córtex adrenal a liberar glicocorticoides endógenos, como o cortisol. Uma vez dentro do sangue, cortisol é transportado para órgãos-alvo onde provoca inúmeros efeitos metabólicos incluindo aumento dos níveis de glicose no sangue, a estimulação da gliconeogênese no fígado, e a mobilização de aminoácidos e ácidos graxos, além de serem potentes imunossuppressores e inibirem a formação de osso (NEWTON, 2000). As evidências indicam que o receptor de glicocorticoide inibe a inflamação através de três mecanismos: efeitos genômicos diretos e indiretos e mecanismos não genômicos (RHEN, CIDLOWSKI, 2004).

Os glicocorticoides atravessam facilmente a membrana plasmática devido a sua estrutura lipofílica. Seus receptores constituem-se membros da família de receptores de hormônios esteroides e estão presentes no citoplasma em forma inativa e formam um complexo multiprotéico com proteínas de choque térmico 70 e 90 (HSP 70 e HSP 90), imunofilinas, chaperonas e muitas proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), sendo capaz de se ligar a diferentes glicocorticoides com uma afinidade elevada (WIKSTROM,

2003; STAHN et al., 2007). Após haver a interação entre receptor e glicocorticoide, há a liberação dessas proteínas e a formação de um complexo glicocorticoide-receptor dimerizado, que é enviado ao núcleo, onde se liga a sítios específicos de DNA, os elementos responsivos aos glicocorticoides (GREs). Essa ligação resultará na ativação ou repressão da transcrição de algumas moléculas, o que resulta em um mecanismo de ação genômico direto. Uma das moléculas que terá sua transcrição estimulada é a da anexina-1 (também conhecida como lipocortina-1), uma proteína anti-inflamatória que interage com a fosfolipase A₂ citosólica (MIZUNO et al., 1997). A fosfolipase A₂ é responsável pela conversão de fosfolípidos de membrana a ácido araquidônico, que ocorre quando há um estímulo inflamatório. Assim, os corticoides inibem a ação da fosfolipase A₂, através do aumento de anexina-1, impedindo a liberação do ácido araquidônico e conseqüentemente sua conversão a eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), reduzindo a formação desses produtos pró-inflamatórios (RHEN, CIDLOWSKI, 2005). A ligação do complexo glicocorticoide e receptor pode também atuar sob GREs negativos, ocasionando efeitos inibitórios, o que parece ocorrer com os genes de citocinas inflamatórias IL-1 e IL-2 (BEATO, 1989; FALKENSTEIN, NORMAN, WHELING, 2000).

O complexo glicocorticoide-receptor também interage fisicamente com fatores de transcrição, como o NF- κ B e a Proteína Ativadora-1 (AP-1), bloqueando suas atividades transcricionais, o que representa um mecanismo de ação genômico indireto. Estando inativo, NF- κ B interage no citoplasma com uma proteína denominada I κ B (Inibidor de Kappa B), o que resulta em um efeito inibitório. Sinais microbianos e inflamatórios desencadeiam cascatas de sinalização que ativam I κ B (RHEN, CIDLOWSKI, 2004), desmascarando o NF- κ B. O NF- κ B agora no núcleo, liga-se a sequências de DNA e estimula a transcrição de citocinas, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , quimiocinas, moléculas de adesão celular, como Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1) e Molécula de Adesão Vascular-1 (VCAM-1) e selectina-E, fatores do sistema complemento e receptores para essas moléculas (RHEN, CIDLOWSKI, 2005). O NF- κ B também induz a transcrição da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), enzima que converte o ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs). Dessa maneira, o bloqueio do NF- κ B, também culminará na inibição da transcrição uma enorme gama de produtos pró-inflamatórios e sua ação nas moléculas de adesão celular reduzirão a diapedese das células inflamatórias. Segundo alguns estudos, esse processo inibitório pode ser reforçado com a estimulação ao aumento dos níveis I κ B. Os GCs podem interagir fisicamente com a AP-1, responsável pela formação de diversas moléculas inflamatórias, impedindo a transcrição desses produtos.

A produção de PGs também é controlada por um mecanismo não-genômico. Os GCs induzem a MAPK fosfatase-1, que indiretamente também pode inibir a fosfolipase A₂ citosólica, bloqueando a sua fosforilação (DE BOSSCHER, VANDEN BERGHE, HAEGEMAN, 2003). Além disso, esses fármacos reduzem o número de linfócitos T e B, monócitos, eosinófilos e basófilos da circulação, resultado de sua migração do leito vascular para o tecido linfoide. Sobre as células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, os glicocorticoides inibem sua função (KATZUNG, 2010). Os glicocorticoides estimulam a atividade de fosfatidilinositol-3-hidroxiquinase (PI3K), de maneira dependente do receptor glicocorticoide, mas independente de transcrição. A ativação da via PI3K leva à fosforilação de Akt, que, fosforilada, ativa a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), resultando na produção de óxido nítrico. Assim, pode-se dizer que os glicocorticoides possuem atividade anti-inflamatória bastante completa, interferindo na síntese de diversos mediadores inflamatórios e influenciando na atividade e no número das células inflamatórias (HAFEZI-MOGHADAM, 2002).

A dexametasona (DEX) é um glicocorticoide sintético de ação prolongada, que compartilha dos diversos mecanismos de ação inerentes aos GCs. Sua absorção ocorre em cerca de 30 a 90 minutos pelo jejuno (LESTER, 1989). Cerca de apenas 10% do fármaco é encontrado em sua forma livre no plasma, sendo que da fração ligada a proteínas, a maior parte da dexametasona encontra-se ligada a globulinas de ligação de corticoides (CBG) e uma fração menor ligada à albumina (PEREIRA et al., 2007). A metabolização desse fármaco, assim como outros GCs, é essencialmente hepática, com tempo de vida média plasmática de 100 a 300 minutos e tempo de meia vida biológica de 36 a 54 horas (PEREIRA et al., 2007). A dexametasona é eliminada pelos rins. Sua potente ação anti-inflamatória prolongada e imunossupressora torna a dexametasona um fármaco largamente utilizado para fins anti-inflamatórios, prevenindo edema pós-traumático, e no controle de doenças imunologicamente mediadas. Por suas ações apoptóticas em doenças hematológicas malignas (GREENSTEIN et al., 2002), os GCs, principalmente a dexametasona, tem feito parte do tratamento quimioterápico para o mieloma múltiplo, unidos a fármacos como ácido zoledrônico, bortezomib, talidomida e lenalidomida (COLLEONI, 2007; HUNGRIA, 2007; RAJKUMAR et al., 2010).

Apesar dos supostos efeitos benéficos que a administração de corticosteroides teria na OMB, como potentes anti-inflamatórios, fármacos dessa classe, como a dexametasona tem sido associados a um maior risco de desenvolvimento de osteonecrose. O uso crônico de altas doses de corticoides ou injeções intra-articulares desse tipo de fármaco pode aumentar a

apoptose de osteoblastos e osteócitos, além de prolongar o tempo de vida de osteoclastos e induzir a produção de precursores dessas células, o que pode estar relacionado à patogênese da necrose óssea (WENSTEIN, MANOLAGA, 2008).

Outras ações dos corticoides podem estar relacionadas ao desenvolvimento dessa condição. O dano endotelial, causado pelos GCs por diversas vias, aliado diminuição do plasminogênio tecidual e aumento de atividade do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), gerado por altas doses de GCs, aumenta o potencial pró-coagulante, predispondo à formação de trombos e, conseqüentemente, à isquemia (KERACHIAN, SÉGUIN, HARVEY, 2009). GCs podem ainda induzir o aumento de espécies reativas de oxigênio e, em altas doses, desregular a produção de óxido nítrico, um potente vasodilatador, o que gera complicações vasculares (KERACHIAN, SÉGUIN, HARVEY, 2009). A prostaciclina (PGI₂) também tem seus níveis decrescidos após a administração de GCs, pela inibição da fosfolipase A₂, diminuindo ainda mais o potencial de vasodilatação. Foi visto ainda o potencial de GCs, como a dexametasona, reduzir os níveis de VEGF (LI et al., 2005). Postula-se que os GCs podem causar o aumento da pressão intraóssea, reduzindo o fluxo sanguíneo pela adipogênese e hipertrofia de tecido adiposo na medula óssea (KERACHIAN, SÉGUIN, HARVEY, 2009). Entretanto, muito tem sido estudado ainda para esclarecer mecanismos inerentes ao desenvolvimento da osteonecrose induzida por corticoides, incluindo polimorfismos genéticos e disfunções lipídicas.

Um modelo experimental em camundongo foi capaz de reproduzir condição semelhante à necrose por dexametasona em fêmur (YANG et al., 2009), o que comprova a capacidade desse fármaco em causar necrose óssea em terapia continuada. Foi demonstrado ainda que há uma relação entre dose de corticoides e osteonecrose, estabelecida através de modelo experimental em coelhos, onde animais tratados com 1, 5, 20, e 40 mg/kg de metilprednisolona exibiram incidência de osteonecrose de 0, 42%, 70%, e 96%, respectivamente (MOTOMURA et al., 2008).

Regimes antineoplásicos contendo dexametasona também foram considerados como fatores de risco para o desenvolvimento dessa condição em pacientes com mieloma múltiplo (TALAMO et al., 2005). Adicionalmente, a dexametasona administrada sistemicamente parece aumentar a susceptibilidade de ocorrência de osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos em diversos modelos animais (SONIS et al., 2009; LÓPEZ-JOURNET et al., 2010; KERACHIAN et al., 2011) e em seres humanos (CHIU et al., 2010; BARASCH et al., 2011). Entretanto, a associação entre aumento do risco de desenvolvimento de osteonecrose e o uso de corticoides geralmente é relacionada à

administração de doses elevadas e crônicas desses fármacos (POWELL et al., 2010), além de administração conjunta de aminobisfosfonatos via EV. Esse regime terapêutico farmacológico pode ser empregado no tratamento do mieloma múltiplo (TALAMO et al., 2005), com o objetivo de suprimir a produção de células malignas da linhagem hematopoiética (TOSI et al., 2006).

2.3.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)

Os AINEs são fármacos anti-inflamatórios largamente utilizados. Em geral, além de atuarem contra a inflamação, os AINEs possuem efeitos anti-piréticos e analgésicos, uma vez que atuam inibindo a síntese de prostaglandinas (PGs) e tromboxano A₂ (TXA₂) (VANE, 1971).

As COXs consistem de um canal longo e estreito com uma curva fechada no fim e estão associadas à membrana plasmática celular. Assim, o ácido araquidônico, liberado a partir de sítios de membranas adjacentes à abertura do canal enzimático, que é em grande parte hidrofóbico, é absorvido e, em seguida, será convertido a prostanoídes. AINEs inibem a atividade da COX, impedindo o acesso para ácido araquidônico para dentro do canal, impedindo a formação desses prostanoídes. Esse bloqueio ocorre por meio de uma ponte de hidrogênio na arginina localizada na posição 120 (BERTOLINI, OTTANI, SANDRINI, 2001).

Esses agentes anti-inflamatórios atuam, portanto, sobre as duas isoformas da COX: COX -1, conhecida como COX constitutiva, expressa na maioria dos tecidos e a única isoforma encontrada nas plaquetas ou COX-2, a COX induzida, geralmente ausente nos tecidos normais e estimulada a partir de outras substâncias endógenas, mas presente em alguns órgãos, como coração e rins (O'NEILL, FORD-HUTCHINSON, 1993; VANE, BOTTING, 1998; SINGLA, CHAWA, SINGH, 2000). Os AINEs inibidores preferenciais da isoforma COX-1 têm mais chance de ocasionarem efeitos adversos, uma vez que essa enzima possui caráter constitutivo e, sendo inibida pelos fármacos, se torna incapaz de executar suas funções normais no organismo, podendo causar desconfortos gastrintestinais (ALISSON et al., 1992), redução da agregação plaquetária (PATRONO et al., 1985), problemas renais e inibição de contrações uterinas (RANG et al., 2007). Os AINEs que possuem seletividade para inibir a enzima COX-2, COX induzida possuem menor risco de causar efeitos adversos, pois, para que seja estimulada sua produção, na maioria das vezes, faz-se necessário a

interferência de citocinas, hormônios e fatores de crescimento (CULLEN et al., 1998; BERTOLINI, OTTANI, SANDRINI, 2001).

A nimesulida (NIM), um AINE com seletividade preferencial para inibição de COX-2 (CULLEN et al., 1998; SHAZ, MURRAY, FITZGERALD, 1999), apresenta alta atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica, incidência moderada de efeitos gastrintestinais em relação aos AINEs seletivos COX-1 (BJARNASON, THJODLEIFSSON, 1999; RAINSFORD, 2006). Embora seja inibidor preferencial de COX-2, a nimesulida causa menos efeitos cardiotoxicos do que os coxibes, que são fármacos altamente seletivos para COX-2 (RAINSFORD et al., 2006). Adicionalmente, a nimesulida tem a capacidade de inibir fracamente a COX-1, o que lhe confere vantagens terapêuticas, sobretudo em pacientes com risco tromboembólico (RAINSFORD et al., 2005).

Como os AINEs clássicos, a nimesulida exhibe ainda um mecanismo anti-inflamatório através da inibição de diversas funções de leucócitos polimorfonucleares (RAINSFORD et al., 2005). Esse fármaco possui ainda mecanismos de ação adicionais em relação aos outros AINEs, o que representa vantagens sob o ponto de vista da terapia anti-inflamatória e analgésica. Seu forte efeito antipirético parece estar relacionado à inibição de COX-2 no sistema nervoso central (TANIGUCHI et al., 1997). Nos mastócitos esse AINE atua impedindo a liberação de histamina (CASOLARO et al., 1993), além de inibir a quimiotaxia dessas células e a produção de espécies reativas de oxigênio, leucotrieno B₄ e Fator Ativador de Plaquetas (PAF) (VEHOEVEN et al., 1993; TOOL, VERHOEVEN, 1995). A nimesulida ainda é capaz de reduzir a quimiotaxia de função de neutrófilos ativados, reduzindo a produção de ânions superóxidos (MELLO, MAGALHÃES, COSSERMELLI, 1994; BRAVO-CUELLAR et al., 2003), além de interferir na adesão e na expressão de receptores nessas células (RAINSFORD et al., 2006). Postula-se que esses efeitos em células inflamatórias decorram a partir da inibição da fosfodiesterase IV, com consequente aumento dos níveis intracelulares de 3'-5'- Adenosina Monofosfato cíclico (AMPc), um sinalizador celular importante, que pode regular negativamente a liberação ou produção de histamina, bem como de leucotrienos, citocinas pró-inflamatórias e liberação de enzimas por leucócitos (RAINSFORD et al., 2006).

A nimesulida mostra, ainda, a capacidade de inibir a atividade da enzima Óxido Nítrico Sintetase (NOS), reduzindo a formação do óxido nítrico (RAINSFORD et al., 2006). Foi demonstrado, que em fibroblastos sinoviais, a nimesulida induziu à fosforilação e ativação de receptores de glicocorticoides para que esses se liguem a genes-alvo (DI BATISTA et al., 1999; PELLETIER et al., 1999), o que pode reforçar sua ação anti-inflamatória.

Adicionalmente, esse fármaco tem mostrado ação em reduzir os níveis e a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), a partir de efeitos inibitórios nos condrócitos, reduzindo a degradação da cartilagem decorrente da artrite reumatoide (KULLICK, NIKSIC, KLEIN, 2002). Além da inibição da produção de prostaglandinas, que são responsáveis pela transmissão do impulso nociceptivo até o nível espinhal, a nimesulida produz ação antinociceptiva adicional, que parece estar relacionada a mecanismos diretos do fármaco a nível espinhal e supra espinhal e, periféricamente, à liberação de óxido nítrico local, através de envolvimento da via óxido nítrico/GMPc (Guanosina Monofosfato Cíclico) (ISLAS-CADENA, AGUIRRE-BAÑUELOS, GRANADOS-SOTO, 1999).

A nimesulida possui absorção rápida, atingindo pico de concentração plasmática de média de 3 a 6,5 mg/L entre 1 e 3 horas após sua administração (BERNARREGI et al., 1998). As maiores concentrações desse fármaco são encontradas em tecido adiposo, fígado, rins, pulmões, glândulas adrenais, intestino e coração, após 1 a 4 horas de sua administração, sendo o cérebro um dos locais onde há menor acúmulo. Esse AINE não possui compartimento de reserva, não havendo acúmulo do fármaco no organismo (BERNARREGI et al., 1998). Encontra-se fortemente ligada a proteínas plasmáticas e possui volume de distribuição baixo. A nimesulida sofre metabolização pelo sistema P450 hepático, sendo o principal metabólito o 4-hidroxi-nimesulida, que possui características semelhantes ao fármaco original, embora sua potência seja menor, enquanto metabólitos menores foram também detectados na urina e fezes em uma forma conjugada (BERNARREGI et al., 1998; SINGLA, CHAWLA, SINGH, 2000). Sua eliminação é progressiva, com uma meia-vida plasmática de 2-5 horas para o fármaco original e 3-9 horas para o seu principal metabólito (4-OH-NME) (BERNARREGI et al., 1998).

Diante do seu potente efeito anti-inflamatório, além das suas propriedades antipiréticas e analgésicas, e de ainda apresentar baixo índice de efeitos adversos, a nimesulida configura-se um AINE bastante efetivo, conferindo um rápido início de ação e boa analgesia em afecções dentárias (RAGOT et al., 1994) e ósseas, como a osteoartrite (BIANCHI, BROGGINI, 2003).

Tendo em vista que os anti-inflamatórios, esteroidais e não-esteroidais, assumem um importante papel no controle da inflamação, o que poderia contribuir para a redução do risco de OMB, é objetivo do presente estudo avaliar o efeito do tratamento com anti-inflamatório esteroideal ou não-esteroideal na indução de OMB em mandíbulas de ratos submetidos a infusões de ácido zoledrônico e à exodontia.

3 JUSTIFICATIVA

A OMB é um efeito adverso do uso dos bisfosfonatos, que pode trazer consequências graves para o bem-estar dos pacientes que se utilizam dessa terapia. Trata-se de uma condição dolorosa, debilitante e sem perspectiva de cura ou modalidade de tratamento eficaz.

A injeção de aminobisfosfonatos tem sido recentemente associada a eventos pró-inflamatórios, como migração acentuada de polimorfonucleares neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos. Além disso, pacientes com elevado risco de desenvolvimento de OMB apresentam um aumento da expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 em fluido gengival e saliva. Assim, a inflamação, desencadeada a partir da infusão de bisfosfonatos, poderia atuar como fator agravante à ocorrência da necrose óssea em maxilares.

A partir do exposto, pode-se supor que a atividade anti-inflamatória atuaria como um fator preventivo ao desenvolvimento da OMB. Os anti-inflamatórios esteroidais, como a dexametasona, atuam como potentes inibidores da inflamação, uma vez que regulam a transcrição gênica de produtos pró-inflamatórios e induzem a produção de substâncias anti-inflamatórias, além de atuarem diretamente sobre células polimorfonucleares e mononucleados. Entretanto, a administração crônica desse tipo de fármacos tem contribuído para instalação de OMB. Por outro lado, outra classe de fármacos, os anti-inflamatórios não-esteroidais, como a nimesulida, inibem a produção de prostaglandinas e diversos outros mediadores inflamatórios, possuindo boa ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética.

Assim, a inflamação parece exercer um importante papel na OMB e é desconhecido o efeito de diferentes anti-inflamatórios no desenvolvimento dessa condição. Portanto, espera-se encontrar efeito protetor ao desenvolvimento de OMB a partir da avaliação de uma curva concentração-efeito da dexametasona, bem como de nimesulida em múltiplas doses, associado a administrações de ácido zoledrônico em ratos. A confirmação de achados desse tipo pode contribuir para a alteração dos protocolos farmacológicos de bisfosfonatos aminados em pacientes que se utilizam dessa terapia, visto que a condição de necrose óssea, uma vez instalada, não possui tratamentos comprovadamente eficazes.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito da dexametasona e da nimesulida na quimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico em ratos.

4.2 Específicos

- Estabelecer a curva de concentração-efeito do tratamento com dexametasona em modelo experimental de osteonecrose em mandíbula de ratos submetidos à administração endovenosa de ácido zoledrônico;
- Avaliar as alterações radiográficas associadas à osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico, em animais controle e tratados com dexametasona ou nimesulida;
- Avaliar as alterações histopatológicas associadas à osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico, no sítio de exodontia mandibular, em animais salina e tratados com dexametasona ou nimesulida;
- Verificar se há dificuldade cirúrgica no momento da exodontia relacionada aos tratamentos isolados com anti-inflamatórios ou combinados com a administração de ácido zoledrônico;
- Analisar o perfil hematológico de animais controles e submetidos ao modelo de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico, tratados com dexametasona ou nimesulida;
- Avaliar a toxicidade sistêmica (variação de massa corpórea, índices hepático, renal, esplênico e gástrico, e análise microscópica de estômago, fígado, rim, baço) dos animais tratados com anti-inflamatórios e que receberam ou não infusões de ácido zoledrônico.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA-UFC), sob número de protocolo 81/13 (Anexo G), foram selecionados 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corpórea entre 180 e 280 gramas. Os animais eram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Esses animais foram mantidos no Biotério Subsetorial do Laboratório de Oncologia Experimental em gaiolas apropriadas de polipropileno. Cada gaiola acomodou oito animais, os quais foram numerados individualmente através de marcação com tinta no rabo, sendo refeitas quando necessário. Os animais receberam ração comercial balanceada própria e água *ad libitum*, sendo mantidos em ciclos de luz-escuro de 12 horas e permanecendo nas mesmas condições ambientais durante todo o experimento.

5.2 Modelo de Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos

O protocolo foi baseado em modelo experimental adaptado de Sonis et al. (2009) e Maahs et al. (2011) e desenvolvido, por esse grupo, com sucesso anteriormente (SILVA, 2013).

A osteonecrose dos maxilares foi induzida através da administração EV de três doses semanais consecutivas de ácido zoledrônico na concentração de 0,2 mg/kg, nos dias 0, 7 e 14. Após quatro semanas (28 dias) da última administração do ácido zoledrônico (42º dia experimental), os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Uma semana depois do procedimento cirúrgico (dia 49), uma nova dose (0,2 mg/kg) do bisfosfonato foi administrada por via EV.

Antes de iniciar as exodontias, os animais foram anestesiados com ketamina HCl (70 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. Iniciou-se o procedimento de exodontia, através da sindesmotomia utilizando sonda exploradora odontológica nº5 (GOLGRAN®) e, em seguida, foi feita a luxação do 1º molar inferior esquerdo com um esculpador Holleback 3s (GOLGRAN®). Para a exodontia da unidade dentária, movimentos de alavanca foram realizados, utilizando uma espátula Lecron-Zalle (GOLGRAN®) (Técnica adaptada de ALVES et al., 2007 e MAAHS et al., 2011).

Todas as exodontias foram realizadas por um único operador e os animais foram randomizados quanto à ordem que seriam submetidos ao procedimento cirúrgico (comando aleatorização, Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation®), no intuito de dissipar o erro de força do operador.

O sacrifício dos animais ocorreu quatro semanas após a extração dentária (dia 70) (SILVA, 2013).

5.3 Protocolo de tratamento com anti-inflamatórios (Dexametasona e Nimesulida)

A dose média de trabalho de dexametasona administrada foi obtida através daquela utilizada como anti-inflamatório preemptivo em procedimentos cirúrgicos odontológicos em humanos adultos (4 mg, dose única, via oral) (NEUPERT et al., 1992; SOTTO-MAIOR, SENNA, ASSIS, 2011), sendo convertida para dose administrada em animais através da fórmula para transposição de doses baseada na área superfície corporal, preconizada por Reigne e Blesch (2002). A partir dessa dose (0,4 mg/kg), com o objetivo de analisar o efeito anti-inflamatório de uma supradose ou de uma subdose, estabeleceu-se a curva traçada com uma dose dez vezes maior (4 mg/kg) e outra dez vezes menor (0,04 mg/kg).

Já a da nimesulida foi obtida através da dose desse fármaco utilizada, igualmente, como anti-inflamatório preemptivo em cirurgias odontológicas em humanos adultos (100 mg, a cada 12 horas, via oral) (De MENEZES, CURY, 2010; ARAÚJO et al., 2012; AVELAR et al., 2012). Essa dose foi convertida para aquela administrada em animais através da fórmula para transposição de doses baseada em área de superfície corporal, preconizada por Reigne e Blesch (2002) e obteve-se, a partir dos cálculos, a dose de 10,3 mg/kg de nimesulida.

A dexametasona, ou solução salina foi administrada por gavagem 24 h antes da administração das três doses iniciais do ácido zoledrônico (dias -1, 6, 13), a fim de prevenir os eventos pró-inflamatórios decorrentes da administração de AZ, mantendo-se essa frequência semanal até 24 h antes da última dose de ácido zoledrônico administrada (dia 48). A nimesulida foi administrada, via gavagem, 24 e 12 h antes das três primeiras administrações EV de ácido zoledrônico, continuando-se semanalmente com esse regime terapêutico até a última administração do bisfosfonato (dia 48). Ressalta-se que os fármacos, dexametasona ou nimesulida, também foram administrados 24 h e 12 h antes do procedimento cirúrgico da exodontia do 1º molar inferior, de acordo com o grupo experimental.

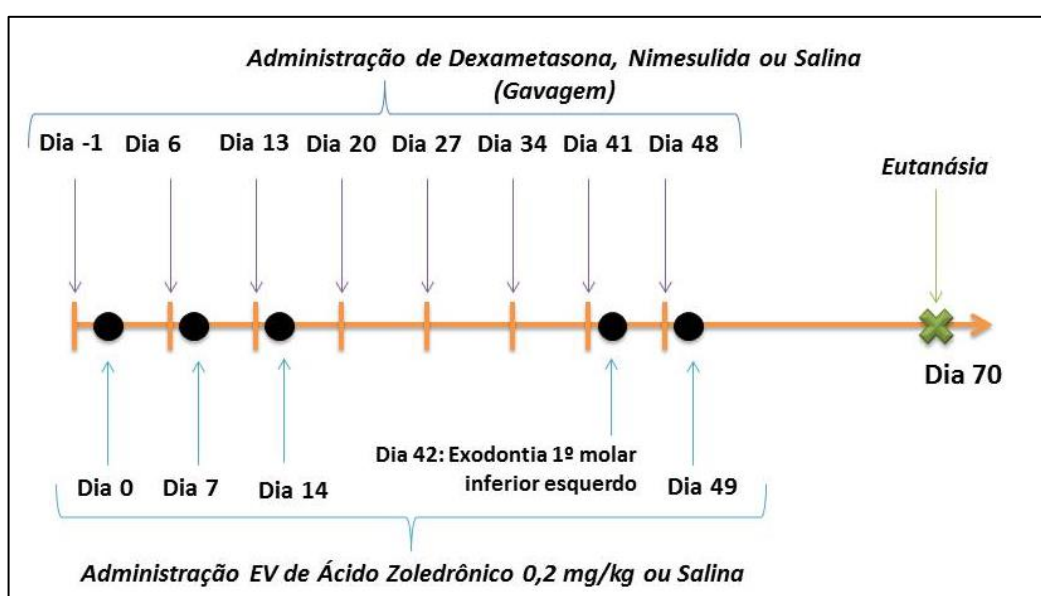


Figura 4. Protocolo experimental simplificado. O esquema representa o protocolo experimental de indução de OMB associado à administração de diferentes regimes de anti-inflamatórios.

5.4 Grupos Experimentais

5.4.1 Grupos Controle

Os animais constituíram cinco grupos de oito ratos cada, nos quais foi realizado o procedimento cirúrgico de exodontia do 1º molar inferior esquerdo sem haver administração de ácido zoledrônico, mas sim de solução salina 0,9% (1 ml/kg, via EV). Nesses animais, foi ainda administrado, por gavagem, solução salina 0,9% (1 ml/kg) ou dexametasona nas doses de 0,04 mg/kg, 0,4 mg/kg e 4 mg/kg, 24 h antes do dia de administração das três doses iniciais de salina (dias -1, 6, 13), mantendo-se essa frequência semanal até 24 h antes da última dose de solução salina administrada (dia 48). A nimesulida 10,3 mg/kg seguiu o mesmo regime dos

outros grupos, contudo foi administrada em duas doses: uma 24 h e outra 12 h antes da administração das três doses iniciais de salina (dias -1, 6, 13), mantendo-se essa frequência semanal até a última dose de solução salina administrada (dia 48).

5.4.2 Grupos OMB

Quarenta animais foram divididos cinco grupos (n=8) e submetidos ao modelo de indução da osteonecrose nos maxilares com injeção EV de ácido zoledrônico e exodontia do 1º molar inferior, segundo descrição anterior. Esses animais, receberam, também, solução salina 0,9% (1 ml/kg) (grupo F) ou dexametasona nas doses de 0,04 mg/kg (grupo G), 0,4 mg/kg (grupo H) e 4 mg/kg (grupo I), 24 h antes do dia de administração das três doses iniciais do ácido zoledrônico (dias -1, 6, 13), mantendo-se essa frequência semanal até 24 h antes da última dose de ácido zoledrônico (dia 48). O grupo nimesulida 10,3 mg/kg (grupo J), seguiu o mesmo regime dos demais, contudo esse fármaco foi administrado em duas doses: uma, 24 h e outra 12 h antes das três administrações iniciais do ácido zoledrônico (dias -1, 6, 13), mantendo-se essa frequência semanal até a última infusão de ácido zoledrônico (dia 48).

Quadro 1- Caracterização dos grupos experimentais. Os grupos controles (n=40, A, B, C, D, E) foram constituídos de oito animais cada, os quais receberam apenas tratamentos com solução salina EV e anti-inflamatórios ou salina por gavagem. Os grupos OMB (n=40, F, G, H, I, J) receberam administrações de ácido zoledrônico EV, associadas à salina ou anti-inflamatórios por gavagem. Os tratamentos empregados a cada grupo estão assinalados conforme a tabela abaixo.

Tratamentos		Exodontia	Salina	Ácido	Dexametasona	Dexametasona	Dexametasona	Nimesulida
Grupos Experimentais		do 1º molar inferior	0,9%	Zoledrônico (0,2 mg/kg EV)	0,04 mg/kg	0,4 mg/kg	4,0 mg/kg	10,3 mg/kg
Grupos Controle	Salina	X	X					
	Dexametasona 0,04 mg/kg	X			X			
	Dexametasona 0,4 mg/kg	X				X		
	Dexametasona 4,0 mg/kg	X					X	
	Nimesulida 10,3 mg/kg	X						X
Grupos OMB	Salina	X	X	X				
	Dexametasona 0,04 mg/kg	X		X	X			
	Dexametasona 0,4 mg/kg	X		X		X		
	Dexametasona 4,0 mg/kg	X		X			X	
	Nimesulida 10,3 mg/kg	X		X				X

5.5 Análise da Dificuldade Cirúrgica

O tempo necessário para realização da exodontia foi cronometrado por um auxiliar, com a finalidade de avaliar a dificuldade cirúrgica e analisar se há influência entre o tempo decorrido na cirurgia e a ocorrência de OMB entre os animais de diferentes grupos. Além disso, para essa mesma análise, os dentes foram avaliados quanto ao número de raízes fraturadas por outro auxiliar que desconhecia a que grupo o animal pertencia (CONTE-NETO et al., 2012).

5.6 Análise Radiográfica Digital (mandíbulas)

Após o sacrifício, no 70º dia, as mandíbulas foram excisadas cirurgicamente e hemisseccionadas por um único operador e, em seguida, armazenadas em formol neutro 10%. As hemimandíbulas direitas foram utilizadas como controle em todos os grupos. Em seguida, as hemimandíbulas esquerdas, de todos os grupos submetidos à exodontia prévia, foram radiografadas em aparelho de raio-X convencional (DabiAtlante®; 63Kvp, 8mA) acoplado ao sistema de captura digital de imagem Digora®. A técnica radiográfica empregada foi a do paralelismo (cone longo) utilizando-se posicionador com localizador. As hemimandíbulas foram posicionadas paralelamente ao filme radiográfico e a distância foco-filme era de 10 cm. O tempo de exposição ficou estabelecido em 0,18 segundos em função para radiografia digital periapical de bateria dentária anterior superior (13-23).

As radiografias foram exportadas para o formato de imagem *.jpeg* para análise quantitativa por meio do software de análise de imagem Image J® (Wayne Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Services Research Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.). Após aleatorização (comando aleatorização, Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation®), um operador, que desconhecia a que animal pertencia cada radiografia, mensurou em triplicata a área radiolúcida sugestiva de OMB nos sítios pós-exodontias através do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*). Foi considerada como unidade amostral a média aritmética das três mensurações, quantificada em pixels (SILVA, 2013).

5.7 Confeção de lâminas histológicas e estudo histomorfométrico das mandíbulas

Após a avaliação imaginológica, as hemimandíbulas foram descalcificadas (suspensão) em Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) 10%, pH 7,3 (NaOH), (KEKLIKOGLU, 2004) por quatro semanas, com trocas a cada dez dias. Posteriormente, o material foi cortado e submetido ao processamento histológico através do sistema automatizado PT05 LupTec® para confecção de lâminas histológicas com fragmentos de 4 µm de espessura, as quais foram coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) para posterior análise por microscopia de luz convencional.

Após análise descritiva, as lâminas histológicas foram fotografadas em 10 (dez) campos microscópicos de grande aumento (400x) no sítio referente à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e contadas por um operador que desconhecia a que grupo pertencia cada animal. Os campos foram selecionados iniciando-se sempre na borda anterior do alvéolo pós-extração e seguindo para posterior, de modo a não repetir as áreas fotografadas. As imagens foram lançadas no software Image J® (Wayne Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Services Research Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.) e, através do comando *cell counter*, pode-se mensurar os números de lacunas de osteócitos vazias e com células viáveis (JILKA, NOBLE, WEISNTEIN, 2013). O número de osteoclastos com vitalidade e com sinais histológicos de apoptose (hipo ou hiper cromatismo nuclear e presença de múltiplos vacúolos intracitoplasmáticos) também foi contado (PAZIANAS 2010; HANSEN et al., 2006; HALLEEN et al., 1999). O somatório dos campos de cada lâmina foi considerado como unidade amostral, e utilizaram-se os percentuais de lacunas de osteócitos vazias e de osteoclastos em apoptose para avaliação quantitativa. Além disso, o percentual de animais com presença de colônias bacterianas no osso mandibular e o número de polimorfonucleares neutrófilos também foram contados para avaliação quantitativa (SILVA, 2013).

5.8 Coleta de sangue e análise de parâmetros hematológicos

Foram coletados 2 ml de sangue do plexo retro-orbital do animal, com a ajuda de capilares de vidro, para realização de hemograma completo dos animais. A coleta foi realizada no dia -1, antes da administração dos anti-inflamatórios, sendo mantida semanalmente até o dia 69.

As amostras de sangue foram armazenadas em 0,2 ml de solução 1% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico (0,1 ml de EDTA para cada 1 ml de sangue) e levadas imediatamente para o Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará onde foram homogeneizadas manualmente.

As amostras foram submetidas à análise hematológica de hemograma completo por método automatizado por princípio de impedância (Sysmex KX 21N, Roche®). Foi mensurado quantitativamente o eritrograma (número total de células da série vermelha, dosagens de hemoglobina, hematócrito e índice de anisocitose), a plaquetometria e o número total de leucócitos e linfócitos, sendo obtido o número de neutrófilos e monócitos por subtração.

5.9 Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais

5.9.1 Análise da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas no dia -1 e, após este, semanalmente, durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (em gramas) em relação à massa inicial.

5.9.2 Índices gástrico, hepático, renal e esplênico

No dia do sacrifício, os animais tiveram fígado, os rins, esquerdo e direito, baço e estômago removidos e pesados em balança analítica de valor aproximado 10^{-5} g. Os valores foram expressos como o índice do respectivo órgão (peso úmido de cada órgão dividido pela massa corpórea do animal no dia do sacrifício).

5.9.3 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço

Após serem pesados, os órgãos retirados dos animais no dia do sacrifício foram armazenados em solução de formol 10% dissolvido em tampão fosfatado. Quarenta e oito horas depois, os mesmos foram lavados em água corrente e analisados macroscopicamente, sendo examinadas alterações na forma, coloração e consistência, e armazenados em álcool 70%. Posteriormente, as peças foram seccionadas, colocadas em cassetes e seguidas para

processamento histotécnico automatizado. Cortes de 4 µm de espessura foram feitos para confecção de lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina e montadas em bálsamo de Canadá (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983; TIMM, 2005) para análise em microscópio de luz convencional quanto à presença de alterações específicas de cada órgão, realizada por um único examinador.

5.9.3.1 Estômago

Para analisar a toxicidade do tratamento com dexametasona ou nimesulida associados ou não a infusões de ácido zoledrônico, a partir das lâminas da superfície estomacal, foram observadas duas regiões: cárdia e fúndica/corpo.

Na região de cárdia foram analisados os seguintes parâmetros (GRAVES, 2007):

- a) Integridade do epitélio escamoso de revestimento;
- b) Presença de vasos ectásicos e/ou hemorragia na submucosa e mucosa;
- c) Presença de células inflamatórias;
- d) Presença de ulceração.

Na região de fundo e corpo, foram considerados para análise:

- a) Integridade do revestimento de mucosa;
- b) Presença de células parietais e principais;
- c) Presença de vasos ectásicos e/ou hemorragia na submucosa e mucosa;
- d) Presença de células inflamatórias;
- e) Presença de ulceração.

5.9.3.2 Fígado

As lâminas referentes ao tecido hepático foram avaliadas por meio de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010):

- a) Infiltração de células inflamatórias;
- b) Tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos;
- c) Hiperplasia de células de Kupffer;
- d) Degeneração balonizante dos hepatócitos;
- e) Congestão vascular portal e da veia centrolobular;
- f) Hemorragia sinusoidal;

- g) Fibrose;
- h) Necrose de hepatócitos;
- i) Esteatose micro vesicular (>5%) em hepatócitos;
- j) Esteatose macro vesicular (>5%) em hepatócitos.

5.9.3.3 Rim

Já para as lâminas referentes ao tecido renal, também foram utilizados os mesmos parâmetros de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010):

- a) Tumefação do epitélio tubular;
- b) Congestão glomerular e intersticial;
- c) Vacuolização isomérica do epitélio tubular;
- d) Células inflamatórias intersticiais;
- e) Presença de cilindro-hialino;
- f) Presença de fibrose.

5.9.3.4 Baço

Para análise de toxicidade do baço, foram analisadas a presença e/ou ausência dos seguintes parâmetros:

- a) Congestão e hemorragia da polpa vermelha;
- b) Presença de pigmentos de hemossiderina;
- c) Hematopoiese extra-medular;
- d) Atrofia esplênica
- e) Hiperplasia da polpa branca;
- f) Presença de fibrose.

5.10 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste ANOVA, unifatorial ou multifatorial, pareado ou não pareado, associado ao pós-teste de Bonferroni, a depender da indicação, e expressos em forma de Média±EPM.

Os dados dicotômicos (ausência ou presença) foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste Exato de Fisher.

Foi calculada a área sobre a curva para análise de parâmetros hematológicos (Hemácias, hemoglobina, hematócrito, índice de anisocitose, plaquetas, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos) e variação de massa corpórea.

Análise de correlação pelo método linear de Pearson foi utilizada para relacionar parâmetros de dificuldade cirúrgica.

Em todas as análises, foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism 5.0® e foi considerado nível de significância $p < 0,05$ para todas as análises.

6 RESULTADOS

6.1 Análise da Dificuldade Cirúrgica

A análise da dificuldade cirúrgica foi composta pela avaliação de dois parâmetros: número de fraturas radiculares ocorridas no momento da exodontia e tempo cirúrgico necessário para remoção do dente.

O tempo decorrido para realização da exodontia do primeiro molar inferior não diferiu estatisticamente entre os grupos controles tratados com anti-inflamatórios [Dexametasona 0,04 ($89,8 \pm 8,9$ s); dexametasona 0,4 ($116,9 \pm 13,8$ s); dexametasona 4 mg/kg ($89,3 \pm 5,7$ s); Nimesulida ($90,3 \pm 11,3$ s)] em relação a seu respectivo grupo salina ($118,6 \pm 19,8$ s) ($p=0,378$, 1-way-ANOVA/Bonferroni). Entretanto, o grupo submetido à OMB e tratado com maior dose de dexametasona (4 mg/kg) necessitou, significativamente, de maior tempo para realização de exodontia ($136,8 \pm 12,0$ s) do que o grupo salina-OMB ($88,6 \pm 6,3$ s) ($p<0,01$, 1-way-ANOVA/Bonferroni). Os grupos que receberam infusões de AZ (EV) [Dexametasona 0,04 ($88,6 \pm 6,3$ s); dexametasona 0,4 ($87,5 \pm 6,9$ s); dexametasona 4 mg/kg ($136,8 \pm 12,0$ s); Nimesulida ($0,8 \pm 0,4$ s)] não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação a esse parâmetro quando comparados a seus respectivos grupos controles, não submetidos à terapia com AZ (EV) ($p=0,791$, 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 5A).

Não houve diferença estatisticamente significante no número de fraturas ocorridas durante a exodontia do primeiro molar inferior entre animais tratados com anti-inflamatórios dos grupos controles [Dexametasona 0,04 ($1,3 \pm 0,5$); dexametasona 0,4 ($1,1 \pm 0,3$); dexametasona 4 mg/kg ($1,7 \pm 0,5$); Nimesulida ($0,8 \pm 0,4$), $p=0,481$, 1-way-ANOVA/Bonferroni] ou submetidos à OMB [Dexametasona 0,04 ($0,9 \pm 0,4$); dexametasona 0,4 ($0,5 \pm 0,3$); dexametasona 4 mg/kg ($1,6 \pm 0,5$); Nimesulida ($0,7 \pm 0,3$)] ($p=0,142$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) quando comparados aos respectivos grupos salina [Salina-controle ($0,8 \pm 0,3$); Salina-OMB ($0,3 \pm 0,2$)]. Os grupos submetidos à OMB não apresentaram diferenças significantes em relação aos respectivos grupos controle no que diz respeito a esse parâmetro ($p=0,139$, 2-way-ANOVA/Bonferroni), mostrando uma homogeneidade do dano cirúrgico em todos os animais (Figura 5B).

A análise de correlação entre o número de fraturas radiculares e o tempo cirúrgico revelou uma correlação significativa, porém fraca ($p=0,0126$, $r=0,281$, Análise de

correlação de Pearson), associando um maior tempo cirúrgico ao maior número de fraturas (Figura 5C).

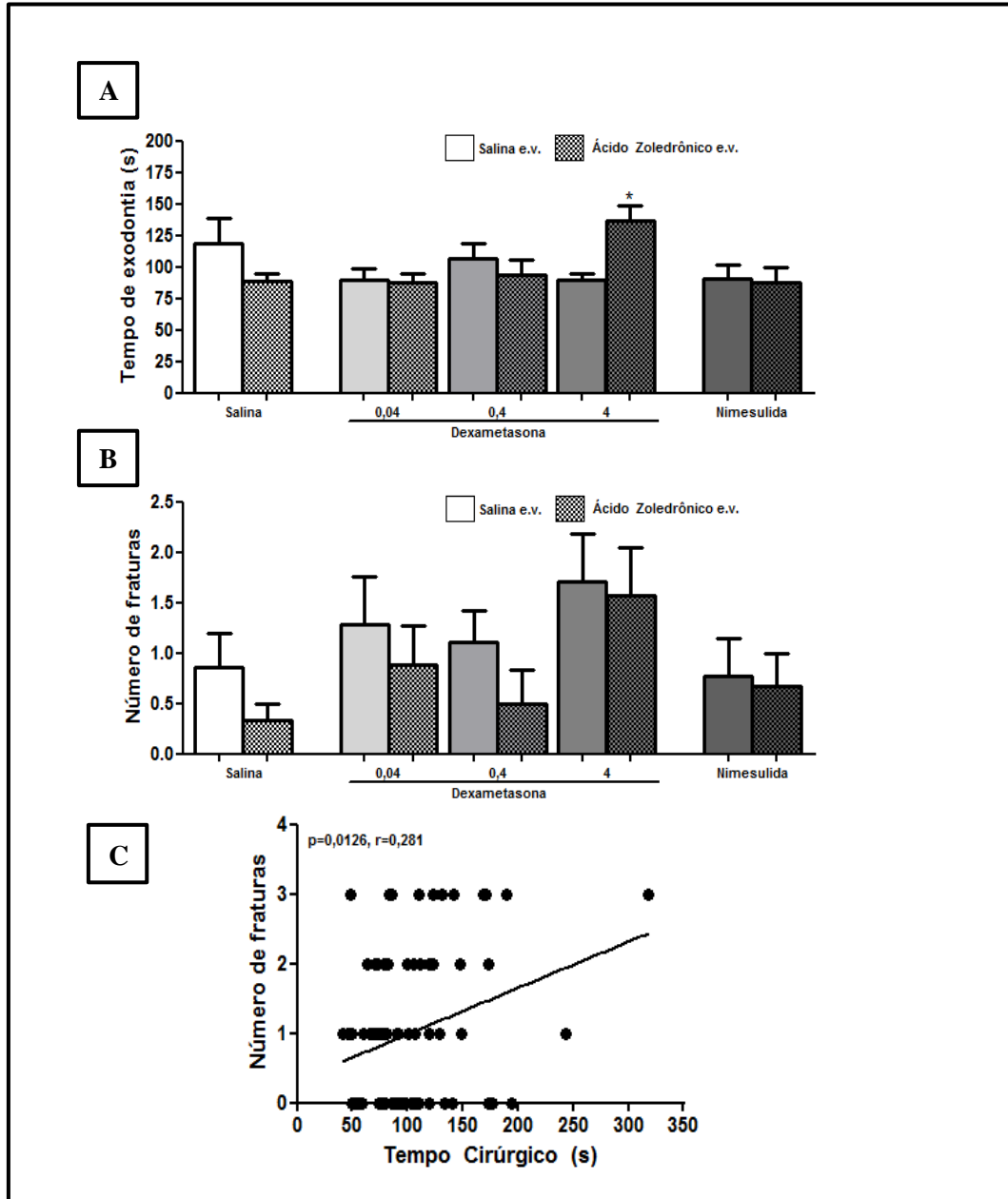


Figura 5. Análise da dificuldade cirúrgica. (A): O tempo de exodontia do 1º molar inferior foi maior de forma significativa no grupo que recebeu associação de tratamentos AZ e DEX 4 mg/kg em relação grupo salina-OMB ($p<0,01$ em relação ao grupo OMB tratado com salina, ANOVA/Bonferroni, Média±EPM). (B): O número de fraturas radiculares não diferiu de maneira significativa entre os grupos OMBs e controles ($*p<0,05$, ANOVA 1-way/Bonferroni, Média±EPM) (C): A análise de correlação mostrou associação significativa e fracamente positiva entre tempo cirúrgico e número de fraturas ($r=0,281$, $p=0,0126$, análise de correlação de Pearson).

6.2 Análise Radiográfica Digital (mandíbulas)

A área radiolúcida sugestiva de necrose aferida a partir das radiografias digitais das mandíbulas foi significativamente maior nos grupos que receberam infusão de ácido zoledrônico (EV) tratados com salina (1019,61±208,65 pixels), dexametasona (0,04 mg/kg (886,83±155,83 pixels); 0,4 mg/kg (1087,00±296,76 pixels); 4 mg/kg (1016,83±152,23 pixels) e nimesulida (993,33±140,63 pixels) em relação aos respectivos grupos controle [Salina (197,40±87,25 pixels), dexametasona 0,04 mg/kg (40,29±40,29 pixels); dexametasona 0,4 mg/kg (134,25±89,82 pixels); dexametasona 4 mg/kg (65,25±65,25 pixels); nimesulida (183,57±94,29 pixels)] ($p<0,01$; 2-way-ANOVA/Bonferroni; Média±EPM) (Figura 4). Entretanto, não houve diferenças entre cada um dos tratamentos com AIs empregados e submetidos à OMB e o grupo que recebeu solução salina e ácido zoledrônico em relação à área osteolítica ($p=0,896$, 1-way-ANOVA/Bonferroni). Dois animais do grupo tratado com a maior dose de dexametasona (4 mg/kg), associado à infusão de AZ apresentaram osteosclerose difusa da margem da lâmina dura no sítio pós-exodontia. Os grupos controle tratados com AIs não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao grupo salina correspondente em relação a esse parâmetro e os sítios de exodontia estavam aparentemente cicatrizados ($p=0,609$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 6; figura 7).

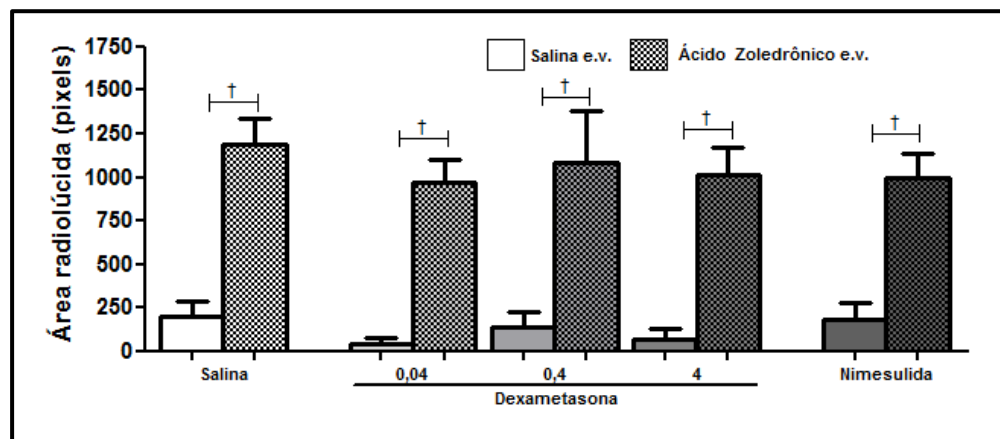


Figura 6. Área radiolúcida, em pixels, presente no sítio de exodontia dos grupos controles e grupos OMB tratados com dexametasona ou nimesulida no dia 70. Os grupos submetidos a infusões de ácido zoledrônico (EV) evidenciaram área osteolítica estatisticamente superior aos respectivos grupos controle ($†p<0,01$ em relação a cada grupo controle de anti-inflamatório ou salina, 2-way-ANOVA/Bonferroni, Média±EPM).

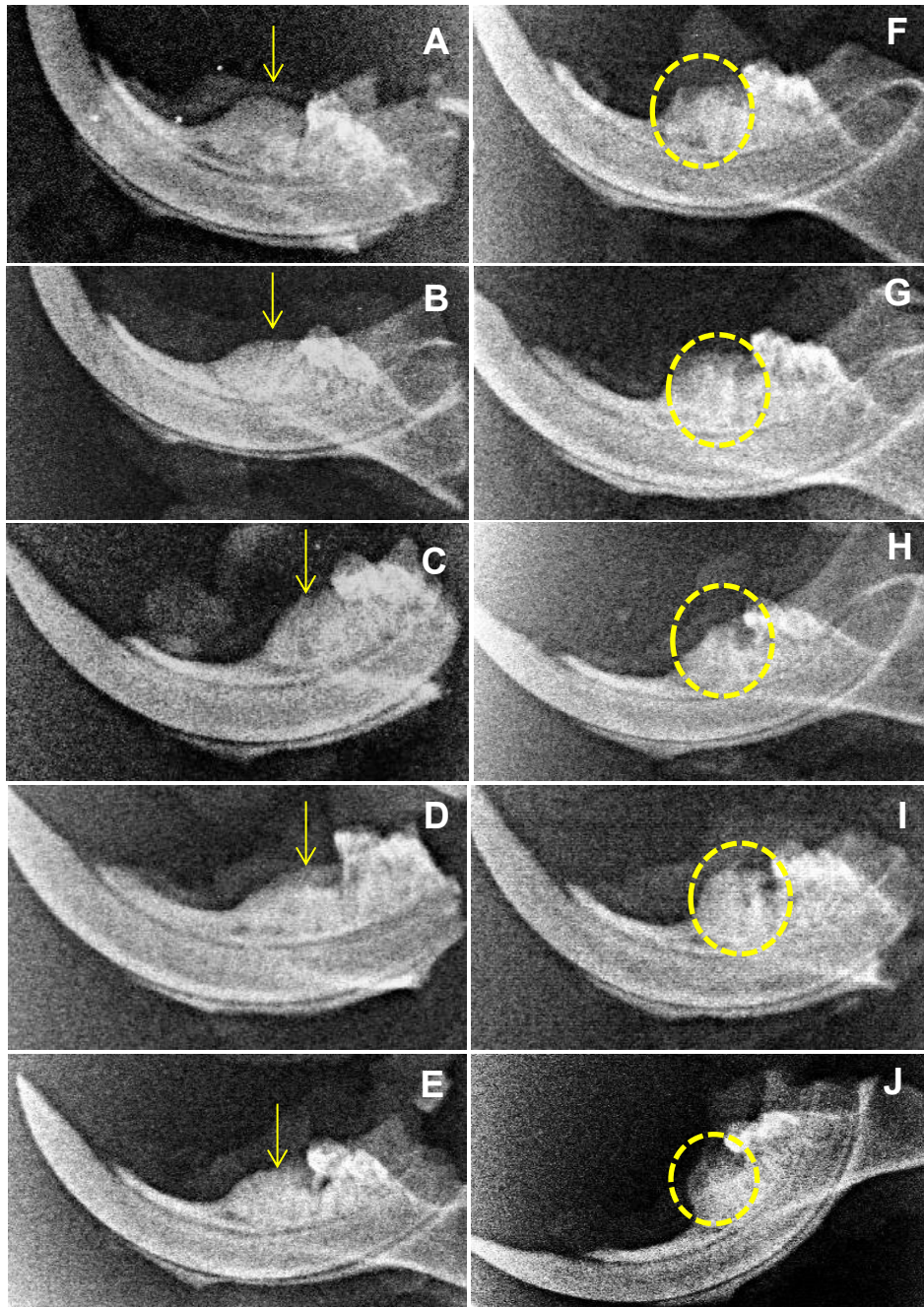


Figura 7. Aspectos radiográficos do sítio de exodontia dos animais controle e submetidos à osteonecrose tratados com diferentes regimes de anti-inflamatórios. (A, B, C, D, E) Área compatível com o sítio de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo dos animais controle tratados com salina, DEX 0,04 mg/kg, DEX 0,4 mg/kg, DEX 4 mg/kg, NIM, respectivamente, exibindo área radiopaca, representativa de total cicatrização do osso alveolar. (F, G, H, I, J) Sítio de extração dos animais submetidos às infusões de ácido zoledrônico e tratados com salina, DEX 0,04 mg/kg, DEX 0,4 mg/kg, DEX 4 mg/kg, NIM, respectivamente, mostrando área radiolúcida sugestiva de osteonecrose quatro semanas após a exodontia do primeiro molar inferior. (DEX: dexametasona; NIM: nimesulida)

6.3 Estudo histomorfométrico das mandíbulas

A análise histopatológica dos sítios de exodontia revelou que os animais dos grupos controle apresentavam osso organizado e celularizado, com atividade osteoblástica e raros osteoclastos, sem alterações histopatológicas, além de eventuais focos inflamatórios residuais ao redor do sítio de exodontia. Havia tecido conjuntivo fibroso denso e o epitélio pavimentoso estratificado de revestimento mostrava-se íntegro. Em relação aos grupos submetidos à OMB, o osso mandibular exibia inúmeras lacunas de osteócitos vazias, com osteoclastos apoptótico (núcleos picnóticos e vacuolização citoplasmática) e áreas de intensa inflamação, constituída, predominantemente, por polimorfonucleares neutrófilos (Figura 9).

Para o estudo histomorfométrico das hemimandíbulas os seguintes parâmetros foram avaliados: percentual de osteoclastos apoptóticos, percentual de lacunas de osteócitos vazias, percentual de animais com colônias bacterianas presentes e número de polimorfonucleares neutrófilos.

O percentual de osteoclastos apoptóticos foi estatisticamente similar entre grupos controles tratados com AIs e grupo salina ($p=0,719$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 8A). O tratamento com dexametasona ou nimesulida associado às infusões de ácido zoledrônico aumentou de maneira significativa o percentual de osteoclastos apoptóticos em relação ao grupo tratado apenas com o aminobisfosfonato [Salina ($56,1\pm 6,5$ %); dexametasona 0,04 mg/kg ($88,7\pm 3,4$ %); dexametasona 0,4 mg/kg ($90,5\pm 4,6$ %), dexametasona 4 mg/kg ($95,2\pm 2,1$ %), nimesulida ($92,8\pm 7,1$ %), $p<0,001$, 1-way-ANOVA/Bonferroni, Média \pm EPM] (Figura 8A). As hemimandíbulas dos grupos OMB apresentaram um percentual de osteoclastos apoptóticos significativamente maior do que os respectivos grupos controles [Salina ($0,7\pm 0,7$ %); Dexametasona 0,04 mg/kg ($3,7\pm 1,8$ %); dexametasona 0,4 mg/kg ($15,3\pm 7,4$ %), dexametasona 4 mg/kg ($12,5\pm 8,0$ %), nimesulida ($16,7\pm 16,7$ %)] ($p<0,0001$, 2-way-ANOVA/Bonferroni, Média \pm EPM) (Figura 8A).

Em relação ao percentual de lacunas de osteócitos vazias não foram encontradas diferenças significantes em os grupos controles tratados com AIs ou salina ($p=0,095$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 8B). O tratamento com os AIs associado às infusões de AZ também não foi eficaz em ocasionar mudanças significantes nesse parâmetro comparado ao grupo que recebeu unicamente o bisfosfonato ($p=0,604$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 8B). Entretanto, os grupos submetidos à OMB

[Salina (55,6±8,6 %); dexametasona 0,04 mg/kg (54,0±7,1 %); dexametasona 0,4 mg/kg (60,8±12,5 %), dexametasona 4 mg/kg (70,3±5,6 %), nimesulida (52,0±12,8 %)] revelaram um percentual de lacunas de osteócitos vazias significativamente maior em relação a seus respectivos grupos controles [Salina (1,8±0,4 %); dexametasona 0,04 mg/kg (4,2±0,6 %); dexametasona 0,4 mg/kg (3,0±0,7 %), dexametasona 4 mg/kg (2,3±0,8 %), nimesulida (3,6±1,4 %)] ($p < 0,0001$, 2-way-ANOVA/Bonferroni, Média±EPM) (Figura 8B).

Os grupos controles não exibiram colônias bacterianas no sítio de exodontia, sendo estatisticamente semelhantes entre si em relação a esse parâmetro ($p = 1,00$, Qui-quadrado) (Figura 8C). Entre os grupos OMB, os animais tratados com as duas maiores doses de dexametasona [Dexametasona 0,4 mg/kg (5; 100%); dexametasona 4 mg/kg (7; 100%)] apresentaram maior e significante percentual de animais com colônias bacterianas quando comparados ao grupo submetido apenas às infusões ácido zoledrônico (4; 50%) ($p < 0,05$, Qui-quadrado) (Figura 8C). Todos os grupos OMB [Salina (4; 50%); dexametasona 0,04 mg/kg (2; 25%); dexametasona 0,4 mg/kg (5; 100%); dexametasona 4 mg/kg (7; 100%), nimesulida (1; 20%)] exibiram presença de colônias bacterianas, de forma significante, em relação a seus respectivos grupos controle [Salina (0; 0%); dexametasona 0,04 mg/kg (0; 0%); dexametasona 0,4 mg/kg (0; 0%); dexametasona 4 mg/kg (0; 0%), nimesulida (0; 0%)] ($p < 0,004$, Qui-quadrado) (Figura 8C).

A contagem do número de polimorfonucleares neutrófilos revelou que todos os grupos submetidos à OMB e tratados com salina (439,4±126,0) ou dexametasona [Dexametasona 0,04 (595,8 ± 145,5); dexametasona 0,4 (759,2 ± 238,2); dexametasona 4 mg/kg (747,7 ± 171,5)] apresentaram significante aumento nesse parâmetro, quando foram comparados aos respectivos grupos controle [Salina (0,8 ± 0,6); dexametasona 0,04 (2,3 ± 0,7), dexametasona 0,4 (20 ± 6,3), dexametasona 4 mg/kg (59,4 ± 21,3)] ($p < 0,0001$, 1-way-ANOVA/Bonferroni, Média ± EPM) (Figura 8D). Dentre os grupos submetidos à OMB, os animais tratados com dexametasona, independente da dose, apresentaram maior número de polimorfonucleares neutrófilos em relação ao grupo que recebeu as infusões de ácido zoledrônico e foi tratado com salina ($p < 0,05$, 1-way-ANOVA/Bonferroni, Média ± EPM) (Figura 8D). Entretanto, o grupo nimesulida submetido à OMB (410,8 ± 359,3) apresentou redução significante no número de polimorfonucleares neutrófilos em relação ao grupo salina-OMB ($p < 0,05$, 1-way-

ANOVA/Bonferroni, Média \pm EPM) e não mostrou mudanças significativas quando comparados ao grupo controle correspondente ($51,7 \pm 15,8$) (Figura 8D).

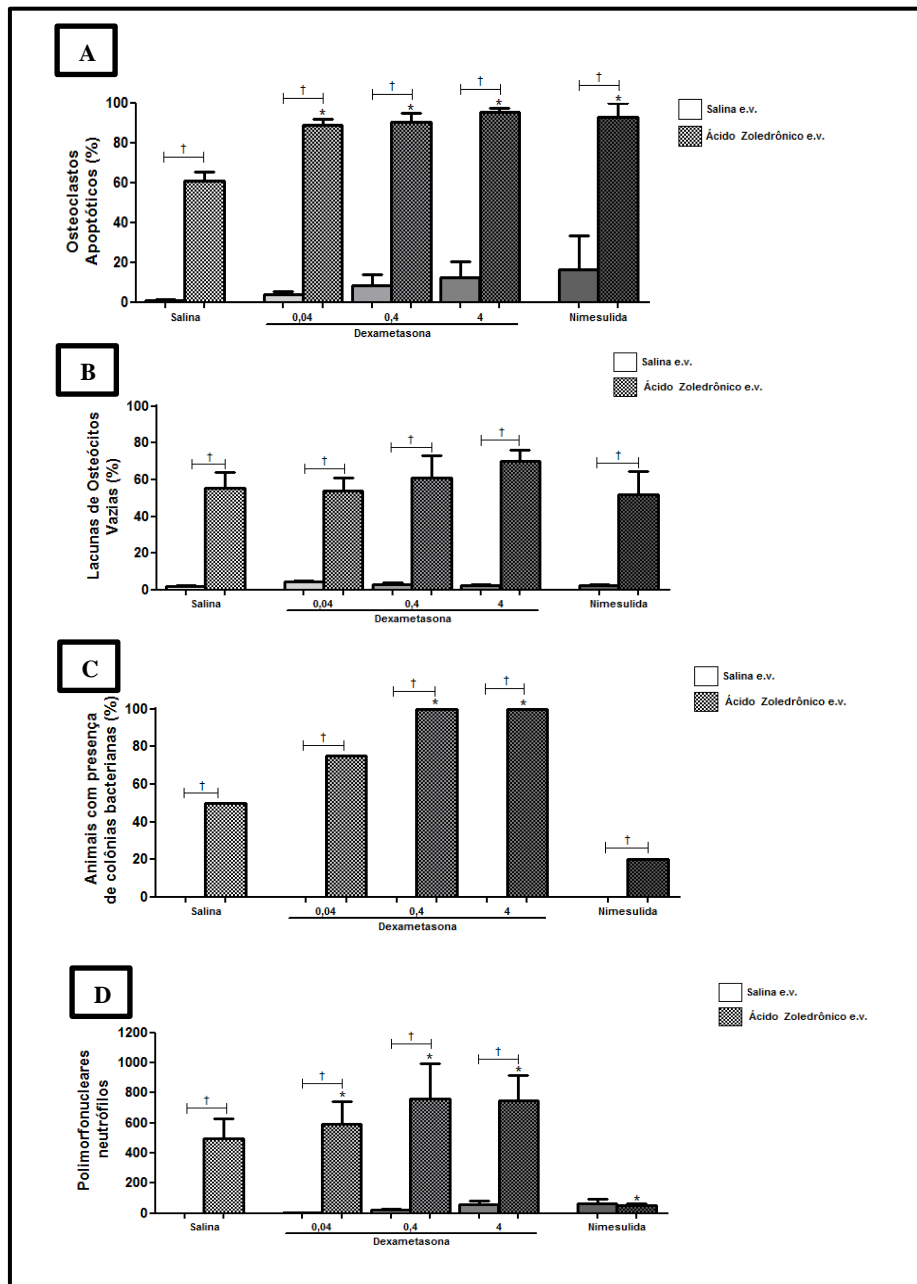


Figura 8. Análise histomorfométrica do sítio de exodontia de ratos controles e submetidos à OMB tratados com diferentes regimes de AIs. Os grupos que receberam ácido zoledrônico apresentaram aumento significativo do percentual de osteoclastos com sinais de apoptose ($p < 0,0001$) (A), do percentual de lacunas de osteócitos vazias (B), do percentual de animais com colônias bacterianas presente (C) e da contagem de polimorfonucleares neutrófilos (D) em relação aos grupos controle. Os grupos tratados com anti-inflamatórios e submetidos à OMB ainda mostraram maior percentual de osteoclastos com sinais de apoptose em relação ao grupo OMB-salina ($p < 0,0001$). Os grupos submetidos à OMB que receberam dexametasona 0,4 e 4 mg/kg apresentaram maior percentual de animais com presença de colônias bacterianas no sítio pós-exodontia quando comparados ao respectivo salina. Além disso, todos os animais que receberam AZ e foram tratados com dexametasona apresentaram aumento significativo do número de polimorfonucleares neutrófilos no alvéolo pós-exodontia quando comparados ao salina correspondente, enquanto que aqueles tratados com nimesulida mostraram redução na contagem dessas células. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina-OMB (Média \pm EPM; 1-way-ANOVA/Bonferroni); † $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (Média \pm EPM; 2-way-ANOVA/Bonferroni).

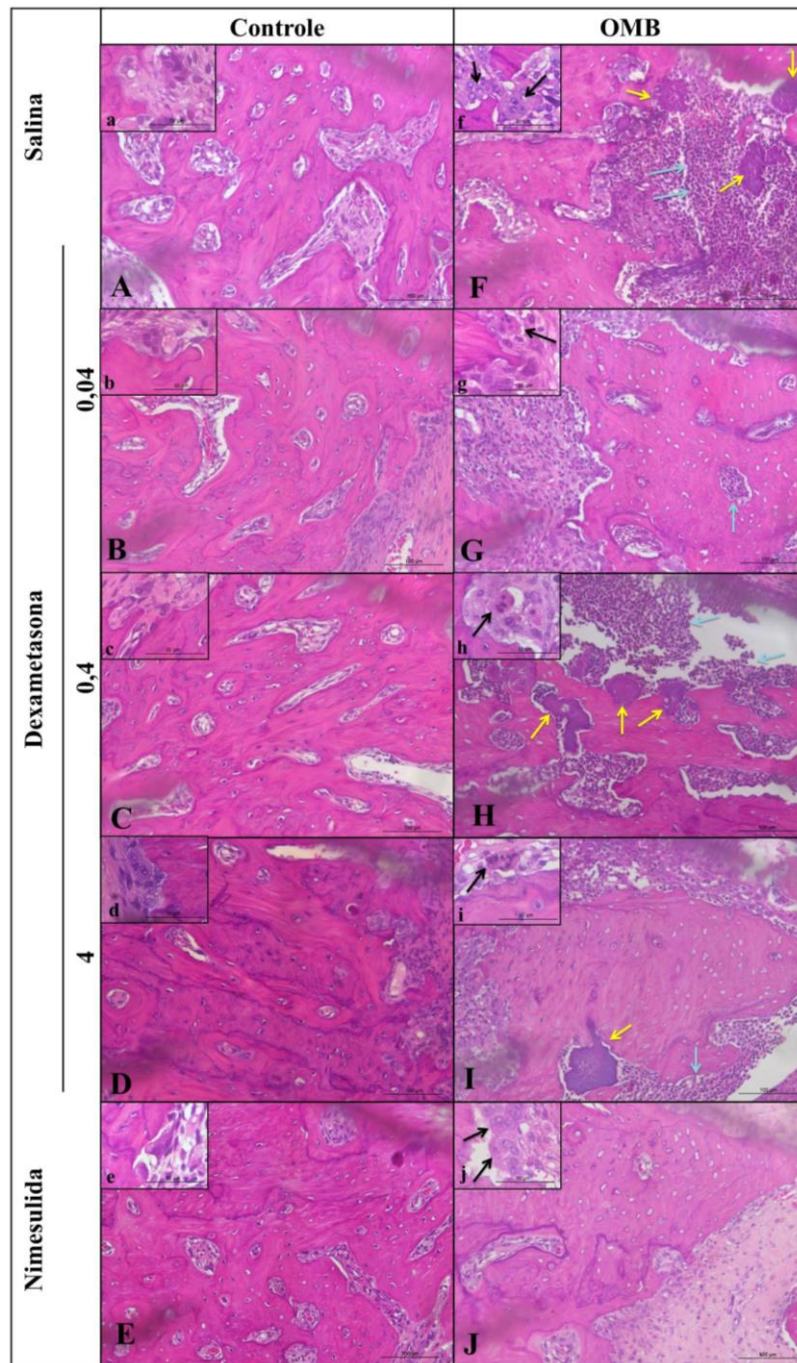


Figura 9. Aspectos histológicos do sítio de exodontia em animais OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes. A-E; a-e: Grupos Controles tratados com salina ou anti-inflamatórios. (A-E): Sítio de exodontia dos animais controle 28 dias após o procedimento cirúrgico exibindo tecido ósseo de elevada celularidade, preenchido por osteócitos e com ausência de infiltrado inflamatório. (a-e) No detalhe observam-se raros osteoclastos sem alterações citoplasmáticas ou nucleares. **F-f: Grupo OMB-Salina; G-g: Grupo OMB- Dexametasona 0,04 mg/kg.** (F, G) Sítio de exodontia dos animais tratados com salina ou dexametasona 0.04 mg/kg e submetidos à OMB, evidenciando osso desvitalizado, lacunas de osteócitos vazias, intenso infiltrado inflamatório neutrofílico (setas azuis) e presença de colônias bacterianas (setas amarelas). (f, g): No detalhe observam-se osteoclastos apoptóticos próximos ao tecido ósseo necrosado (setas pretas). **H-h: Grupo OMB- Dexametasona 0,4 mg/kg; I-i: Grupo OMB- Dexametasona 4 mg/kg.** (H, I) Sítio de exodontia dos animais tratados com dexametasona 0.4 mg/kg ou 4 mg/kg e submetidos à OMB, exibindo osso desvitalizado e infiltrado inflamatório neutrofílico (setas azuis) próximo ao tecido ósseo, com colônias bacterianas sugestivas de *Actinomyces* (setas amarelas). (h, i) No detalhe, osteoclastos com picnose nuclear (setas pretas). **J-j: Grupo OMB- Nimesulida.** (J) Sítio de exodontia dos animais tratados com nimesulida e submetidos à OMB, mostrando osso desvitalizado, com lacunas de osteócitos vazias e a presença de numerosos osteoclastos com vacuolização citoplasmática (setas pretas), vista no detalhe (i). Hematoxilina-Eosina (200-400x).

6.4 Análise de Parâmetros Hematológicos

6.4.1 Eritrograma (*Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito*)

A área sob a curva referente à contagem de hemácias revelou que os grupos que receberam infusões de AZ [Salina (60,5); dexametasona 0,04 mg/kg (61,0); dexametasona 0,4 (61,0); dexametasona 4 mg/kg (63,1); nimesulida (59,7)] apresentaram menor número de hemácias quando comparados a seus respectivos controles [Salina (65,8); dexametasona 0,04 mg/kg (69,1); dexametasona 0,4 (68,8); dexametasona 4 mg/kg (67,7); nimesulida (66,9)]. Dentre os animais controles, notou-se homogeneidade na área sobre a curva calculada a partir do número de hemácias. De maneira semelhante, percebeu-se que a área calculada para contagem de hemácias foi similar entre os grupos OMB tratados com AIs em relação ao salina correspondente (Tabela 1).

Quando comparados aos respectivos controles [Salina (119,8); dexametasona 0,04 mg/kg (125,9); dexametasona 0,4 (126,7); dexametasona 4 mg/kg (121,2); nimesulida (122,9)], os grupos que receberam indução de OMB e foram tratados com salina, dexametasona 0,4 e 4 mg/kg ou nimesulida [Salina (116,3); dexametasona 0,04 mg/kg (120,0); dexametasona 0,4 (110,5); dexametasona 4 mg/kg (115,7); nimesulida (113,1)] apresentaram redução na área sobre a curva calculada para a hemoglobina. Os animais controles tratados com AIs mostraram comportamento semelhante da área sobre a curva quando comparados aos salina correspondente. O mesmo ocorreu com os grupos OMB tratados com AIs em relação ao salina correspondente (Tabela 1).

No que se refere à análise de área sobre a curva calculada para o hematócrito, notou-se que os animais submetidos a infusões de AZ [Salina (359,7); dexametasona 0,04 mg/kg (358,7); dexametasona 0,4 (348,7); dexametasona 4 mg/kg (360,6); nimesulida (359,2)] apresentaram redução desse parâmetro em relação a animais controles [Salina (369,7); dexametasona 0,04 mg/kg (378,0); dexametasona 0,4 (378,8); dexametasona 4 mg/kg (373,6); nimesulida (384,1)]. Grupos controles tratados com anti-inflamatórios exibiram área sobre a curva similar a do respectivo grupo salina. Do mesmo modo, animais submetidos a infusões de AZ e tratados com AIs apresentaram comportamento da área sobre a curva calculada para o hematócrito semelhante ao grupo salina-OMB (Tabela 1).

6.4.2 Índice de anisocitose (RDW)

A área sobre a curva calculada para o índice de anisocitose foi maior nos animais OMB [Salina (191,3); dexametasona 0,04 mg/kg (190,2); dexametasona 0,4 (180,3); dexametasona 4 mg/kg (190,1); nimesulida (202,6)] quando comparados aos respectivos controles [Salina (156,2); dexametasona 0,04 mg/kg (145,3); dexametasona 0,4 (155,5); dexametasona 4 mg/kg (149,8); nimesulida (154,7)] (Tabela 1).

Além disso, grupos controles tratados com AIs apresentaram comportamento semelhante ao salina correspondente em relação a esse parâmetro (Tabela 1).

Nos grupos que receberam infusão de AZ e foram tratados com AIs, o RDW demonstrou área sobre a curva similar ao grupo OMB-salina (Tabela 1).

6.4.3 Plaquetometria

A infusão de ácido zoledrônico esteve associada à redução do número de plaquetas dos animais OMB [Salina (69,0); dexametasona 0,04 mg/kg (77,4); dexametasona 0,4 (76,9); dexametasona 4 mg/kg (73,6); nimesulida (67,0)], que mostraram área sobre a curva reduzida em relação a esse parâmetro quando comparados aos respectivos controles [Salina (77,1); dexametasona 0,04 mg/kg (85,9); dexametasona 0,4 (82,3); dexametasona 4 mg/kg (75,1); nimesulida (81,6)] (Tabela 1).

Entre os grupos controle, a área sobre a curva em relação ao número de plaquetas apresentou-se semelhante em todos os animais tratados com AIs quando comparados aos respectivos salina (Tabela 1).

A associação AZ + anti-inflamatórios também não ocasionou mudanças na área sobre a curva referente ao número de plaquetas em relação ao grupo OMB-salina (Tabela 1).

6.4.4 Leucograma (*Leucócitos, Linfócitos, Neutrófilos e Monócitos*)

A área sobre a curva do número de leucócitos totais revelou que os grupos OMB [Salina (98,6); dexametasona 0,04 mg/kg (84,9); dexametasona 0,4 (68,6); dexametasona 4 mg/kg (57,9); nimesulida (81,7)] apresentaram maior área calculada para esse parâmetro quando comparados aos respectivos controles [Salina (67,1); dexametasona 0,04 mg/kg (59,6); dexametasona 0,4 (44,0); dexametasona 4 mg/kg (36,2); nimesulida (59,7)]. Dentre os animais controle, aqueles tratados com dexametasona apresentaram redução do número de leucócitos totais em relação ao grupo salina correspondente, o que ocorreu de maneira dose-dependente. De maneira semelhante, os grupos OMB tratados com dexametasona também apresentaram redução da contagem de leucócitos em relação aos animais OMB-salina, mostrando também menor número dessas células e, por conseguinte, menor área sobre a curva calculada, quanto maior fosse a dose de anti-inflamatório esteroidal administrado (Tabela 1).

O aumento de leucócitos observado em grupos OMB parece ter sido ocasionado pelo aumento do número de linfócitos, uma vez que os grupos que receberam infusão de AZ [Salina (89,0); dexametasona 0,04 mg/kg (73,5); dexametasona 0,4 (57,2); dexametasona 4 mg/kg (46,0); nimesulida (74,4)] mostraram maior área sobre a curva em relação a esse parâmetro quando comparados aos respectivos controles [Salina (52,4); dexametasona 0,04 mg/kg (47,0); dexametasona 0,4 (29,0); dexametasona 4 mg/kg (24,3); nimesulida (47,6)]. Nos animais controle tratados com dexametasona, também se observa redução da área sobre a curva calculada para contagem de linfócitos, o que é visto de maneira dose-dependente, e confirma que a leucopenia causada pela administração desse AI ocorreu às custas de linfócitos. O mesmo ocorreu nos animais OMB tratados com dexametasona, estando esse fármaco associado à linfopenia e leucopenia, de maneira dose-dependente, quando comparados a animais OMB-salina (Tabela 1).

No que diz respeito à área sob a curva calculada para neutrófilos e monócitos, observou-se que os animais submetidos às infusões de AZ [Salina (9,4); dexametasona 0,04 mg/kg (10,3); dexametasona 0,4 (10,7); dexametasona 4 mg/kg (10,4); nimesulida (7,6)] apresentaram redução nesse parâmetro quando comparados aos respectivos controles [Salina (14,7); dexametasona 0,04 mg/kg (17,5); dexametasona 0,4 (15,0); dexametasona 4 mg/kg (12,0); nimesulida (12,1)]. Além disso, os animais controles que receberam tratamento com dexametasona 0,04 mg/kg mostraram aumento da contagem de neutrófilos e monócitos, o que foi mostrado reduzido nos grupos tratados com dexametasona 4 mg/kg e nimesulida. Dentre os animais OMB, aqueles tratados com dexametasona apresentaram discreto

aumento na área correspondente ao número de neutrófilos e monócitos, enquanto que aquele tratado com nimesulida, uma discreta redução quando comparados ao salina correspondente (Tabela 1).

Tabela 1. Área sob a curva de parâmetros hematológicos dos grupos controles e OMB.

	Controle					OMB				
	Salina	DEX 0.04	DEX 0.4	DEX 4	Nim	Salina	DEX 0.04	DEX 0.4	DEX 4	Nim
Eritrograma										
Hemácias	65,8	69,1	68,8	67,7	66,9	60,5	61,0	61,0	63,1	59,7
Hematócrito	369,7	378,0	378,8	373,6	384,1	359,7	358,7	348,7	360,6	359,2
Hemoglobina	119,8	125,9	126,7	121,2	122,9	116,3	120,0	110,5	115,7	113,1
RDW	156,2	145,3	155,5	149,8	154,7	191,3	190,2	180,3	190,1	202,6
Plaquetas	77,1	85,9	82,3	75,1	81,6	69,0	77,4	76,9	73,6	67,0
Leucograma										
Leucócitos	67,1	59,6	44,0	36,2	59,7	98,6	84,9	68,6	57,9	81,7
Linfócitos	52,4	47,0	29,0	24,3	47,6	89,0	73,5	57,2	46,0	74,4
Neutrófilos e Monócitos	14,7	17,5	15,0	12,0	12,1	9,4	10,3	10,7	10,4	7,6

6.5 Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais

6.5.1 Análise da variação de massa corpórea

Os grupos controles tratados com anti-inflamatórios mostraram variação de massa corpórea positiva em relação aos animais salina em praticamente todos os períodos de tempo analisados. No grupo tratado com a menor dose de dexametasona, essa diferença ocorreu nos dias 13, 27, 34, 48, 55, 69 ($p < 0,01$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni). O grupo tratado com a dose intermediária desse fármaco teve média de variação de massa corpórea estatisticamente superior ao grupo salina nos dias 48, 62 e 69 ($p < 0,01$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni), enquanto que os animais que receberam a maior dose de dexametasona (4 mg/kg) apresentaram diferenças significantes e positivas de ganho de massa corpórea a partir do dia 55 quando comparados ao salina correspondente ($p < 0,01$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni). Já aqueles tratados com nimesulida apresentaram variação de massa corpórea positiva e significativa em relação ao salina a partir do dia 6, permanecendo até o fim do protocolo experimental ($p < 0,05$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni) (Figura 10).

Em relação aos grupos submetidos à indução de OMB, os tratamentos com nimesulida ou com a menor dose de dexametasona (0,04 mg/kg) não influenciaram de forma significativa na massa corpórea dos animais em relação aos que receberam salina em nenhum dia experimental ($p > 0,05$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni). Entretanto, os grupos tratados com a dose intermediária (0,4 mg/kg) ($-21,0 \pm 2,7$ g) ou com a maior dose de dexametasona (4 mg/kg) ($-31,5 \pm 2,0$ g) apresentaram massa corpórea reduzida após a segunda infusão de AZ, no dia 13, quando comparados ao grupo salina submetido à OMB ($3,7 \pm 2,1$ g) ($p < 0,05$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni). Essa redução de massa corpórea significativa em relação aos animais OMB-salina se prolongou no grupo submetido às infusões de ZA e que foi tratado com a maior dose de dexametasona (4 mg/kg) até o penúltimo dia experimental (Figura 10).

Quando comparados a seus respectivos grupos controle, todos os animais tratados com AIs apresentaram perda de peso após a segunda infusão de AZ, na terceira semana experimental (dia 13) ($p < 0,01$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni). O grupo tratado com a maior dose de dexametasona (4 mg/kg) associado às administrações de ácido zoledrônico mostrou redução de peso significativa no dia 34 e a partir do dia 48 até o final do protocolo experimental, quando comparado ao grupo controle tratado com a mesma

dose de dexametasona ($p < 0,001$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni). O grupo OMB que recebeu nimesulida como tratamento apresentou redução de peso nos dias 20 e 41, além do dia 13, em relação a seu grupo controle ($p < 0,05$, 2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni) (Figura 10).

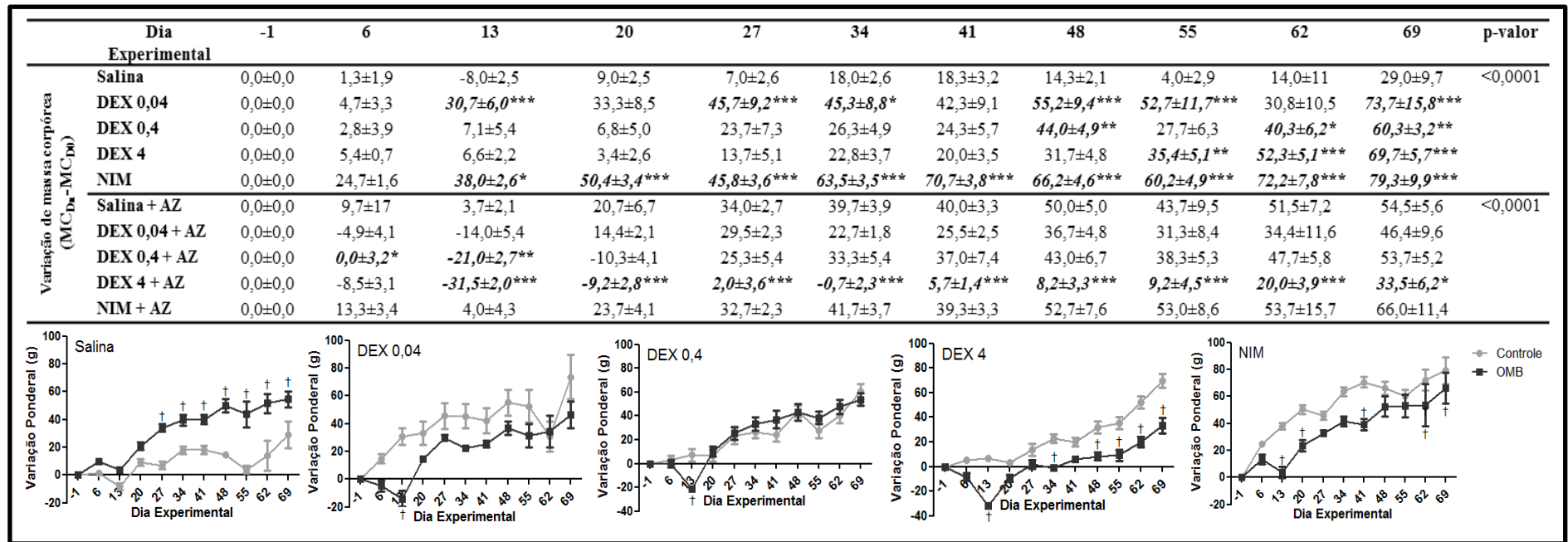


Figura 10. Avaliação da variação de massa corpórea de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes. Os grupos controles tratados com anti-inflamatórios exibiram ganho de peso significativo em relação ao salina a partir do dia 48, após o procedimento de exodontia. Entre os grupos submetidos a infusões de ácido zoledrônico, o tratamento com 0,4 ou 4 mg/kg de dexametasona reduziu a massa corpórea dos animais no 13º dia, continuando menor nos animais que receberam a maior dose desse fármaco. Quando comparados aos respectivos grupos controles, os animais que receberam AZ e foram tratados com anti-inflamatórios apresentaram redução significativa de massa corpórea no dia 13, continuando-se no grupo dexametasona 4 mg/kg associada ao aminobisfosfonato por todo o período experimental. O grupo OMB-salina exibiu maior massa corpórea quando comparado aos animais controle a partir do 27º dia experimental. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo grupo salina no mesmo dia (2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni, Média±EPM); † $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle no mesmo dia (2-way-ANOVA para medidas repetidas (RM)/Bonferroni, Média±EPM). **Variação de massa corpórea** calculada pela subtração da massa corpórea apresentada na pesagem semanal ($D_n =$ Dia experimental “n”) em relação à massa corpórea inicial ($D_0 =$ dia experimental inicial). DEXA 0,04 + AZ e DEX 0,04 - Grupos tratados com 0,04 mg/kg de dexametasona associado ou não à administração de ácido zoledrônico, respectivamente; DEX 0,4 + AZ e DEX 0,4 - Grupos tratados com 0,4 mg/kg de dexametasona associado ou não à administração de ácido zoledrônico, respectivamente; DEX 4 + AZ e DEXA 4 - Grupos tratados com 4 mg/kg de dexametasona associado ou não à administração de ácido zoledrônico, respectivamente; NIM + AZ e NIM - Grupos tratados com 10,3 mg/kg de nimesulida associado ou não à administração de ácido zoledrônico, respectivamente.

6.5.2 Índices dos órgãos

6.5.2.1 Índice Gástrico

Não houve diferenças significantes do índice gástrico nos grupos controle ($p=0,06$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) e submetidos à OMB ($p=0,31$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) em relação aos respectivos grupos salina. Entretanto, as administrações de ácido zoledrônico associado ao tratamento com nimesulida foram capazes de reduzir o índice gástrico dos animais ($5,03\pm 0,29$) em relação aos que receberam tratamento com esse AINE e solução salina EV ($6,23\pm 0,33$) ($p<0,05$, 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 11A).

6.5.2.2 Índice Hepático

O grupo controle tratado com nimesulida ($3,85\pm 0,09$) apresentou um índice hepático significativamente superior ao controle-salina ($3,37\pm 0,07$) ($p<0,05$, 1-way-ANOVA/Bonferroni). Entretanto, o tratamento com nimesulida associado às infusões de ácido zoledrônico ($3,44\pm 0,12$) ocasionou redução significativamente no índice hepático em relação aos animais controles tratados com esse AINE ($p<0,05$, 2-way-ANOVA/Bonferroni). Não houve diferença estatisticamente significativa no índice hepático de animais que receberam infusões de ácido zoledrônico em relação ao salina correspondente ($p=0,473$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 11B).

6.5.2.3 Índice Renal

O índice renal apresentou-se diminuído no grupo controle tratado com a maior dose de dexametasona (4 mg/kg) ($3,36\pm 0,07$) em relação ao salina correspondente ($3,81\pm 0,05$) ($p<0,05$, 1-way-ANOVA/Bonferroni). Já o grupo controle tratado com nimesulida ($4,35\pm 0,09$), apresentou aumento significativo desse índice em relação aos animais controle tratados com salina ($p<0,01$, 1-way-ANOVA-Bonferroni). Além disso, os animais que receberam a nimesulida ($3,43\pm 0,02$) e foram submetidos às infusões de ácido zoledrônico apresentaram redução significativa do índice renal quando comparados ao respectivo grupo controle ($p<0,05$, 2-way-ANOVA/Bonferroni). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos submetidos à OMB e tratados com AIs e o salina correspondente ($p=0,877$, 1-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 11C).

6.5.2.4 Índice Esplênico

Houve redução estatisticamente significativa do índice esplênico dos animais tratados com 0,4 mg/kg ($1,63 \pm 0,06$) e 4 mg/kg ($1,49 \pm 0,08$) de dexametasona dos grupos controles em relação ao controle-salina ($2,03 \pm 0,08$) ($p < 0,001$, 1-way-ANOVA/Bonferroni). Não houve diferença significativa entre os índices esplênicos dos grupos que receberam ácido zoledrônico ($p = 0,203$, 1-way-ANOVA/Bonferroni). O índice esplênico foi estatisticamente semelhante entre os grupos que OMB e controles ($p = 0,196$, 2-way-ANOVA/Bonferroni) (Figura 11D).

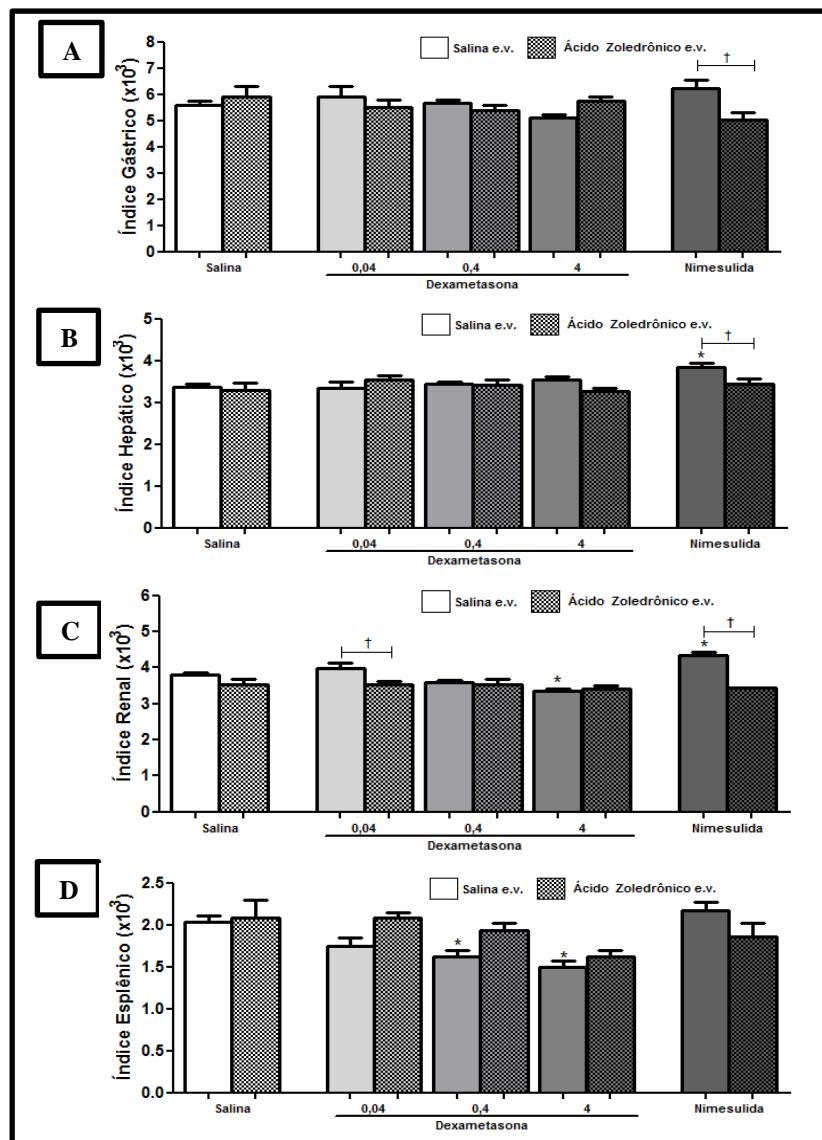


Figura 11. Índices dos órgãos dos animais controle e OMB. (A): O grupo-tratado com nimesulida mostrou redução significativa do índice gástrico em relação ao controle-salina. (B): O índice hepático dos animais controles tratados com nimesulida esteve aumentado em relação ao controle-salina, apresentando redução significativa nos animais que receberam a combinação ácido zoledrônico e nimesulida. (C): O índice renal esteve reduzido no grupo tratado com dexametasona 4 mg/kg e aumentado significativamente no grupo tratado com nimesulida quando comparado ao salina correspondente. O tratamento com nimesulida associado à infusão de ácido zoledrônico foi capaz de reduzir esse índice. (D): O índice esplênico esteve reduzido de maneira significativa nos grupos controles tratados com dexametasona 0,4 e 4 mg/kg em relação controle-salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (1-way-ANOVA/Bonferroni, Média \pm EPM); † $p < 0,05$, em relação ao respectivo grupo controle (2-way-ANOVA/Bonferroni, Média \pm EPM).

6.5.3 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço

6.5.3.1 Estômago

A análise histológica do estômago foi dividida em duas partes: cárdia e região de fundo/corpo. Em geral, em todos os grupos experimentais, o estômago exibiu a região de cárdia revestida por epitélio pavimentoso estratificado ortoceratinizado, sob o qual havia córion fibroso denso com vasos sanguíneos ectásicos de diferentes calibres. Apenas dois animais, um do grupo controle e outro do grupo OMB, ambos tratados com nimesulida, apresentaram foco inflamatório (Tabela 2; Figura 12).

Na região fúndica, os animais, independente do tratamento recebido, apresentaram preservação da mucosa gástrica, sendo visualizadas as células principais e parietais, porém com hemorragia e vasos ectásicos nas camadas submucosa e mucosa (Figura 12). Os grupos controle tratados com maior dose de dexametasona (4 mg/kg) (87,5%) ou nimesulida (87,5%) mostraram focos inflamatórios ocasionais na região de mucosa, os quais, quando comparados ao controle-salina, apresentaram significância estatística ($p < 0,05$, Qui-quadrado versus salina). Os animais que receberam, além do ácido zoledrônico, tratamento com 0,4 (100%) ou 4 mg/kg (100%) de dexametasona ou ainda nimesulida (100%), igualmente, apresentaram focos inflamatórios na camada mucosa e, o que, em relação ao grupo OMB-salina (37,5%), demonstrou significância estatística ($p < 0,05$, Qui-quadrado versus salina). O aspecto histológico da região fúndica do estômago em animais submetidos à OMB e tratados com dexametasona 4 mg/kg ou nimesulida foi semelhante ao dos controles correspondentes (Figura 20). No entanto, o grupo tratado com a dose intermediária de dexametasona exibiu significância estatística quanto à presença de focos inflamatórios na mucosa, quando comparados a seu respectivo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de análise toxicológica gástrica.

		Grupos Controle					Grupos OMB							
		Salina	Dexametasona			NIM	p-Valor	Salina	Dexametasona			NIM	p-Valor	
			0,04	0,4	4				0,04	0,4	4			
Estômago	Esôfago/ Cárdia	Integridade do epitélio escamoso estratificado ortoceratinizado	7 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000
		Presença de vasos ectásicos/hemorragia	7 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000
		Presença de focos inflamatórios	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	1,000	0 (0%)	0 (0%)	0 (0,0%)	0 (0%)	1 (16,7%)	0,273
	Estômago fundo e corpo	Preservação das glândulas da mucosa gástrica	7 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000
		Presença de vasos ectásicos/hemorragia	7 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000
		Presença de focos inflamatórios	1 (14,3%)	1 (14,3%)	1 (12,1%)	6 (85,7%)*	7 (87,5%)*	<0,001	3 (37,5%)	1 (12,5%)	6 (100%)*†	7 (100%)*	6 (100%)*	<0,001

*p<0,05, Qui-quadrado versus salina; †p<0,05, Exato de Fisher versus seu controle; Dados expressos em forma de frequência absoluta (percentual).

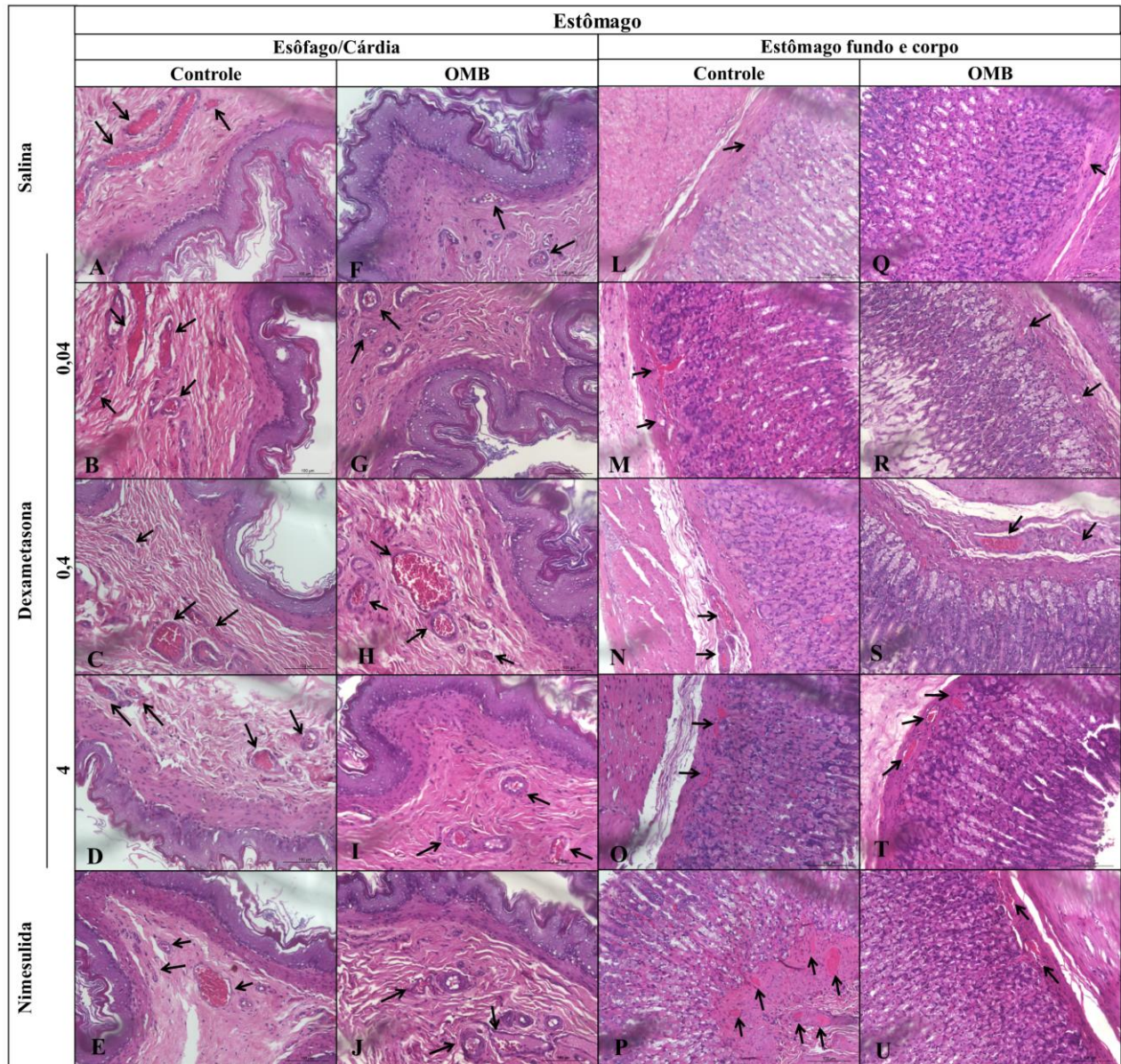


Figura 12. Fotomicrografia do estômago de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes. (A-J): Mucosa gástrica exibindo região de cárdia revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoceratinizado, sob o qual há córion fibroso com vasos sanguíneos ectásicos (seta). (L-U): Região de fundo e corpo com presença de discreta hemorragia nos grupos controle e OMB tratados com salina (L, Q), moderada, nos grupos controle e OMB tratados com dexametasona 0,04, 0,4 e 4 mg/kg (M, N, O, R, S, T) e intensa, nos tratados com nimesulida (P,U), os dois últimos acompanhados de vasos sanguíneos ectásicos em submucosa e mucosa (seta). Hematoxilina-Eosina (200x).

6.5.3.2 Fígado

Os animais controle tratados com salina exibiram arquitetura hepática preservada, contendo hepatócitos com leve tumefação, discreta hemorragia sinusoidal e alguns focos inflamatórios. Já aqueles tratados com anti-inflamatórios, mostraram moderada ou intensa tumefação de hepatócitos ($p < 0,05$, Qui-quadrado versus salina), que se mostrou leve nos animais salina (Figura 13). A administração da maior dose de dexametasona (4 mg) ou nimesulida causou vacuolização de hepatócitos, quando comparados a animais que receberam apenas salina ($p < 0,05$, Qui-quadrado versus salina). Somente no grupo controle nimesulida (50%) foi visualizada necrose focal de hepatócitos, sendo significativa quando comparados ao salina correspondente (28,6%) ($p < 0,05$, Qui-quadrado versus salina) (Tabela 3).

Nos grupos OMB, os animais tratados com anti-inflamatórios esteroideal e não-esteroideal exibiram moderada ou intensa tumefação de hepatócitos ($p < 0,05$, Qui-quadrado versus salina), que no grupo salina apresentou-se leve (Figura 13). Vacuolização de hepatócitos foi observada nos grupos tratados com a maior dose (4 mg/kg) (75%) e dose intermediária (0,4 mg/kg) de dexametasona (100%), com significância estatística quando comparados ao salina correspondente. No entanto, os animais submetidos a infusões de ácido zoledrônico e tratados com nimesulida comportaram-se de maneira semelhante aos OMB-salina (Figura 13). Quando comparados ao grupo controle correspondente, os animais OMB que receberam dexametasona 0,4 mg/kg exibiram maior vacuolização de hepatócitos, o que mostrou significância estatística (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de análise toxicológica hepática.

	Grupos Controle						Grupos OMB					
	Salina	DEX			NIM	P-Valor	Salina	DEX			NIM	P-Valor
		0,04	0,4	4				0,04	0,4	4		
Congestão da veia portal	6 (85,7%)	6 (85,7%)	7 (77,8%)	6 (85,7%)	8 (100%)	0,320	6 (75%)	8 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	5 (83,3%)	0,375
Congestão da veia centrolobular	5 (71,4%)	5 (71,4%)	7 (77,8%)	4 (57,1%)	8 (100%)	0,061	5 (62,5%)	8 (100%)	5 (83,3%)	6 (75%)	6 (100%)	0,463
Hiperplasia das células de Kupffer	7 (100%)	7 (100%)	9 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	1,000
Moderada ou intensa tumefação celular de hepatócitos	1 (14,3%)	6 (85,7%)*	9 (100%)*	7 (100%)*	8(100%)*	<0,001	2 (25%)	7 (87,5%)*	6 (100%)*	8 (100%)*	6 (100%)*	<0,001
Degeneração vacuolar de hepatócitos	0 (0%)	0 (0%)	3 (33,3%)	7 (100%)*	6 (75%)*	<0,001	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)*†	6 (75%)*	2 (33,3%)	<0,001
Hemorragia sinusoidal	7 (100%)	7 (100%)	9 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	1,000
Presença de células inflamatórias	7 (100%)	7 (100%)	9 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	1,000
Necrose focal de hepatócitos	2 (28,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (50%)*	0,027	2 (25%)	2 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33,3%)	0,065

*p<0,05, Qui-quadrado versus salina; †p<0,05, Exato de Fisher versus seu controle; Dados expressos em forma de frequência absoluta (percentual).

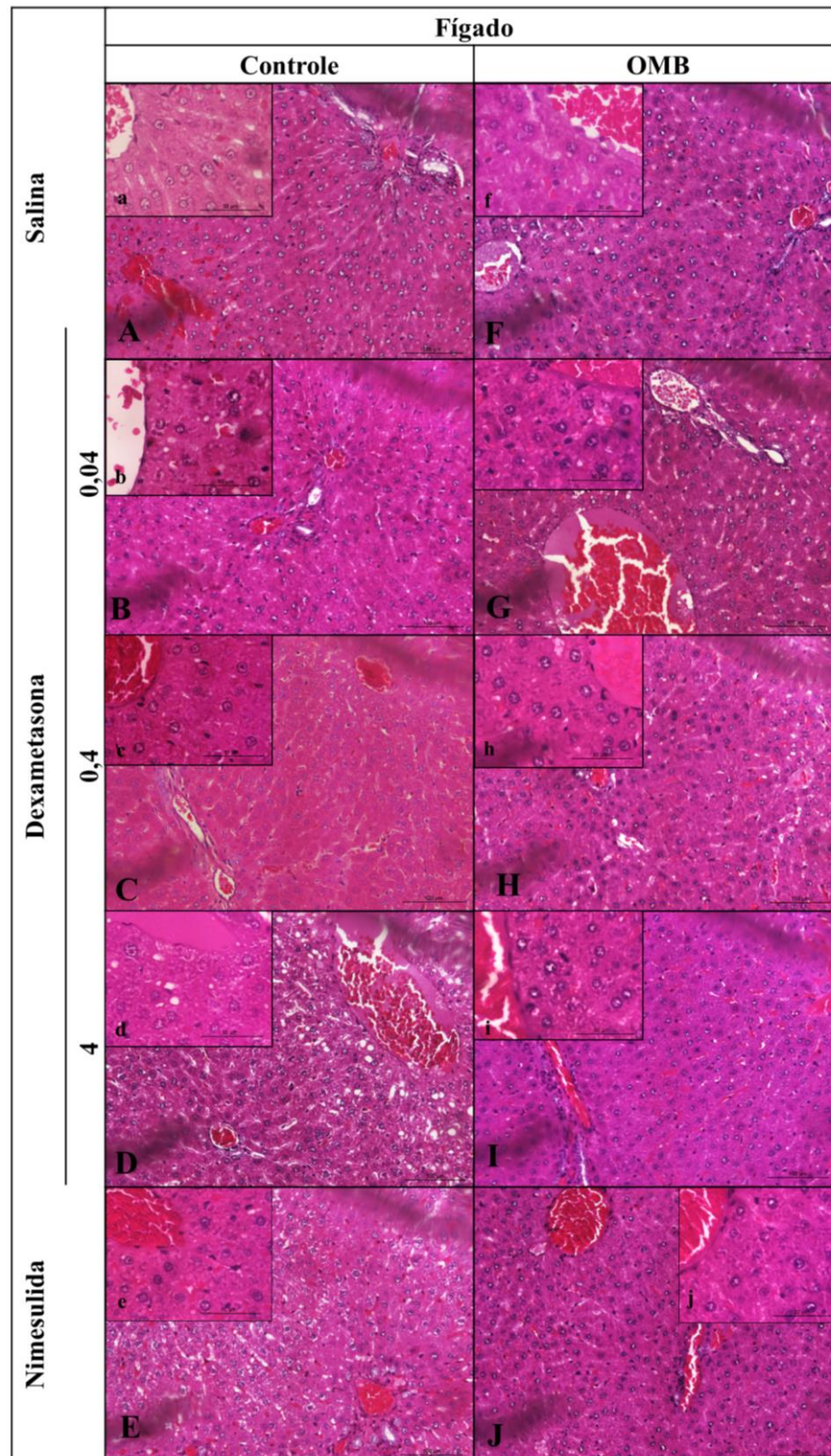


Figura 13. Fotomicrografia do fígado de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes. (A, F): Os grupos controle e OMB tratados com salina apresentaram arquitetura lobular preservada com cordões de hepatócitos e congestão da veia centrolobular e portal. (a, f) No detalhe, hepatócitos apresentando leve tumefação. (B-E): Em todos os grupos controles tratados com anti-inflamatórios, observou-se congestão da veia portal e centrolobular e hemorragia sinusoidal. (b-e): Houve ainda moderada ou intensa tumefação de hepatócitos, além de hiperplasia de células de Kupffer. (G, H, I, J): Os animais submetidos à OMB, tratados com dexametasona 0,04 mg/kg, 0,4 mg/kg, 4 mg/kg ou nimesulida apresentaram congestão da veia portal e centrolobular e hemorragia sinusoidal. (g, h, i, j): Além disso, exibiram moderada ou intensa tumefação de hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer (Hematoxilina-Eosina (200x-400x)).

6.5.3.3 Rim

Os animais controle apresentaram estrutura glomerular preservada, muitas vezes com presença de hemorragia tubular e intersticial, além de células inflamatórias dispersas pela amostra. Vacuolização do epitélio tubular foi vista em animais tratados com regime anti-inflamatório, esteroidal ou não-esteroidal (Figura 14). Nos animais tratados com dexametasona [Dexametasona 0,04 (66,7%), dexametasona 0,4 (50%), dexametasona 4 mg/kg (85,7%)] ou nimesulida (87,5%) foi relatada presença de cilindro-hialino, sendo significante em relação ao salina (0%) ($p=0,003$, Qui-quadrado versus salina) (Tabela 4; Figura 14).

Todos os grupos OMB, assim como os controles correspondentes, exibiram hemorragia tubular e intersticial, células inflamatórias dispersas e tumefação celular do epitélio tubular. Aqueles grupos tratados com dexametasona [Dexametasona 0,04 (100%), dexametasona 0,4 (83,3%), dexametasona 4 mg/kg (85,7%)] ou nimesulida (100%) apresentaram vacuolização do epitélio tubular, com significância estatística em relação ao salina-OMB (25%) ($p=0,015$, Qui-quadrado versus salina). A infusão de ácido zoledrônico, independente do tratamento recebido, ocasionou maior frequência de cilindro-hialinos nos rins (Figura 14). Somente o grupo controle-salina não apresentou essa alteração (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros de análise toxicológica renal.

	Grupos Controle						Grupos OMB					
	Salina	DEX			NIM	p-Valor	Salina	DEX			NIM	p-Valor
		0,04	0,4	4				0,04	0,4	4,00		
Preservação da estrutura glomerular	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	1,000	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000
Tumefação celular do epitélio tubular	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	6 (85,7%)	7 (87,5%)	0,341	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000
Vacuolização do epitélio tubular	6 (85,7%)	4 (66,7%)	3 (37,5%)	3 (42,8%)	8 (100%)	0,053	2 (25%)	8 (100%)*	5 (83,3%)*	6 (85,7%)*	6 (100%)*	0,015
Hemorragia tubular e intersticial	7 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	0,490	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000
Necrose nefrotóxica	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	2 (25%)	0,285	2 (25%)	1 (12,5%)	0 (0%)	5 (71,4%)	1 (16,7%)	0,469
Presença de Cilindro-hialino	0 (0%)	4 (66,7%)*	4 (50%)*	6 (85,7%)*	7 (87,5%)*	0,003	8 (100%)†	6 (75%)	4 (66,7%)	6 (85,7%)	6 (100%)	0,058
Presença de Células inflamatórias	7 (100%)	5 (83,3%)	8 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	0,146	8 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	1,000

*p<0,05, Qui-quadrado versus salina; †p<0,05, Exato de Fisher versus seu controle; Dados expressos em forma de frequência absoluta (percentual).

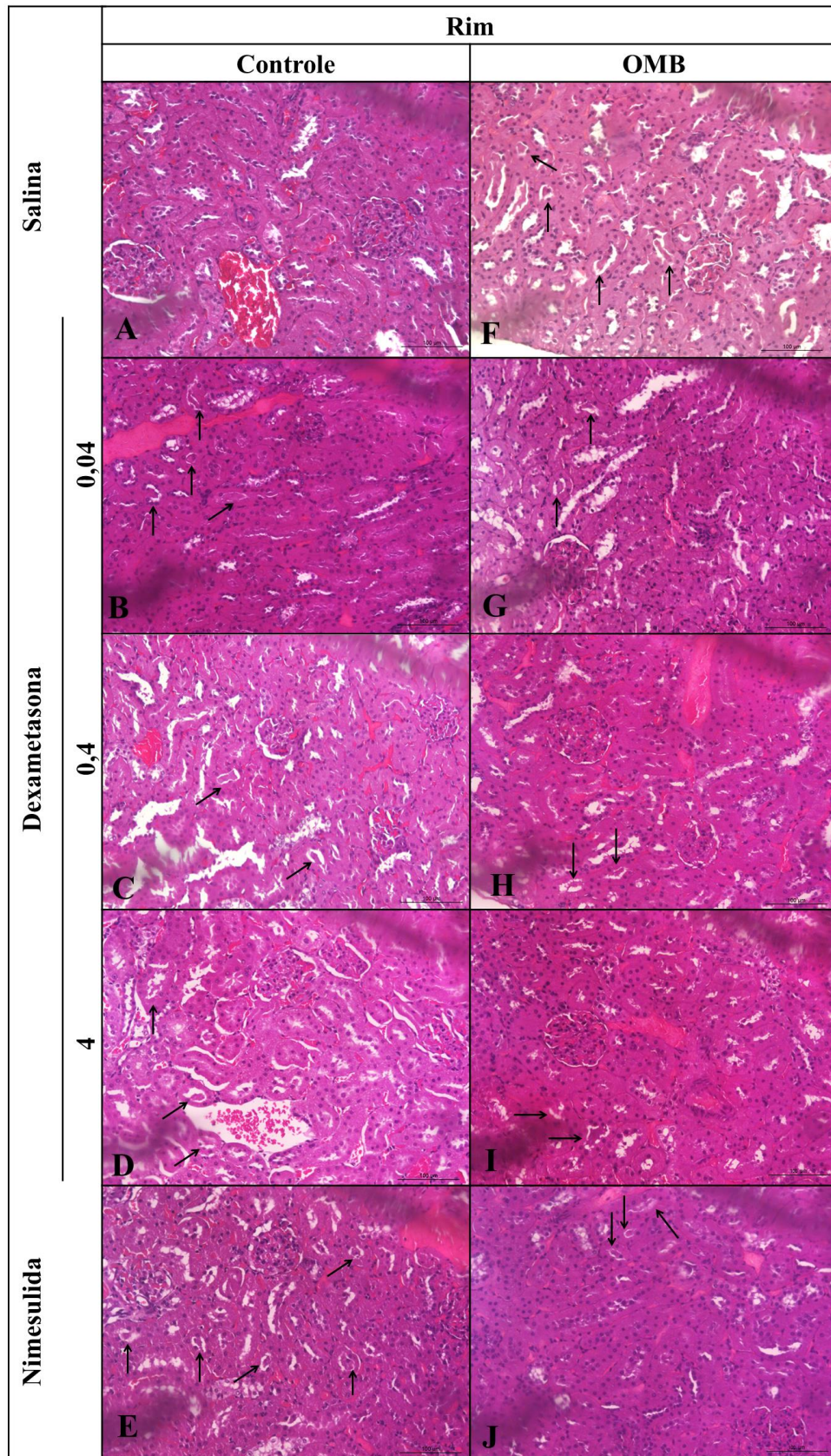


Figura 14. Fotomicrografia do rim de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes. (A-J): Todos os grupos, controle e OMB, apresentaram preservação da estrutura glomerular, hemorragia tubular e intersticial. (B, C, D, E): Em todos os grupos controles tratados com anti-inflamatórios houve presença de cilindro-hialino (seta). (F-J): A presença de cilindro-hialino também foi observada nos grupos submetidos à infusão de AZ (seta). (Hematoxilina-Eosina (200x)).

6.5.3.4 Baço

A análise microscópica do baço de animais controle tratados com salina revelou preservação da estrutura nodular em meio a hemorragia recente e megacariócitos de permeio. Já os animais tratados com a maior dose de dexametasona (4 mg/kg) e nimesulida apresentaram folículos linfoides da polpa branca exibindo variação de tamanho e congestão de polpa vermelha quando comparados ao grupo controle-salina (Figura 15). Os animais tratados com a menor dose de dexametasona aparentemente apresentaram menos hemorragia, quando comparados ao grupo salina.

A maior parte dos animais que receberam unicamente ácido zoledrônico apresentaram, no baço, polpa branca bem formada e preservada. Os animais tratados com a maior dose (4 mg/kg) e a dose intermediária (0.4 mg/kg) de dexametasona, no entanto, mostraram folículos linfoides da polpa branca atrofiados, quando comparados ao salina correspondente (Figura 15). Grande número de animais OMB, independente do grupo experimental, exibiram congestão de polpa vermelha, hemorragia recente e presença de megacariócitos dispersos.

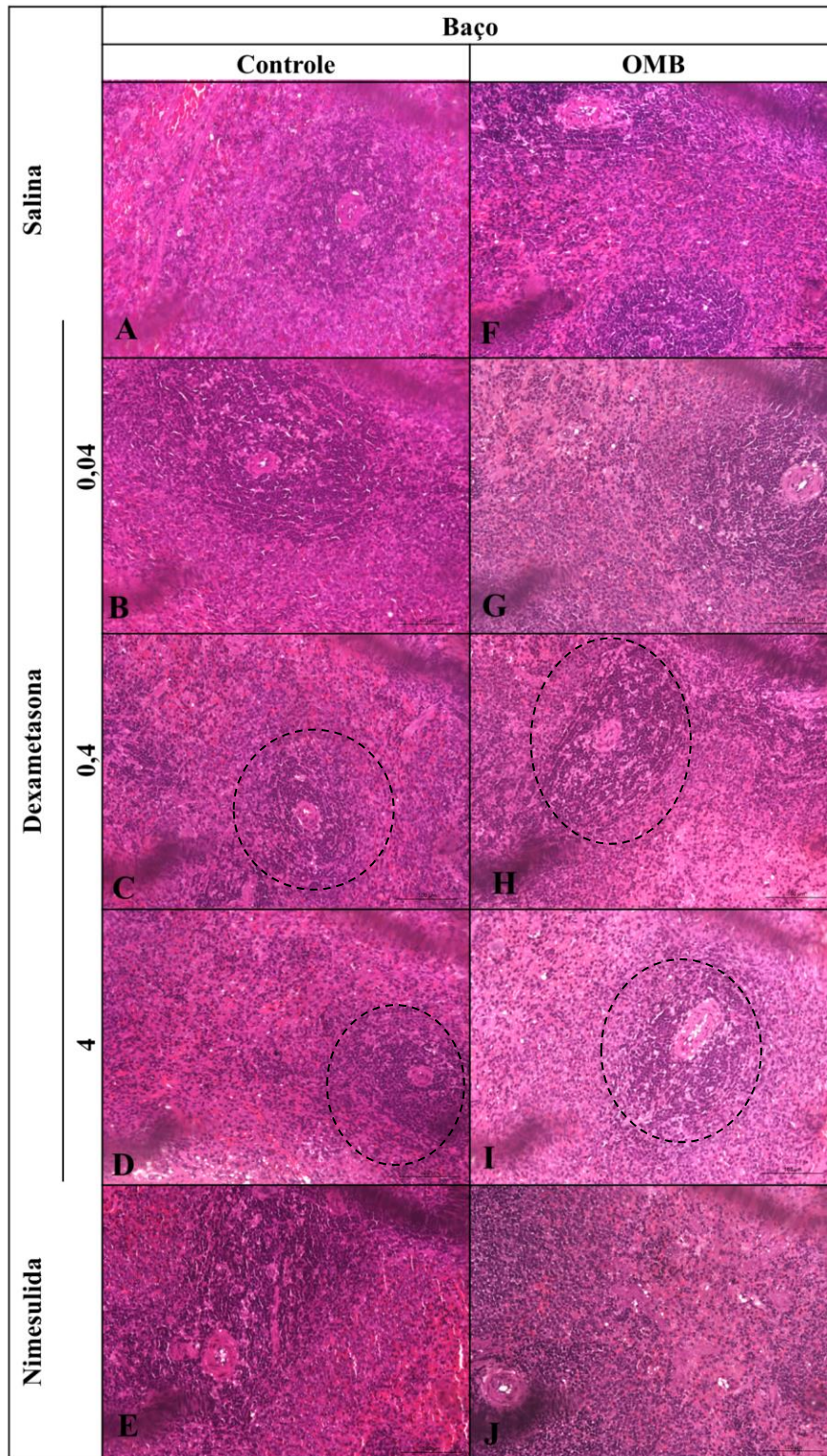


Figura 15. Fotomicrografia do baço de animais submetidos à OMB tratados com anti-inflamatórios e controles correspondentes. (A, F): Os grupos controle e OMB tratados com salina apresentaram preservação da estrutura folicular e hemorragia recente. (B): O grupo tratado com a menor dose de dexametasona apresentou características semelhantes ao grupo controle-salina. (C, D): Os animais tratados com as doses de 0,4 mg/kg ou 4 mg/kg de dexametasona mostraram arquitetura folicular preservada porém com atrofia da polpa branca e hemorragia na polpa vermelha. (E): Foi observado variação na extensão da polpa branca, além de congestão de polpa vermelha e hemorragia no grupo controle tratado com nimesulida. (H, I): Os animais submetidos à OMB e tratados com dexametasona 0,4 mg/kg ou 4 mg/kg apresentaram atrofia da polpa branca, hemorragia e congestão de polpa vermelha. (G, J): Aqueles submetidos à OMB e que receberam tratamento com dexametasona 0,04 mg/kg ou nimesulida exibiram hemorragia e congestão de polpa vermelha. A estrutura folicular do baço manteve-se preservada. Hematoxilina-Eosina (200x).

7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, buscou-se investigar se a supressão da inflamação via uso de fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais, seria capaz de prevenir ou atenuar a OMB. Foi observado que nenhum tratamento anti-inflamatório empregado atuou de modo efetivo na prevenção desse evento, sendo encontrados sinais histológicos clássicos de OMB em todos os grupos submetidos à infusão de AZ, bem como área radiolúcida sugestiva de necrose óssea no aspecto radiográfico. Além disso, todos os animais submetidos à OMB apresentaram colônias bacterianas e infiltrado inflamatório no sítio pós-exodontia. Entretanto, o tratamento com nimesulida, embora não atenuasse a necrose óssea, foi capaz de reduzir de maneira eficaz a migração neutrofílica para o local da exodontia. Esses achados provavelmente indicam que a presença de inflamação não é determinante para o desenvolvimento de OMB.

A avaliação da dificuldade cirúrgica através do número de fraturas radiculares no momento da exodontia não revelou diferenças significantes em nenhum dos grupos estudados. De maneira similar aos resultados desse estudo, Maahs et al. (2011), não encontraram diferenças nos números de fraturas entre ratos Wistar submetidos ou não a infusões de ácido zoledrônico, com diferentes regimes e vias de administração de BFs aminados. Diferentemente, o estudo de Conte-Neto et al. (2012) demonstra que os ratos Sprague-Dawley tratados com alendronato de sódio 1 mg/kg ou 3 mg/kg apresentaram maior número de fraturas durante a exodontia do que o grupo tratado com salina. Outro estudo, em que a OMB foi induzida em cães beagles, mostra que os grupos que receberam AZ ou a associação AZ e dexametasona (5 mg, via oral) apresentaram maior número de fraturas no momento da exodontia do que os animais não tratados ou tratados apenas com dexametasona (ALLEN, CHU, RUGGIERO, 2013). A diferença encontrada entre os estudos pode estar relacionada à maior dificuldade de exodontia inerente à anatomia dental de cada espécie ou linhagem utilizada, além dos diferentes protocolos terapêuticos com bisfosfonatos empregados em cada um deles.

Ainda no parâmetro de dificuldade cirúrgica, de maneira oposta, o tempo decorrido para realização da exodontia mostrou resultados significantes. Apenas o grupo submetido à OMB e tratado com a maior dose de dexametasona apresentou tempo significantemente superior ao salina correspondente, não havendo diferenças entre os grupos submetidos ou não à OMB. Em contrapartida, estudos anteriores mostraram que ratos tratados com alendronato de sódio necessitaram de um tempo significantemente maior para realização de exodontia, o que foi atribuído ao aumento da densidade e redução da elasticidade óssea

gerada pela utilização de bisfosfonatos (CONTE-NETO et al., 2012). O tratamento do mieloma múltiplo é feito, em geral, com uma associação de fármacos. Estudos demonstram que a combinação talidomida, ácido zoledrônico e dexametasona em altas doses, a qual atua como imunossupressor, é capaz de reduzir marcadores de reabsorção óssea, como a fosfatase alcalina e osteocalcina sérica (TOSI et al., 2006). Foi notado ainda que a resistência do osso pélvico em cães tratados com a associação ácido zoledrônico e dexametasona foi superior a dos animais que receberam apenas ácido zoledrônico, os quais mostraram resistência reduzida em relação ao controle. Isso provavelmente indica que dexametasona possa atuar reduzindo efeitos negativos provocados pelo uso do bisfosfonato (LUO, ALLEN, 2013). Além disso, a análise de correlação realizada no presente trabalho demonstrou que as exodontias que demandaram mais tempo estão relacionadas positivamente ao aumento do número de fraturas radiculares. A partir disso, pode-se supor que o elevado tempo decorrido para exodontia no grupo que recebeu dexametasona 4 mg/kg e ácido zoledrônico pode estar relacionado à maior resistência óssea promovida pela combinação desses fármacos.

As evidências radiográficas de OMB, em geral, compreendem zonas radiolúcidas irregulares, com ocasionais sequestros ósseos radiopacos e pouca evidência de cicatrização, podendo haver também fraturas patológicas (CHIANDUSSI et al., 2006; KRISHNAN et al., 2009). Sonis et al. (2009), em modelo que mimetiza a OMB em ratos Sprague-Dawley, observaram ausência de radiopacidade nos animais submetidos a regime semanal de ácido zoledrônico (7,5 µg/kg, via subcutânea) a partir de radiografias digitais, o que não diferiu entre os grupos com a administração conjunta de dexametasona (1 mg/kg/semana, via subcutânea). Cankaya et al. (2011) também observaram que ratos Wistar submetidos a infusões semanais de ácido zoledrônico (7,5 µg/kg, subcutâneo) e dexametasona (1 mg/kg, subcutâneo) apresentaram maior e significante área osteolítica em relação a animais que receberam apenas salina, visto através de tomografia computadorizada cone-beam. O presente trabalho corrobora os anteriores, demonstrando que houve maior área osteolítica em radiografias digitais de animais que receberam AZ, o que provavelmente pode representar zonas de necrose óssea.

Na presente investigação experimental, o tratamento com anti-inflamatórios, esteroidal e não-esteroidal, não foi capaz de produzir alterações radiográficas nos animais submetidos à OMB, sendo observada área radiolúcida sugestiva de necrose semelhante aos animais OMB-salina. Por outro lado, em dois animais tratados com dexametasona 4 mg/kg associada a infusões de AZ, houve formação de esclerose no osso mandibular, semelhante à área de sequestros ósseos. O mesmo foi observado radiograficamente no estudo de Jabbour et

al. (2014), em que foi utilizada a associação de AZ (0,13 mg/kg/semana, via intraperitoneal) e DEX (3,8 mg/kg/semana, via intraperitoneal).

Sonis et al. (2009) observaram que os grupos controles, tratados apenas salina ou algum regime com anti-inflamatório, apresentaram 28 dias após a exodontia, alvéolos com radiopacidade linear de densidade uniforme, sendo difícil identificar os sítios onde havia sido realizada a extração. Posteriormente, esse resultado foi confirmado clínica e radiograficamente em ratos Sprague-Dawley de grupos controles tratados com salina e dexametasona (JABBOUR et al., 2014) e está de acordo com os resultados do presente estudo.

No exame radiográfico convencional, a osteonecrose pode apresentar-se como esclerose óssea e área radiolúcida difusa, sendo esse tipo de exame largamente utilizado e bastante útil para confirmação do diagnóstico clínico e uma avaliação inicial da lesão (CHIANDUSSI et al., 2006; TRIESTER et al., 2009). Já foi descrito anteriormente que é possível observar as alterações ósseas iniciais do desenvolvimento de OMB através da radiografia digital (ZAMAN, NAKAMOTO, TANIMOTO, 2013). Adicionalmente, a perda óssea alveolar quantificada através das radiografias digitais mostrou-se semelhante àquela vista em tomografias cone-beam em pacientes com periodontite (TAKESHITA et al., 2014). Essa técnica radiográfica ainda traz vantagens em ser executada de maneira simples e rápida, necessitar de menor exposição à radiação e possuir bom custo-benefício, podendo ser realizada no próprio consultório odontológico (CEDERBERG, 2012), o que contribui para a confirmação diagnóstica precoce dessa condição. Uma das poucas desvantagens de seu uso é o fato de fornecer uma imagem em duas dimensões, o que pode estimar de maneira imprecisa a extensão da lesão necrótica (CHIANDUSSI et al., 2006).

Quando se faz necessário investigar a área de osteonecrose com maior acurácia, a tomografia computadorizada é bastante útil. Esse exame imaginológico é capaz de oferecer dados sobre o osso cortical e trabecular, mostrando detalhes sobre a extensão da osteonecrose (WULTLZ et al., 2008) e permitindo uma reconstrução tecidual tridimensional, sobre a qual pode estimar-se a quantidade de osso comprometido por necrose com precisão (TORRES et al., 2012).

O estudo histomorfométrico utilizou parâmetros que, reunidos, são capazes de afirmar a presença de osso necrótico nos sítios pós-exodontia. Como esperado, nenhum animal tratado com anti-inflamatórios ou salina e não submetidos a infusões de AZ desenvolveu OMB. Todos os animais controle exibiram osso celularizado, com presença de osteoclastos saudáveis e ausência de sinais sugestivos de infecção, com baixo número de polimorfonucleares neutrófilos. Esses achados estão de acordo com o aspecto histológico da

mandíbula de animais controle de modelos experimentais de OMB onde a eutanásia é realizada entre três e seis semanas após a exodontia (SONIS et al., 2009; BI et al., 2010; MARINO et al., 2012). Embora a maioria dos modelos animais de indução de OMB utilize procedimentos cirúrgicos como fator traumático desencadeador da osteonecrose (SONIS et al., 2009; BI et al., 2010; LOPEZ-JORNET et al., 2010; ALLEN, CHU, RUGGIERO, 2013; CONTE-NETO et al., 2013; MA, WANG, 2014), foi visto que, mesmo na ausência de trauma local, o osso mandibular incorporado de AZ era capaz de exibir lacunas de osteócitos vazias, com infiltrado inflamatório misto que se estendia desde o epitélio (SENEL et al., 2010; MOLON et al., 2014).

O grupo OMB tratado com salina apresentou osso pouco celularizado, com lacunas de osteócitos vazias, osteoclastos apoptóticos, polimorfonucleares neutrófilos e colônias bacterianas consistentes com *Actinomyces*, configurando-se presença de OMB. Achados histológicos semelhantes foram encontrados por grupos experimentais em modelos de OMB (SONIS et al., 2009; BI et al., 2010; MARINO et al., 2012) e estudo em ossos necróticos oriundo de biópsias em humanos com OMB (FAVIA, PILLOLI, MAIORANO, 2009). Mesmo que tenha utilizado critérios diferentes para comparação entre grupos, o estudo de Conte-Neto et al. (2013) demonstram, também, aumento da infecção, inflamação e do osso necrótico após 28 dias da exodontia de primeiros molares inferiores de ratos Wistar em animais submetidos à OMB. A infecção parece ter relação com a infusão de AZ que foi associada previamente ao aumento da atividade bacteriana, com crescimento do biofilme oral (KOBAYASHI et al., 2010).

Nenhum dos tratamentos empregados foi capaz de prevenir ou mesmo atenuar a necrose óssea mandibular. Em geral, os animais que receberam dexametasona ou nimesulida antes das administrações de ácido zoledrônico, mostraram características similares ao grupo OMB-salina. Isso demonstra que a atividade anti-inflamatória dos fármacos testados não é capaz de prevenir o desenvolvimento dessa condição. Nesse contexto, o estudo de Bi et al. (2010) também não evidenciaram associação entre inflamação e OMB, a menos quando foram utilizados imunossupressores em associação ao aminobisfosfonato, como a dexametasona e o docetaxel. Em consonância com esse resultado, nos grupos tratados com dexametasona 0,4 e 4 mg/kg e submetidos à indução de OMB foram observadas colônias bacterianas e polimorfonucleares neutrófilos em maior número do que nos animais salina que também receberam o aminobisfosfonato.

A maior frequência de infecção nos animais tratados com dexametasona pode se dar pelo fato de que esse fármaco administrado em dose única por oito semanas, em um regime crônico, é capaz de provocar imunossupressão nos animais como efeito adicional de

seus mecanismos de ação. Além disso, o período em que foi administrado dexametasona no presente estudo, 8 semanas, com administrações semanais do fármaco, foi semelhante ao utilizado por modelos experimentais de indução de osteonecrose por esteroides, sendo nesses utilizado a via intramuscular, o que denota um tempo satisfatório para que haja efeitos crônicos desse grupo de fármacos (MA et al., 2010; TIAN et al., 2014). Ainda, foi demonstrado o efeito imunossupressor da dexametasona (0,1 mg/kg, via intramuscular) administrada alternadamente por 50 dias (SORIANELLO et al., 2002).

Interessantemente, resultado semelhante, em relação ao aumento de focos inflamatórios no sítio de exodontia, também foi observado por Bi et al. (2010) em mandíbulas de camundongos tratados com a associação de ácido zoledrônico e dexametasona em relação ao tratamento com o aminobisfosfonato isolado. Outros autores atribuem a imunossupressão como causa da redução da reação do hospedeiro à presença de fragmentos de ossos não-reabsorvido, colonizado por bactérias, o que aumenta a chance de infecção e exposição óssea. Esses fragmentos, que, por vezes, podem ser projetados pela superfície externa da mucosa, podem ser prontamente colonizadas por bactérias no ambiente bucal e levar a uma infecção e exposição óssea maior (JABBOUR et al., 2014), gerando infiltrado inflamatório no local.

Os GCs administrados de maneira crônica são capazes de interferir no metabolismo ósseo, de modo a provocar a apoptose de osteoblastos e osteócitos e prolongar o tempo de vida de osteoclastos, além de induzir a produção de precursores dessas células (O'BRIEN et al., 2004; JIA et al., 2006). Sendo assim, com a administração concomitante de GCs e aminobisfosfonatos, um maior número osteoclastos fica ativo para reabsorver osso e, conseqüentemente, tornam-se alvos farmacológicos para o BF, que é capaz de gerar sua apoptose. Isso provavelmente explica o fato de, na presente investigação experimental, o tratamento com dexametasona, além daquele com nimesulida, associados à infusão de AZ terem sido associados a um maior percentual de osteoclastos apoptóticos no sítio pós-extração quando comparados aos animais submetidos à OMB e tratados com salina.

Em modelo experimental de OMB em beagles, induzido por ácido zoledrônico e a dexametasona, foi relatado a presença de OMB, sem necessariamente haver a ulceração da mucosa de revestimento, com a presença de achados microtomográficos claros de redução do volume e superfície ósseas (ALLEN, CHU, RUGGIERO, 2013). Resultado semelhante também foi encontrado no presente estudo, onde a maior parte dos animais submetidos a infusões de AZ, independente do tratamento associado, apresentavam integridade da mucosa de revestimento, mas exibiam sinais típicos de OMB nas radiografias e na análise histopatológica.

Estudos experimentais que desenvolvem modelos de OMB através da administração concomitante de AZ e dexametasona confirmam que essa combinação de fármacos tem relevância clínica, o que é atribuído ao fato de que muitos pacientes em tratamento para mieloma múltiplo recebem ambas as drogas (SONIS et al., 2009; LOPEZ-JORNET et al., 2010). Em modelo experimental clássico de OMB em ratos, os autores verificaram que o tratamento concomitante com dexametasona e AZ era necessário para produzir as mudanças que estão tipicamente associados com necrose óssea, as quais não aparecem com AZ ou tratamento com dexametasona isolado (SONIS et al., 2009). Esse achado pode ser confirmado pelo estudo de Lopez-Jornet et al. (2010), onde todos os casos de OMB encontrados foram referentes aos animais tratados com a associação pamidronato (3 mg/kg/dia, intraperitoneal) e dexametasona (1 mg/kg/dia/intraperitoneal) por 7, 14 ou 21 dias.

No presente trabalho, independente da administração ou dose de dexametasona empregada, os animais apresentaram sinais evidentes de OMB com características semelhantes entre si. Esse achado confirma os resultados encontrados por Bi et al. (2010), em modelo experimental de OMB em camundongos C57BL6 (C57Black6), em que demonstraram a capacidade do AZ isolado ou associado à dexametasona (5 mg/kg, semanalmente, intraperitoneal) induzir o desenvolvimento dessa condição. Mais recentemente, Jabbour et al. (2014) demonstraram que ratos Sprague-Dawley tratados com AZ (0,13 mg/kg/semanal, via intraperitoneal) associada ou não à DEX (3,8 mg/kg/semana, via intraperitoneal) também exibiram sinais clínicos e radiográficos sugestivos de OMB, entretanto ressalta que os animais tratados com a combinação de fármacos exibiram maior área de sequestro ósseo mandibular, o que foi atribuído à cessação da remodelação óssea mais eficaz devido à administração do glicocorticoide.

A osteonecrose causada unicamente pela administração de glicocorticoides possui característica de ser uma necrose avascular, que ocorre em articulações em pacientes com uso prolongado desses anti-inflamatórios esteroidais (KLINGESTEIN et al., 2005). Em geral, os modelos experimentais de indução de osteonecrose por esteroides em ratos utilizam a metilprednisolona ou a prednisolona em doses diversas. Entretanto, um estudo utilizou a dexametasona na dose de 20 mg/kg, em única administração semanal, via intramuscular, por oito semanas, em ratos Wistar, o que corresponde a cinco vezes a dose mais alta utilizada nessa investigação experimental, por gavagem (MA et al., 2010).

No presente trabalho, nenhum dos animais controles tratados com diferentes doses de dexametasona apresentaram sinais radiográficos ou histológicos de osteonecrose. Esse resultado confirma os achados de Bi et al. (2010) que, administrando dexametasona

semanalmente (5 mg/kg, via intraperitoneal), dose considerada mais baixa do que a equivalente utilizada em pacientes, em camundongos C57BL6, obteve, três semanas após a exodontia, a maior parte do osso alveolar necrótico próximo ao sítio de extração substituído por osso esponjoso viável. Estes autores observaram ainda que, seis semanas após o procedimento cirúrgico, houve completa substituição do tecido necrótico por osso lamelar nos alvéolos (BI et al., 2010). Além disso, a terapia com dexametasona, 3,8 mg/kg/semana, semelhante à maior dose de dexametasona utilizada no presente estudo, dada a ratos Sprague-Dawley submetidos à exodontia, foi estimada como dose equivalente ao regime utilizado em pacientes com câncer (40 mg/paciente/semana) e não foi capaz de interferir clínica ou radiograficamente na cicatrização dos alvéolos (JABBOUR et al., 2014).

Uma das propriedades que contribuem para ação anti-inflamatória da nimesulida é reduzir a capacidade fagocítica de neutrófilos (BRAVO-CUELLAR et al., 2003), até pela redução do seu potencial oxidativo, a partir da inibição da síntese de ânions superóxidos, por exemplo (CAPSONI et al., 1987; OTONELLO et al., 1992; MELLO, LAURINDO, COSSERMELLI, 1994). Foi demonstrado, como um mecanismo de ação adicional desse fármaco, a capacidade de reduzir a quimiotaxia de polimorfonucleares neutrófilos estimulados para o sítio de inflamação *in vitro* (MELLO, LAURINDO, COSSERMELLI, 1994). Adicionalmente, a nimesulida, em cultura celular de neutrófilos, causou a inibição da síntese de PAF, impedindo sua interação com células endoteliais em suspensão. O PAF atua como um mensageiro intracelular na diapedese de neutrófilos através de células endoteliais tratadas com citocinas e na ativação de eosinófilos (VEHOEVEN et al., 1993). Contribuindo para a redução da diapedese de neutrófilos, outro estudo mostrou que a nimesulida foi capaz de diminuir a adesão e transmigração dessas células através de células endoteliais ativadas com citocinas (DAPINO, OTTONELLO, DALLEGRI, 1994). Essas propriedades podem justificar o fato de ter-se observado, no presente trabalho, um menor número significativo de polimorfonucleares neutrófilos no sítio de exodontia nos animais submetidos à OMB e tratados com nimesulida em relação ao grupo salina correspondente. Além disso, esses animais apresentaram menor percentual de colônias bacterianas no sítio de exodontia, o que contribui para a redução da migração de neutrófilos.

A análise hematológica dos animais submetidos a infusões de AZ demonstrou diminuição no número de hemácias, hemoglobina, hematócrito e aumento do RDW e o tratamento com diferentes anti-inflamatórios não pareceu influenciar nesses parâmetros. Embora tenha sido comprovado anteriormente que o uso de alendronato de sódio em altas doses não apresenta efeitos citotóxicos sobre eritrócitos (KOPKA et al. 2011), estudo desenvolvido com metodologia semelhante ao presente trabalho, mostrou que podem ocorrer

eventos anêmicos em animais que receberam ácido zoledrônico nas doses de 0,04, 0,20 e 1,00 mg/kg (SILVA, 2013). Um artigo de metanálise feito a partir de ensaios clínicos randomizados, confirma que há um significante e maior risco relativo (1,33) do tratamento com ácido zoledrônico atuar no desenvolvimento de anemias (ZHU et al., 2013). Postula-se que esses eventos anêmicos possam ocorrer a partir da infusão de ácido zoledrônico, de onde se inicia uma sequência de eventos pró-inflamatórios, com a liberação de citocinas inflamatórias, recrutamento de neutrófilos, o que induz resistência da medula óssea à ação da eritropoietina (MacDOUGALL, COOPER, 2002; SILVA, 2013).

Nesse aspecto, a administração conjunta de anti-inflamatórios poderia ser considerada benéfica, ao passo que atuaria reduzindo essas consequências da inflamação e, possivelmente, a anemia. Ressalta-se, entretanto, a importância de estudos que detalhem os mecanismos da relação entre a ocorrência de anemia e a administração de bisfosfonatos aminados.

No presente estudo foi visto também uma tendência à redução do número de plaquetas associado às administrações do ácido zoledrônico. A maior parte dos artigos não menciona alterações na contagem de plaquetas associada ao uso de ácido zoledrônico ou outro bisfosfonato aminado. Apenas dois relatos de casos na literatura sobre a ocorrência de Púrpura Trombocitopênica Trombótica relacionada ao uso de bisfosfonatos foram descritos (FERRETTI et al., 2004; BHADADA et al., 2009). Os autores acreditam que o fato de o AZ ser um potente inibidor de metaloproteinases, a inibição ou diminuição da ADAMTS-13 (do inglês, *A Disintegrin And Metalloprotease with eight Thrombo Spondin-1-like*) cause falência da degradação de “Multímeros Ultragrandes do Fator de Von Willebrand”, o que conduz à trombose e à agregação plaquetária, desenvolvendo essa condição (BHADADA et al., 2009). Assim, fazem-se necessários estudos mais específicos para compreender se há influência do tratamento com bisfosfonatos na produção ou função plaquetária.

Tem sido cada vez mais estabelecido na literatura a influência da administração de bisfosfonatos aminados em reações inflamatórias sistêmicas. A infusão de alendronato, bisfosfonato aminado, tem sido associada, em modelo experimental de peritonite, ao influxo de neutrófilos e monócitos localmente (NORTON et al., 2012). Os aminobisfosfonatos parecem ainda modular a imunidade em seres humanos, devido à inibição da via do mevalonato, que gera acúmulo do intermediário isopentenil-difosfatase e dimetilalil-difosfatase em monócitos, acarretando em posterior ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ (ROELOFS et al., 2009). Esses dados são concordantes com o presente estudo, visto que animais que receberam ácido zoledrônico apresentaram linfocitose em relação aos controles correspondentes. Como resultado de reações inflamatórias agudas causadas pelas administrações desses fármacos, pacientes

relatam febre, dor de cabeça, dores musculares e náusea após as infusões de aminobisfosfonatos endovenosos (REID et al., 2010), e alguns desses sintomas, como a febre, parecem estar relacionados à contagem elevada de linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes (ROSSINI et al., 2012).

A dexametasona, assim como outros anti-inflamatórios esteroidais, possui efeitos supressores sobre células brancas. Esses fármacos atuam reduzindo a expansão clonal de linfócitos T, através da inibição da transcrição de IL-2 (KATZUNG et al., 2010). Além disso, esses fármacos são capazes de inibir a produção de COX-2, Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) e diversas citocinas inflamatórias. O tratamento continuado com anti-inflamatórios esteroidais resulta em um efeito imunossupressor, e, assim, tem sido bastante utilizado na terapêutica de doenças imunologicamente mediadas, além do tratamento de primeira linha de escolha para o mieloma múltiplo, onde se objetiva suprimir as linhagens hematopoiéticas tumorais (TALAMO et al., 2005; TOSI et al., 2006; COLLEONI, 2007). A terapia isolada e continuada de dexametasona nas doses consideradas terapêuticas e super terapêuticas por oito semanas em ratos Wistar nesse estudo provocou leucopenia. A maior dose levou ainda a uma redução da contagem de leucócitos mesmo após a cessação do tratamento. Analogamente, nos animais que receberam infusão de ácido zoledrônico, a terapia com dexametasona foi efetiva em prevenir a linfocitose gerada pelos bisfosfonatos, o que pode mostrar benefícios aos pacientes que já fazem uso dessa terapia associada.

Por outro lado, embora a dexametasona reduzisse a linfocitose nos animais submetidos à OMB, a sua administração esteve associada à ocorrência de um discreto aumento do número de neutrófilos e monócitos. Esse efeito pode ser resultado da combinação de mecanismos de ação anti-inflamatórios dos fármacos esteroidais. A inibição da enzima fosfolipase A₂ impede a degradação dos fosfolipídios de membrana em ácido araquidônico, previne a formação de diversos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e tromboxanos e outras moléculas de adesão e quimiotaxia. Acrescenta-se, ainda, a redução da diapedese e migração de leucócitos para o local da inflamação, o que faz alterar o padrão de recirculação de linfócitos, aumentando sua retenção em órgãos linfoides. Além disso, a elevação do número de neutrófilos circulantes, liberados da parede do endotélio (*pool* marginal) para a circulação (*pool* circulante), diminui a sua marginação no vaso sanguíneo e aumenta o tempo de permanência na circulação (COHN, 1991; DAMIANI et al., 2001).

A análise de toxicidade sistêmica revelou que os animais que receberam apenas solução salina em todo o protocolo experimental mostraram variação de massa corpórea inferior ao grupo salina-OMB. Corroborando esse achado, um estudo observou que homens com osteoporose tratados com alendronato de sódio apresentaram aumento em sua massa

corpórea, a qual foi correlacionada, de maneira positiva e significativa, com a elevação da densidade mineral óssea no osso pélvico (SWENSON et al., 2013). Contrapondo essa ideia, diversos estudos na literatura demonstram que, embora haja ganho de peso corpóreo, não há relação entre esse parâmetro e a administração de ácido zoledrônico em ratas ovariectomizadas ou mulheres pós-menopáusicas (PEREIRA et al., 2009; HORNBY et al., 2003). A maioria dos estudos atribui esse ganho de peso à mudança de metabolismo que ocorre no climatério ou à remoção dos ovários, que resulta em redução do hormônio estrogênio, facilitando acúmulo periférico de gordura e aumento da massa corporal (DIAS et al., 1982; PEREIRA et al., 2009). No presente estudo, foram utilizados ratos machos, não sendo possível atribuir o ganho de massa à variação hormonal.

A massa corpórea dos animais submetidos à OMB, independente do tratamento com anti-inflamatório que receberam, mostrou variação negativa ou próxima a zero no dia 13, apresentando, em alguns grupos, redução significativa em relação aos grupos controles. A terceira semana experimental representa um período onde já houve duas administrações semanais de ácido zoledrônico. A administração dos bisfosfonatos pode estar associada a diversos efeitos colaterais, dos quais se destacam complicações gastrintestinais, como náuseas, vômitos, dor abdominal, dispepsias e anorexia, podendo ocorrer ainda esofagites, úlceras esofágicas e úlceras pépticas (KHAPRA, ROSE, 2006). Além disso, o uso de AINEs ou doenças gastrintestinais pré-existentes foram relacionados com uma maior incidência de efeitos no trato gastrintestinal (TGI) em pacientes em uso de alendronato (ETTINGER, PRESSMAN, SCHEIN, 1998). O mesmo não foi observado em pacientes tratados com risedronato, entretanto, esse fármaco tem demonstrado provocar uma menor incidência desses efeitos adversos (KANATSU et al., 2004). Alterações no trato gastrintestinal podem influenciar no apetite dos animais, e, portanto, gerar redução da massa corpórea dos mesmos.

Em relação à análise dos órgãos após o sacrifício dos animais, o estômago exibiu características semelhantes em os todos os grupos experimentais. Aminobisfosfonatos administrados por via oral, como o alendronato e o risedronato, têm sido associados a efeitos adversos no trato gastrintestinal superior, causando dores abdominais, dispepsia, náusea, vômito e anorexia (KHAPRA, ROSE, 2006). Esses fármacos podem também exercer um efeito irritante tópico no estômago, o que demonstrou piorar úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos e coelhos (WALLACE et al., 1999). Dessa forma, maior incidência de efeitos adversos no estômago relacionada à terapia com aminobisfosfonatos está associada a administração desses fármacos por via oral. Porém, um aumento na frequência de distúrbios gastrintestinais tem sido observado em pacientes tratados com AZ endovenoso (REID et al., 2010), o que provavelmente decorre do aumento de eventos pró-inflamatórios relacionados à

infusão de AZ, mostrando-se reduzido com a administração aguda de ibuprofeno (WARK et al., 2012). Assim, o presente estudo observou que a infusão de AZ endovenoso não pareceu provocar danos grandes à mucosa gástrica, apresentando características semelhantes ao estômago de animais controle tratados com salina.

Por outro lado, no presente trabalho, animais que receberam tratamento com anti-inflamatórios esteroidal e não-esteroidal, associados ou não às infusões de AZ, apresentaram focos inflamatórios junto à ectasia e hemorragia no estômago. Os anti-inflamatórios foram administrados via gavagem, sendo absorvidos no estômago, o que pode ter contribuído para a injúria gástrica observadas nesses animais. Alguns estudos afirmam que a dexametasona, em doses mais altas, podem causar injúrias e esse dano seria induzido pela inibição da síntese de muco gástrico, o aumento da gastrina e hiperplasia de células parietais, aumentando a secreção de ácido e a supressão do metabolismo do ácido araquidônico e síntese de prostaglandinas (MENGUY, MESTRES, 1963; DELANEY et al., 1979; BANDYOPADHYAY et al., 1999, MANJARI, DAS, 2000). No presente trabalho, a injúria gástrica nos animais tratados com anti-inflamatórios esteroidais também esteve relacionada às doses intermediária e alta de dexametasona, o que confirma esses achados.

Além disso, mesmo que os AINEs sejam classicamente relacionados a essas alterações, devido à inibição de COX no estômago (VANE, BOTTING, 1997), a nimesulida tem mostrado menor propriedade de danos gástricos do que outros AINEs (BJARNASON, THJODLEIFSSON, 1999; SHAH, MURRAY, FITZGERALD, 1999). No presente trabalho, o tratamento com nimesulida nos animais controle ou submetidos às administrações de AZ, causou alterações gástricas semelhantes. Essa diferença pode se dar pelo fato de, nessa investigação experimental, ter sido utilizado um AINE com menor potencial de dano à mucosa gástrica (SHAH et al., 2001), junto a um aminobisfosfonato por via endovenosa.

No fígado, os animais desse estudo submetidos às infusões de AZ apresentaram características semelhantes ao grupo controle tratado com salina. As características farmacocinéticas do AZ contribuem para que não haja efeitos adversos sobre esse órgão, uma vez que cerca de 50% do fármaco é incorporado na sua forma inalterada pelo esqueleto e a outra metade é não-metabolizada e excretada na urina (KIMMEL, 2007; POLYZOS et al., 2011).

No presente estudo, o tratamento isolado com anti-inflamatórios esteve associado a moderada ou intensa tumefação de hepatócitos. Além disso, os animais controle tratados com nimesulida apresentaram ainda degeneração hidrópica e necrose focal de hepatócitos. Glicocorticoides demonstram, em altas doses, induzir dano hepático e aumentar o estresse oxidativo celular e a citotoxicidade (RAJAMARAN et al., 2007; FULSKA et al., 2010;

CASTER et al., 2014). Já os AINEs são classicamente relacionados à injúria hepática, sendo responsáveis por 43% dos danos ao fígado oriundos de fármacos (LICATA et al., 2010). A nimesulida mostra potencial de hepatotoxicidade através da formação de metabólitos reativos que modificam covalentemente proteínas e produzem estresse oxidativo e lesão mitocondrial (MINGATTO et al., 2002).

Já foi descrito que o ácido zoledrônico pode induzir o aumento do estresse oxidativo no fígado em modelos *in vivo* (KARABULUT et al., 2010), o que, unido à injúria hepática oriunda do tratamento crônico com nimesulida ou dexametasona, poderia provocar hepatotoxicidade. Na presente investigação experimental, não foram encontradas diferenças entre animais que receberam ou não as infusões de AZ e tratados com nimesulida quanto às características histopatológicas. Já a terapia com a dose intermediária de dexametasona, em animais submetidos às infusões de AZ, esteve associada à degeneração hidrópica de hepatócitos. Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecer o possível dano hepático em pacientes que fazem uso de aminobisfosfonatos.

Os bisfosfonatos são reconhecidamente nefrotóxicos e geralmente causam danos aos rins em terapias que utilizam altas doses e pouco tempo de infusão (WEIDE et al., 2010), sendo, em geral, considerados seguros para utilização em doses terapêuticas (MILLER, 2005; BOONEN et al., 2008). O mecanismo de indução de injúrias renais pelos bisfosfonatos não é totalmente esclarecido, mas postula-se que ocorra através da inibição da via do mevalonato nas células tubulares (PFISTER et al., 2005). Histopatologicamente, os danos renais causados pelos bisfosfonatos podem ser vistos como necrose nefrotóxica, presença de células apoptóticas e perda da borda em escova dos túbulos renais, sem, entretanto causar anomalias glomerulares ou intersticiais significativas (MARKOWITZ et al., 2003; PFISTER et al., 2005). No presente estudo, foi observado presença de cilindros-hialinos em túbulos proximais e distais em todos os grupos que receberam infusão de AZ. Resultado semelhante já foi descrito anteriormente, relatando a presença de cilindros-hialinos em ratos submetidos a infusões de ibandronato (PFISTER et al., 2005).

A toxicidade renal associada com AINEs é vista através da redução da função tubular e da perfusão renal de sódio ou por retenção de líquidos (PAPICH, 2008).. No presente trabalho, os animais controle tratados com nimesulida exibiram maior índice renal quando comparados ao salina. Essas alterações podem estar relacionadas ao regime crônico de administração de nimesulida. Quando associado aos bisfosfonatos, o índice renal diminuiu de maneira significativa, sem, entretanto, haver dano renal evidente quando observado seu aspecto histológico.

A literatura é escassa em relação à toxicidade provocada por altas doses de dexametasona nos rins. Os glicocorticoides inibem a produção de ácido araquidônico, suprimindo de maneira efetiva a ação da enzima COX-2 em sintetizar prostaglandinas e, assim, podem ocasionar injúrias renais. Dessa forma, a maior dose desse fármaco pode ter contribuído para redução do índice renal dos animais controle. Todos os grupos submetidos às infusões de AZ e tratados com anti-inflamatórios apresentaram vacuolização isomérica de epitélio tubular, alteração histológica sugestiva de dano às células renais. Talvez, o AZ, sabidamente nefrotóxico (WEIDE et al., 2010), tenha contribuído para ocorrência deste achado microscópico, somado ao dano induzido pelos anti-inflamatórios.

Animais tratados com fármacos imunossupressores podem exibir uma atrofia do baço, relacionada à redução do número de linfócitos (PEREIRA, 2007). Orzechowski et al. (2002) mostraram que ratos tratados com dexametasona (0,5 a 2 mg/g, via gavagem) podem exibir de 45%, em animais jovens, a 52%, em ratos idosos, de redução no tamanho desse órgão, revertendo seu peso normal 5 dias após a interrupção do tratamento imunossupressor. Isso pode ocorrer devido a uma maior sensibilidade dessas células a efeitos citotóxicos indiretos oriundos de glicocorticoides (ORZECHOWSKI et al., 2002). A injeção diária de 5 mg/kg (via intraperitoneal) por 7, 14 e 28 dias resultou em polpas brancas atroficas, podendo exibir ainda ausência de folículos linfoides e células em apoptose (PEREIRA, 2007). Esses achados confirmam o presente estudo, em que houve redução do índice esplênico em animais controle tratados com dexametasona 0,4 e 4 mg/kg, além de atrofia da polpa branca. A atrofia de polpa branca persistiu nos grupos OMB e tratados com dose intermediária e maior dose de dexametasona. Um estudo atribuiu à combinação de pamidronato e dexametasona uma redução de linfócitos no baço, significativamente maior do que aquela observada nos grupos tratados com pamidronato ou dexametasona isoladamente. Isso sugere que essa alteração poderia ser ocasionada pela supressão da formação de linfócitos associada ao maior deslocamento dessas células para o sangue (MA, WANG, 2014), o que não foi encontrado na presente investigação experimental.

8 CONCLUSÃO

O tratamento com dexametasona, nas diversas doses, ou nimesulida, não foi capaz de atenuar ou inibir a osteólise em modelo experimental de OMB em mandíbulas de ratos.

A administração de dexametasona, sobretudo nas doses de 0.4 e 4 mg/kg provocou leucopenia nos animais, associada a maior incidência de colônias bacterianas e infiltrado inflamatório nos sítios de exodontia.

A nimesulida reduziu, de maneira significativa, o número de polimorfonucleares neutrófilos no sítio de necrose.

A associação entre dexametasona 4 mg/kg e AZ esteve associada a um maior tempo cirúrgico para a exodontia do primeiro molar inferior.

As infusões de ácido zoledrônico resultaram em redução do número de hemácias, dos níveis de hemoglobina e hematócrito além do aumento do índice de anisocitose, sugerindo que houve anemia nos animais submetidos à indução de OMB. A administração de AZ também esteve relacionada à leucocitose em relação a animais controle.

No que concerne à toxicidade sistêmica, a nimesulida, associada ou não às infusões de AZ, levou a danos na mucosa gástrica e no fígado. A administração de AZ provocou ainda alterações renais leves, que foram potencializadas quando associados aos tratamentos com anti-inflamatórios. Além disso, o tratamento com dexametasona causou atrofia esplênica.

REFERÊNCIAS

- AAPRO, M., ABRAHAMSSON, P. A., BODY, J. J., COLEMAN, R. E., COLOMER, R., COSTA, L., CRINO, L., DIRIX, L., GNANT, M., GRALOW, J., HADJI, P., HORTOBAGYI, G. N., JONAT, W., LIPTON, A., MONNIER, A., PATERSON, A. H. G., RIZZOLI, R., SAAD, F., THURLIMANN, B. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumors: recommendations of an international expert panel. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 3, p. 420–432, 2008.
- ABTAHI, J., AGHOLME, F., SANDBERG, O., ASPENBERG, P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 6, p. 494-499, 2012.
- AGHALOO, T. L., KANG, B., SUNG, E. C., SHOFF, M., RONCONI, M., GOTCHER, J. E., BEZOUGLAIA, O. DRY, S. M., TETRADIS, S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 8, p. 1871-1882, 2011.
- AGUIRRE, J. I., AKHTER, M. P., KIMMEL, D. B., PINGEL, J. E., WILLIAMS, A., JORGENSEN, M., KESAVALU, L., WRONSKI, T. J. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) With periodontitis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n.10, p. 2130–2143, 2012.
- ALLEGRA, A., OTERI, G., NASTRO, E., ALONCI, A., BELLOMO, G., DEL FABRO, V., QUARTARONE, E., ALATI, C., DE PONTE, F. S., CICCIO, D., MUSOLINO, C. Patients with bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw have reduced circulating endothelial cells. **Hematological Oncology**, v. 25, n. 4, p. 164-169, 2007.
- ALLEN, M. R., CHU, T-M. G., RUGGIERO, S. L. Absence of exposed bone following dental extraction in beagle dogs treated with 9 months of high-dose zoledronic acid combined with dexamethasone. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 6, p. 1017-1026, 2013.
- ALLISON, M. C., HOWATSON, M. G., TORRANCE, C. J., LEE, F. D., RUSSELL, R.I. Gastrointestinal damage associated with the use of NSAIDs. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 11, p.749–754, 1992.
- ALMEIDA, M.; HAN, L.; AMBROGINI, E.; BARTELL, S. M.; MANOLAGAS, S. C. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF-kappaB in osteoblastic cells via a PKCbeta/p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 10, p. 2030-2037, 2010.
- ALVES, A. P., PESSOA, C. DO O., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES FILHO, M. O. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 6, p. 457-464, 2007.
- ARAÚJO, F. A. C., SANTOS, T. S., MORAIS, H. H. A, LAUREANO-FILHO, J. R., SILVA, E. D. O., VASCONCELLOS, R. J. H. Comparative analysis of preemptive analgesic effect of

tramadol chlorhydrate and nimesulide following third molar surgery. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v.40, n. 8, p. e346-e349, 2012.

AVELAR, R. L., PRIMO, B. T., VOGT, B. F., SILVA, E. D. O., ANTUNES, A. A., MAGALHÃES, M. T. C., ROCHA, A. Effect of partially selective cyclooxygenase-2 inhibitor in the removal of third molars. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 23, n. 2, p. e-108-e112, 2012.

AYDOGAN, A., KOCER, G., OZMEN, O., KOCER, M., ONAL, L., KOSKAN, O. Immunohistochemical expression of caspase-3, caspase-5, caspase-7 and apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1) in the liver and kidney of rats exposed to zoledronic acid (ZOL) and basic fibroblast growth factor (bFGF). **Veterinary Quarterly**, v. 34, n. 3, p. 137-142, 2014.

BALDI, D., IZZIOTTI, A., BONICA, P., PERA, P., PULLIERO, A. Degenerative periodontal-diseases and oral osteonecrosis: The role of gene-environment interactions. **Mutation Research**, v. 667, n. 1-2, p. 118–131, 2009.

BANDYOPADHYAY, U., BISWAS, K., BANDYOPADHYAY, D., GANGULY, C. K., BANERJEE, R. K. Dexamethasone makes the gastric mucosa susceptible to ulceration by inhibiting prostaglandin synthetase and peroxidase—two important gastroprotective enzymes. **Molecular Cellular Biochemistry**, v. 202, n. 1-2, p. 31–36, 1999.

BARASCH, A., CUNHA-CRUZ, J., CURRO, F. A., HUJOEL, P., SUNG, A. H., VENA, D., VOINEA-GRIFFIN, A. E., BEADNELL, S., CRAIG, R. G., DeROUEN, T., DESARANAYAKE, A., GILBERT, A., GILBERT, G. H., GOLDBERG, K., HAULEY, R., HASHIMOTO, M., HOLMES, J., LATZKE, B., LEROUX, B., LINDBLAD, A., RICHMAN, J., SAFFORD, M., SHIP, J., THOMPSON, V. P., WILLIAMS, O. D., YIN, W. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 4, p. 439-444, 2011.

BARBIEIRI, D., WISNIEWSKI, E., SALETE, M., WISNIEWSKI, W., ROMAN, S. S., CHICOTA, L. C., CEREZER, S. M., DALLAGO, R. G. Animal toxicity caused by formaldehyde and complucad® in wistar rats: acute exposure. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 4, p. 114 - 119, 2010.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, v. 56, n. 3, p. 335–344, 1989.

BENFORD, H. L., MCGOWAN, N. W., HELFRICH, M. H., NUTTAL, M. E., ROGERS, M.J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, v.28, n. 5, p. 465-73, 2001.

BERNARREGI, A. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. **Clinical Pharmacokinetics**, v.35, n. 4, p. 247-274, 1998.

BERTOLINI, A., OTTANI, A., SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 6, p. 437-450, 2001.

BHADADA, S. K., BHANSALI, A., DAS, S., RAO, S. D. Thrombotic thrombocytopenic purpura following zoledronic acid infusion with a fatal outcome. **BMJ Case Reports**, .doi: 10.1136/bcr.09.2008.0923, 2009.

BI, Y., GAO, Y., EHIRCHIOU, D., CAO, CHUNZHANG, C., KIKUIRI, T., LE, A., SHI, S., ZHANG, L. Bisphosphonates Cause Osteonecrosis of the Jaw-Like Disease in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 1, p. 280-290, 2010.

BIANCHI, M., BROGGINI, M. A randomized, double blind, clinical trial comparing the efficacy of nimesulide, celecoxib and rofecoxib in osteoarthritis of the knee. **Drugs**, v. 63, n. Suppl. 1, p. 37-46, 2003.

BJARNASON, I., THJODLEIFSSON, B. Gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: the effect of nimesulide compared with naproxen on the human gastrointestinal tract. **Rheumatology**, v. 38, n. Suppl. 1, p. 24-31, 1999.

BOONEKAMP, P. M., VAN DER WEE-PALS, L. J. A., VAN WIJK-VAN LENNEP, M. L. L., THESING, C. W., BIJVOET, O. L. M. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. **Bone and Mineral**, v.1, n. 1, p. 27-39, 1986.

BOONEN, S., SELLMAYER, D. E., LLIPPUNER, K., ORLOV-MOROZOV, A., ABRAMS, K., MESENBRINK, P., ERIKSEN, E. F., MILLER, P. D. Renal safety of annual zoledronic acid infusions in osteoporotic postmenopausal women. **Kidney International**, v. 74, n. 5, p. 641-648, 2008.

BORGES, L. C. S. F. **Avaliação do complexo maxilo-mandibular de ratos tratados com ácido zoledrônico**. 51 p. 2013. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Sorocaba, Sorocaba-SP.

BRAVO-CUELLAR, A., GARCÍA-REYES, G., BARBA-BARAJAS, M., CARRANCO-LÓPEZ, A., DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, J. R. Modification by nimesulide administration of the phagocytic activity of polymorphonuclears of healthy subjects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 9, p. 434, 2003.

CANKAYA, A. B., ERDEM, M. A., ISLER, S. C., DEMIRCAN, S., SOLUK, M., KASAPOGLU, C., ORAL, C. K. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in an experimental rat model. **International Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 8, p. 667-672, 2011.

CAPSONI, F., VENEGONI, E., MINONZIO, F., ONGARI, A. M., MARESCA, V., ZANUSSI, C. Inhibition of neutrophil oxidative metabolism by nimesulide. **Agents Actions**, v. 21, n. 1-2, p. 121-129, 1987.

CASOLARO, V., MELIOTA, S., MARINO, O., PATELLA, V., De PAULIS, A., GUIDI, G., MARONE, G. Nimesulide, a sulfonanilide nonsteroidal antiinflammatory drug, inhibits mediator release from human basophils and mast cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, n. 3, p.1375-85, 1993.

CASTER, O., CONFORTI, A., VIOLA, E., EDWARDS, I. R. Methylprednisolone-induced hepatotoxicity: experiences from global adverse drug reaction surveillance. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 501–503, 2014.

CEDERBERG, R. A. Intraoral Digital Radiography: Elements of Effective Imaging. **Compendium Continuing Education in Dentistry**, v. 33, n. 9, p. 656-658, 2012.

CHIANDUSSI, S., BIASOTTO, M., DORE, F., CAVALLI, F., COVA, M. A. DI LENARDA, R. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 35, n. 4, p. 236–243, 2006.

CHIU, C. T., CHIANG, W-F., CHUANG, C-Y., CHANG, S-W. Resolution of Oral Bisphosphonate and Steroid-Related Osteonecrosis of the Jaw—A Serial Case Analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n.5, p. 1055-1063, 2010.

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

COHN, L. A. The influence of corticosteroids on host defense mechanisms. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 95-104, 1991.

COLLEONI, G. W. B. Tratamento de primeira linha no Mieloma Múltiplo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 31-35, 2007.

CONTE-NETO, N., DE SOUZA BASTOS, A., SPOLIDORIO, L. C., CHIERICI MARCANTONIO R. A., MARCANTONIO, E. Jr. Long-term treatment with alendronate increases the surgical difficulty during simple exodontias - an in vivo observation in Holtzman rats. **Head & Face Medicine**, v. 8, n. 1, p. 20-24, 2012.

CONTE-NETO, N., SPOLIDORIO, L. C., ANDRADE, C. R., BASTOS, A. S., GUIMARÃES, M., MARCANTONIO Jr., E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 1, p. 65-73, 2013.

CULLEN, L., KELLY, L. CONNOR, O. S., FITZGERALD, D. J. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 287, n. 2, p. 578-582, 1998.

DAMIANI, D., KUPERMAN, H., DICHTCHEKENIAN, V., MANNA, T. D., SETIAN, N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. **Pediatria**, v. 1, n. 1, p. 71-82, 2001.

DAPINO, P, OTTONELLO, L., DALLEGRI, F. The anti-inflammatory drug nimesulide inhibits neutrophil adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells. **Respiration**, v. 61, n. 6, p. 336-341, 1994.

DE BOSSCHER, K., VANDEN BERGHE, W., HAEGEMAN, G. Interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-*κ*B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 4, p. 488-522, 2003.

DE MENEZES, S. A. F., CURY, P. R. Efficacy of nimesulide versus meloxicam in the control of pain, swelling and trismus following extraction of impacted lower third molar. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 6, p.580-584, 2010.

DEL CONTE, A., BERNARDESCHI, P., LA FERLA, F., TURRISI, G., D’ALESSANDRO, M., MONTAGNAMI, F., FIORENTINI, G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw 32 months after interruption of zoledronate in a patient with multiple myeloma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n. 5, p. 1179-1182, 2010.

DELANEY, J. P., MICHEL, H. M., BONSAK, M. E., EISENBERG, M. M., DUNN, D. H. Adrenal corticosteroids cause gastrin cell hyperplasia. **Gastroenterology**, v. 76, n. 5, p. 913-916, 1979.

DENG, X., TAMAI, R., ENDO, Y., KIYOURA, Y. Alendronate augments interleukin-1 β release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 235, n. 1, p. 97-104, 2009.

Di BATTISTA, J., ZHANG, M., MARTEL-PELLETIER, J., FERNANDES, J., ALAAEDDINE, N., PELLETIER, J-P. Enhancement of phosphorylation and transcriptional activity of the glucocorticoid receptor in human synovial fibroblasts by nimesulide, a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n.1, p 157–166, 1999.

DIAS, R., LUCA, L. A., RAMOS, M. D., ANTONINI FILHO, R., RUDGE, M. V. C. Avaliação da atividade estrogênica após a menopausa. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 92, p. 261-9, 1982.

DIEGO, R., D’ORTO, D., PAGANI, D., AGAZZI, A., MARZANO, U., TROLETTI, G. D., FONTANELLA, W., PIGNATARO, L. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a therapeutic dilemma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontology**, v. 103, n. 3, p. e1-e5, 2007.

DINIZ-FREITAS, M., LÓPEZ-CEDRÚN, J. L., FERNÁNDEZ-SANROMÁN, J., GARCÍA-GARCÍA, A., FERNÁNDEZ-FEIJOO, J., DIZ-DIOS, P. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Clinical characteristics of a series of 20 cases in Spain. **Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal**, v. 7, n. 5, p. 751-758, 2012.

ELLIOTT, S. N., McKNIGHT, W., DAVIES, N. M., MacNAUGHTON, W. K., WALLACE, J. L. Alendronate induces gastric injury and delays ulcer healing in rodents. **Life Sciences**, v. 62, n. 1, p. 77 – 91, 1998.

ETTINGER, B., PRESSMAN, A., SCHEIN, J. Clinic visits and hospital admissions for care of acid related upper gastrointestinal disorders in women using alendronate for osteoporosis. **American Journal of Managed Care**, v. 4, n. 10, p. 1377-82, 1998.

FALKENSTEIN, E., NORMAN, A.W., WEHLING, M. Mannheim classification of non genomically initiated (rapid) steroid action(s). **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 5, p. 2072–2075, 2000.

- FAVIA, G., PILOLLI, G. P., MAIORANO, E. Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: An analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy. **Bone**, v. 45, n. 3, p 406–413, 2009.
- FERNANDES, C., LEITE, R. S., LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química. Nova**, v. 28, n. 2, p. 274-280, 2005.
- FERRETTI, G., PETTI, M. C., CARLINI, P., ZEULI, M., PICARDI, A., MELONI, G., BRIAI, E., PAPALDO, P., FABI, A., COGNETTI, F. Zoledronic acid-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 12, p. 18-47-1850, 2004.
- FICARRA, G., BENINATI, F., RUBINO, I., VANNUCCHI A., LONGO, G., TONELLI, P., PINI PRATO, G. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n.11, p. 1123–1128, 2005.
- FLEISCH, H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 1, p. 80–100, 1998.
- FUKSA, L., BRČAKOVA, E., KOLOUCHOVA, G., HIRSOVA, P., HROCH, M., CERMANOVA, J., STAUD, F., MICUDA, S. Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 267, n. 1-3, p. 165–171, 2010.
- GRAVES, P. **Histopathology of preclinical toxicity studies**. Elsevier, 3ª edição, 2007.
- GREEN, J. R. Bisphosphonates: preclinical review. **Oncologist**, v. 9, n. Suppl. 4, p. 3-13, 2004.
- GREENSTEIN, S., GHAS, K., KRETT, N. L., ROSEN, S. T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. 1681–1694, 2002.
- HAFEZI-MOGHADAM, A., SIMONCINI, T., YANG, Z., LIMBOURG, F.P., PLUMIER, J.C., REBSAMEN, M.C., HSIEH, C.M., CHUI, D.S., THOMAS, K.L., PROROCK, A.J., LAUBACH, V.E., MOSKOWITZ, M.A., FRENCH, B.A., LEY, K., LIAO, J.K. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nature Medicine**, v. 8, n. 5, p. 473–479, 2002.
- HALLEEN, J. M., RÄISÄNEN, S., SALO, J. J., REDDY, S. V., ROODMAN, G. D., HENTUNEN, T. A., LEHENKARI, P. P., KAIJA, H., VIHKO, P., VÄÄNÄNEN, H. K. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 33, p. 22907-22910, 1999.
- HANSEN, T., KIRKPATRICK, C. J., WALTER, C., KUNKEL, M. Increased numbers of osteoclasts expressing cysteine proteinase cathepsin K in patients with infected osteoradionecrosis and bisphosphonate-associated osteonecrosis—a paradoxical observation? **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, v. 449, n. 4, p. 448-454, 2006.

HELLSTEIN, J. W., MAREK, C. L., Bisphosphonate Osteochemonecrosis (Bis-Phossy Jaw): Is This Phossy Jaw of the 21st Century? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 5, p. 682-689, 2005.

HIKITA, H., MIYAZAWA, K., TABUCHI, M., KIMURA, M., GOTO, S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 663-672, 2009.

HOFF, A. O., TOTH, B. B., ALTUNDAG, K., JOHNSON, M. M., WARNEKE, C. L., HU, M. NOOKA, A., SAYEGH, G., GUARNERI, V., DESROULEAUX, K., CUI, J., ADAMUS, A., GAGEL, R. F., HORTOBAGYI, G. N. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.23, n. 6, p. 826–836, 2008.

HORNBY, S. B., EVANS, G. P., HORNBY, S. L., PATAKI, A., GLATT, M., GREEN, J.R. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adults rats. **Calcified Tissue International**, v.72, n. 4, p. 519-27, 2003.

HUGHES, D. E., WRIGHT, K. R., UY, H. L., SASAKI, A., YONEDA, T., ROODMAN, G. D., MUNDY, G. R., BOYCE, B.F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 10, p. 1478–87, 1995.

HUGHES, J. P., BARON, R., BUCKLAND, D. H. Phosphorus necrosis of the jaw: A present-day study. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 19, p. 83-99, 1962.

HUJA S. S., FERNANDEZ S. A., HILL K. J., LI, Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. **Anatomical Record A Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 12, p. 1243–1249, 2006.

HUNGRIA, V. T. M. Tratamento do Mieloma Múltiplo recidivado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 48-73, 2007.

ISLAS-CADENA, M., AGUIRRE-BAÑUELOS, P., GRANADO-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 87–92, 1999.

JABBOUR, Z., HAKIM, M. E., HENDERSON, J. E., ALBUQUERQUE, R. F. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. **Oral Oncology**, v. 50, n. 5, p. 485-490, 2014.

JIA, D., O'BRIEN, C. A., STEWART, S. A., MANOLAGAS, S. C., WENSTEIN, R. S. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5592-5599, 2006.

JILKA, R. L., NOBLE, B., WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 5, n. 2, p. 264-271, 2013.

JUNG, A., BISZA, S., FLEISCH, H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. **Calcified Tissue Research**, v.11, n. 4, p.269-80, 1973.

JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.

KANATSU, K, AIHARA, E, OKAYAMA, M., KATO, S., TAKEUCHI, K. Mucosal irritative and healing impairment action of risedronate in rat stomachs: comparison with alendronate. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.19, n. 5, p. 512-520, 2004.

KANG, B., CHEONG, S., CHAICHANASAKUL, T., BEZOUGLAIA, O., ATTI, E., DRY, S. M., PIRIH, F., Q., AGHALOO, T. L., TETRADIS, S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.28, n. 7, p. 1631-1640, 2013.

KARABULUT, A. B., GÜL, M., KARABULUT, E., KIRAN, T. R., OCAK, S. G., OTLU, O. Oxidant and antioxidant activity in rabbit livers treated with zoledronic acid. **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 9, p. 3820–3822, 2010.

KATZ, H. Endodontic Implications of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws: A Report of Three Cases. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 11, 2005.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica**. 10^a Ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

KEKLIKOGLU, N. The localization of Fos B, a member of transcription factor AP-1 family, in rat odontoblasts and pulpal undifferentiated ectomesenchymal cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 42, n. 3, p. 191-193, 2004.

KERACHIAN, M. A., HARVEY, E. J., CHOW, T. Y., NAHAL, A., SÉGUIN, C. A rat model of early stage osteonecrosis induced by glucocorticoids. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.6, p. 62-68, 2011.

KERACHIAN, M. A., SÉGUIN, C., HARVEY, E. J. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: A new understanding of the mechanisms of action. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 114, n. 3-5, p. 121–128, 2009.

KHAPRA, A. P., ROSE, S. Drug injury in the upper gastrointestinal tract: effects of Alendronate. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v.16, n. 1, p. 99– 110, 2006.

KHOSLA, S., BURR, D., CAULEY, J., DEMPSTER, D. W., EBELING, P., R., FELSEMBERG, D., GAGEL, R. F., GILSANZ, V., GUISE, T., KOKA, S., MCCAULEY, L. K., MCGOWAN, J., MCKEE, M. D., MOHLA, S., PENDRYS, D. G., RAISZ, L. G., RUGGIERO, S. L., SHAFER, D. M., SHUM, L., SILVERMAN, S. L., VAN POZNAK, C. H., WATTS, N., WOO, S-B., SHANE, E. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 10, p. 1480-1489, 2007.

KIMMEL, D. B. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen- containing bisphosphonates. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 11, p. 1022–1033, 2007.

KLINGENSTEIN, G., LEVY, R. N., KORNBLUTH, A., SHAH, A. K., PRESENT, D. H. Inflammatory bowel disease related osteonecrosis: report of a large series with a review of the literature. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.21, n. 3, p. 243–249, 2005.

KOBAYASHI, Y., HIRAGA, T., UEDA, A., WANG, L., MATSUMOTO-NAKANO, M., HATA, K., YATANI, H., YONEDA, T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 28, n. 2, p. 165-175, 2010.

KOPKA, A., JANISZEWSKI, S., SZWED, M., DUDA, W., BUKOWSKA, B. The effect of alendronate sodium on human erythrocytes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p.306-314, 2011.

KRISHNAN, A., ARSLANOGLU, A., YILDIRIM, N., SILBERGLEIT, R., AYGUN, N. Imaging findings of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with emphasis on early magnetic resonance imaging findings. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 33, n. 2, p. 298-304, 2009.

KULLICK, W. C., NIKSIC, F., KLEIN, G. Effect of nimesulide on metalloproteinase and matrix degradation in osteoarthritis: A pilot clinical study. **International Journal of Clinical Practice**, v. 128, n. Suppl., p. 24–29, 2002.

JIA, D., O'BRIEN, C. A., STEWART, S. A., MANOLAGAS, S. C., WEINSTEIN, R. S. Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and Reduce Bone Density. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5592–5599, 2006.

LESCLOUS, P., NAJM, S. A., CARREL, J. P., BAROUKH, B., LOMBARDI, T., WILLI, J. P., RIZZOLI, R., SAFFAR, J. L., SAMSON, J. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? **Bone**, v. 45, n. 5, p. 843-852, 2009.

LESTER, R. S. Corticosteroids. **Clinical Dermatology**, v.7, n.3, p. 80-97, 1989.

LI E. C., DAVIS L. E. Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. The pharmacokinetics. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 11, p. 2669-2708, 2003.

LI, X., JIN, L., CUI, Q., WANG, G. J., BALIAN, G. Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 1, p. 101–108, 2005.

LICATA, A., CALVARUSO, V., CAPPELO, M., CRAXI, A., AMASIO, P. L. Clinical course and outcomes of drug-induced liver injury: Nimesulide as the first implicated medication. **Digestive and Liver Disease**, v. 42, n. 2, p. 143–148, 2010.

LICHTENBERGER, L. M., ROMERO, J. J., GIBSON, G. W., BLANK, M. A. Effect of bisphosphonates on surface hydrophobicity and phosphatidylcholine concentration of rodent gastric mucosa. **Digestory Disease and Science**, v. 45, n. 9, p. 1792– 801, 2000.

LÓPEZ-JORNET, P., CAMACHO-ALONSO, F., MOLINA-MIÑANO, F., GÓMEZ-GARCÍA, F., VICENTE-ORTEGA, V. An experimental study of bisphosphonate-induced

jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 9, p. 697-702, 2010.

LOU, T. D., ALLEN, M. R. Short-courses of dexamethasone abolish bisphosphonate induced reductions in bone toughness. **Bone**, v. 56, n. 1, p. 199-203, 2013.

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

MA, X. L., LIU, Z. P., MA, J. X., HAN, C., ZANG, J. C. Dynamic expression of Runx2, Osterix and AJ18 in the femoral head of steroid-induced osteonecrosis in rats. **Orthopaedic Surgery**, v. 2, n. 4, p. 278-284, 2010.

MA, Z. Y., WANG, Y. X. Establishment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw model in rats and preliminary analysis of its etiological mechanism. **Beijing Da Xue Xue Bao**, v. 46, n. 6, p. 945-949, 2014.

MAAHS, M. P., AZAMBUJA, A. A., CAMPOS, M. M., SALUM, F. G., CHERUBINI, K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head & Neck**, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2011.

MaCDOUGALL, I. C., COOPER, A. C. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. **Nephrology, dialysis, transplantation**, v. 17, n. Suppl. 11, p. s39-s43, 2002.

MANJARI, V., DAS, U. N. Effect of polyunsaturated fatty acids on dexamethasone – induced gastric mucosal damage. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 62, n. 2, p. 85–96, 2000.

MARINO, K. L.; ZAKHARY, I.; ABDELSAYED, R. A.; CARTER, J. A.; O'NEILL, J. O.; KHASHABA, R. M.; ELSALANT, M.; STEVENS, M. R.; BORKE, J. L. Development of a Rat Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). **The Journal of Oral Implantology**, v. 38, p. 511-528, 2012.

MARKOWITZ, G. S., FINE, P. L., STACK, J. I. KUNIS, C. L., RADHAKRISHNAN, J., PALECKI, W., PARK, J., NASR, S. H., HOH, S., SIEGEL, D. S., D'AGATI, V. D. Toxic acute tubular necrosis following treatment with zoledronate (zometa). **Kidney International**, v. 64, n. 1, p. 281-289, 2003.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 9, p. 1115-1118, 2003.

MARX, R.E., SAWATARI, Y., FORTIN, M., BROUMAND, V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1567–1575, 2005.

MASHIBA, T., MORI, S., BURR, D., KOMATSUBARA, S., CAO, Y., MANABE, T., NORIMATSU, H. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on

microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. Suppl, p. 36-42, 2005.

MELLO, S. B. V., LAURINDO, I. M. M., COSSERMELLI, W. Action of the 4-nitro-2-phenoximethanesulphonanilide (Nimesulide) on neutrophil chemotaxis and superoxid production. **São Paulo Medical Journal**, v. 112, n. 1, p. 489-494, 1994.

MENGUY, R., MASTERS, Y. F. Effect of cortisol on mucoprotein secretion by gastric antrum of dogs: pathogenesis of steroid ulcers. **Surgery**, v. 54, p. 19-28, 1963.

MIGLIORATI, C. A., SIEGEL, M. A., ELTING, L. S. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. **Lancet Oncology**, v. 7, n. 7, p. 508–14, 2008.

MILLER, P. D. The kidney and bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p.77-81, 2011.

MINGATTO, F. E., RODRIGUES, T., PIGOSO, A. A., UYEMURA, S. A., CURTIS, C., SANTOS, A. C. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.303, n. 2, p. 601-607, 2002.

MIYAZAKI, H., NISHIMASTU, H., KUME, H., SUZUKI, M., FUJIMURA, T., FUKUHARA, H., ENOMOTO, Y., ISHIKAWA, A., IGAWA, Y., HIRANO, Y., HOMMA, Y. Leukopenia as a risk factor for osteonecrosis of the jaw in metastatic prostate cancer treated using zoledronic acid and docetaxel. **British Journal of Urology International**, v. 110, n. 11 (pt B), p. e520-e525, 2012.

MIZUNO, H., UEMURA, K., MORIYAMA, A., WADA, Y., ASAI, K., KIMURA, S., KATOAL, T. Glucocorticoid induced the expression of mRNA and the secretion of lipocortin 1 in rat astrocytoma cells. **Brain Research**, v. 746, n. 1-2, p. 256-264, 1997.

MOLON, R. S., CHEONG, S., BEZOUGLAIA, O., DRY, S. M., PIRIH, F., CIRELLI, J. A., AGHALOO, T. L., TETRADIS, S. Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive treatment: A novel ONJ mouse model. **Bone**, v. 68, p. 11-19, 2014.

MOTOMURA, G., YAMAMOTO, T., IRISA, T., MIYANISHI, K., NISHIDA, K., IWAMOTO, Y. Dose effects of corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 12, p. 2395–2399, 2008.

MOZZATI, M., MARTINASSO, G., MAGGIORA, M., SCOLETTA, M., ZAMBELLI, M., CAROSSA, S., ORALDI, M., MUZIO, G., CANUTO, R. A. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. **Clinical Oral Investigation**, v 17, n. 4, p. 1259–1266, 2013.

NAGANO, Y., MATSUI, H., SHIMOKAWA, O., HIRAYAMA, A., NAKAMURA, Y., TAMURA, M., RAI, K., KANEKO, T., HYODO, I. Bisphosphonate-induced gastrointestinal mucosal injury is mediated by mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 196-203, 2012.

NEUPERT, E. A., LEE, J. W., PHILPUT, C. B., GORDON, J. R. Evaluation of dexamethasone for reduction of postsurgical sequelae of third molar removal. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 50, n. 11, p.1177-1183, 1992.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**, v. 55, n. 7, p. 603-613, 2000.

NORTON, J. T., HAYASHI, T., CRAIN, B., CHO, J. S., MILLER, L. S., CORR, M., CARSON, D. A. Cutting edge nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 2977-2980, 2012.

O'BRIEN, C. A., DANJIA, L. I. P., BELLIDO, T., POWERS, C. C., STEWART, S. A., MANOLAGAS, S. C. WENSTEIN, R. S. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1835–1841, 2004.

O'NEILL, G., FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase- 1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Letters**, v. 330, n. 2, p.156–160, 1993.

ORZECZOWSKI, A., OSTASZEWSKI, P., WILCZAK, J., JANK, M. BAŁASINSKA, B., WARESKI, P., FULLER JR, J. Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n. 5, p. 256–263, 2002.

OTTONELLO, L., DAPINO, P., PASTORINO, G., DALLEGRI, F. Inhibition of the neutrophil oxidative response induced by the oral administration of nimesulide in normal volunteers. **Journal of Clinical Laboratory Immunology**, v. 37, n. 2, p. 91-96, 1992.

PAPICH, M. G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 6, p. 243-266, 2008.

PATRONO, C., CIABATTONI, G., PATRIGNANI, P., PUGLIESE, F., FILABUZZI, P., CATELLA, F., DAVI, G., FORNI, L. Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. **Circulation**, v. 72, n. 6, p. 117–184, 1985.

PAZIANAS, M. Osteonecrosis of the Jaw and the Role of Macrophages. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 3, p. 232-240, 2011.

PELLETIER, J. P., DI BATTISTA, J. A., ZHANG, M., FERNANDES, J., ALAAEDDINE, N., MARTEL-PELLETIER, J. Effect of nimesulide on glucocorticoid receptor activity in human synovial fibroblasts. **Rheumatology**, v. 38, n. Suppl. 1, p. 11–13, 1999.

PEREIRA, A. **Efeitos imunossupressores da dexametasona, ciclosporina e ciclofosfamida sobre linfócitos B e T de camundongos Balb/C**. 66 p. 2007. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Paulista, São Paulo-SP.

PEREIRA, A. L. C., BOLZANI, F. C. B., STEFANI, M., CHALIN, R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 35, n. 1, p. 35-50, 2007.

PEREIRA, F. R. A., DUTRA, R. C., OLÍMPIO, T. C. R., MULLER, S. S., PALÁCIO, E. P. Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas: Estudo prospectivo e randomizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 1, p. 61-68, 2009.

PFISTER, T., ATZPODIEN, E., BOHRMANN, B., BAUSS, F. Acute Renal Effects of Intravenous Bisphosphonates in the Rat. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 97, n. 6, p. 374–381, 2005.

POLYZOS, S. A., KOUNTOURAS, J., ANASTASILAKIS, A. D., LITSAS, I., KITA, M., ARSOS, G., MORALIDIS, E., TERPOS, E. Zoledronic acid-induced transient hepatotoxicity in a patient effectively treated for Paget's disease of bone. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 1, p. 363-367, 2011.

POWELL, C., CHANG, C., NAGUWA, S. M., CHEEMA, G., GERSHWIN, E. Steroid induced osteonecrosis: An analysis of steroid dosing risk. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 11, p. 721–743, 2010.

POZZI, S., MARCHESELLI, R., SACCHI, S., BALDINI, L., ANGRILLI, F., PENNESE, E., QUARTA, G., STELITANO, C., CAPAROTTI, G., LUMINARI, S., MUSTO, P., NATALE, D., BROGLIA, C., CUOGHI, A., DINI, D., Di TONNO, P., LEONARDI, G., PIANEZZE, G., PITINI, V., POLIMENO, G., PONCHIO, L., MASINI, L., MUSSO, M., SPRIANO, M., POLLASTRI, G. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, n. 1, p. 56-64, 2007.

RAGOT, J. P., GIORGI, M., MARINONI, M., MACCHI, M., MAZZA, P., RIZZO, S., GARRAMONE, R., MONTI, P. Acute activity of nimesulide in the treatment of pain after oral surgery-double-blind, placebo and mefenamic acid controlled study. **European Journal Clinical Research**, v. 5, p. 39–50, 1994.

RAINSFORD K.D., BEVILACQUA, M., DALLEGRI, F., GAGO, F., OTTONELLO, L. SANDRINI, G. **Pharmacological properties of nimesulide. In: Nimesulide. Actions and Uses.** Ed. Rainsford K. D. Basel, Birkhäuser Verlag, p. 133–244, 2005.

RAINSFORD, K. D. Current status of the therapeutic uses and actions of the preferential cyclo-oxygenase-2 NSAID, nimesulide. **Inflammopharmacology**, v. 54, n. 3-4, p. 120–137, 2006.

RAJARAMAN, G., WANG, Q., YAN, J., JIANG, P., GONGO, Y., BURCZYNSKI, F. J. Role of cytosolic liver fatty acid binding protein in hepatocellular oxidative stress: effect of dexamethasone and clofibrate treatment. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 295, n. 1-2, p. 27–34, 2007.

RAJKUMAR, S. V., GREIPP, P. R., JACOBUS, S., CALLANDER, N. S., FONSECA, R., VESOLE, D. H., WILLIAMS, M. E., ABONOUR, R., SIEGEL, D. S., KATZ, B. S. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. **Lancet Oncology**, v. 11, n. 1, p. 29–37, 2010.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., GARDNER, P. **Farmacologia**. Elsevier, 6^a ed. 2007.

REID, I. R., GAMBLE, G. D., MESENBRINK, P., LAKATOS, P., BLACK, D. M. Characterization of and risk factors for the acute-phase response after zoledronic acid. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4380-4387, 2010.

REIGNER, B.G., BLESCH, K. S. Estimating the starting dose for entry into humans: principles and practice. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 12, p.835-845, 2002.

RHEN, T., CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **The New English Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

RHEN, T., CIDLOWSKI, J. A. **Nuclear factor- κ B and glucocorticoid receptors**. Em: Martini L., Ed. Encyclopedia of endocrine diseases. Vol. 3. Boston: Elsevier Academic Press, p. 391-398, 2004.

RODAN, G. A., FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 12, p. 2692–2696, 1996.

ROELOFS, A. J., THOMPSON, K., EBETINO, F. H., ROGERS M. J., COXON, F.P. Bisphosphonates: molecular mechanism of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 27, p. 2950-2960, 2010.

ROGERS, M. J., FRITH, J. C., LUCKMAN, S. P., COXON, F. P., BENFORD, H. L., MÖNKKÖNEN, J., AURIOLA, S., CHILTON, K. M., RUSSELL, G. G. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v. 24, n. Suppl. 5, p. 73S-79S, 1999.

ROGERS, M. J., GORDON, S., BENFORD, H. L., COXON, F. P., LUCKMAN, S. P., MONKKONEN, J., FRITH, J.C. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. **Cancer**, v. 88, n. Suppl. 12, p. 2961-2978, 2000.

ROSSINI, M., ADAMI, S., VIAPIANA, O., ORTOLANI, R., VELLA, A., FRACASSI, E., GATTI, D. Circulating $\gamma\delta$ T cells and the risk of acute-phase response after zoledronic acid administration. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.27, n. 1, p. 227-30, 2012.

RUGGIERO S., DODSON T. B., ASSAEL, L. A., LANDESBERG, R., MARX, R. E., MEHROTRA, B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw – 2009 update. **Australian Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 119-30, 2009.

RUGGIERO, S. L. Emerging Concepts in the Management and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw. **Oral Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p.11-20, 2013.

RUGGIERO, S. L., MEHROTA, B., ROSENBERG, T. J., ENGROFF, S. L. Osteonecrosis of the Jaws Associated With the Use of Bisphosphonates: A Review of 63 Cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 5, p. 527-534, 2004.

RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology bisphosphonates on breast cancer cell lines. **Pediatrics**, v.119, p. S150-S162, 2007.

RUSSELL, R. G. G., CROUCHER, P. I., ROGERS, M. J. Bisphosphonates: Pharmacology, Mechanisms of Action and Clinical Uses. **Osteoporosis International**, v. 9, n. Suppl. 2, p. S66–S80, 1999.

SANTINI, D., VINCENZI, B., AVIISATI, G., DICUONZO, G., BATTISTONI, F., GAVASCI, M., SALERNO, A., DENARO, V., TONINI, G. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 1080-1084, 2002.

SATO, M., GRASSER, W., ENDO, N., AKINS, R., SIMMONS, H., THOMPSON, D. D., GOLUB, E., RODAN, G. A. Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p. 2095-2105, 1991.

SELANDER, K. S., MÖNKKÖNEN, J., KARHUKORPI, E.-K., HÄRKÖNEN, P., HANNUNIEMI, R., AND VÄÄNÄNEN, H. K. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. **Molecular Pharmacology**, v. 50, n. 5, p. 1127–1138, 1996.

SELANDER, K., LEHENKARI, P., VAANANEN, H. K. The effects of bisphosphonates on the resorption cycle of isolated osteoclasts. **Calcified Tissue International**, v. 55, n. 5, p. 368–75, 1994.

SENEL, F. C., KADIOGLU DUMAN, M., MUCI, E., CANKAYA, M., PAMPU, A. A., ERSOZ, S., GUNHAN, O. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 109, n. 3, p. 385-391, 2010.

SHAH, A. A., MURRAY, F. E., FITZGERALD, D. J. The in vivo assessment of nimesulide cyclooxygenase-2 selectivity. **Rheumatology**, v.38, n. Suppl. 1, p. 19-23, 1999.

SHAH, A. A., THJODLEIFSSON, B., MURRAY, F. E., SIGHTORSSON, G., ODDSON, E., GUDJONSSON, H., PRICE, A. B., FITZGERALD, D. J., BJARNASON, I. A randomised, double blind, double dummy, crossover study of the effects of nimesulide and naproxen on the gastrointestinal tract and na in vivo assessment of their selectivity for cyclooxygenase 1 and 2. **Gut**, v. 48, p. 339–48, 2001.

SHIPMAN, C. M., CROUCHER, P. I., RUSSELL, R. G., HELFRICH, M. H., ROGERS, M. J. The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. **Cancer Research**, v.58, n. 23, p. 5294–5297, 1998.

SILVA, P. G. B. **Avaliação histológica, radiográfica, hematológica e de toxicidade órgão-específica em modelo dose-resposta de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico na mandíbula de ratos.** 121 p. 2013. Mestrado em Odontologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

- SINGLA, A. K., CHAWA, M., SINGH, A. Nimesulide: some pharmaceutical and Pharmacological aspect: an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n.5, p. 467-486, 2000.
- SONIS, S.T., WATKINS, B. A., LYNG, G. D., LERMAN, M. A., ANDERSON, K. C. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncology**, v. 45, n. 2, p. 164-72, 2009.
- SORIANELLO, E., SCHILLACI, R., CHAMSON-REIG, A., LUX-LANTOS, V., LIBERTUN, C. Actions of immunosuppressor drugs on the development of an experimental ovarian tumor. **Experimental Biology Medicine**, v.227, n. 8, p. 658-660, 2002.
- SOTTO-MAIOR, B. S., SENNA, P. M., ASSIS, N. M. P. Corticosteroids or cyclooxygenase-2-selective inhibitor medication for the management of pain and swelling after third-molar surgery. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 22, n. 2, p. 758-761, 2011.
- STAHN, C., LOWENBERG, M., HOMMES, D. W., BUTTGEREIT, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, n. 1-2, p. 71–78, 2007.
- STOCKMAN, R. On the cause of so called phosphorus necrosis of the jaw in match-workers. **The British Medical Journal**, v. 7, p. 9-10, 1899.
- SWENSON, E. D., HANSEN, K. E., JONES, A. N., BROOKE, Z. L., BLATZ-WARD, B., SCHUNA, A. A., ELLIOT, M. E. Characteristics Associated with Bone Mineral Density Responses to Alendronate in Men. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 6, p. 548-556, 2013.
- TALAMO, G., ANGTUACO, E., DONG, W. L., MICELI, M. H., ZANGARI, M., TRICOT, G., BARLOGIE, B., ANAISSIE, E. Avascular necrosis of femoral and/or humeral heads in multiple myeloma: results of a prospective study of patients treated with dexamethasone-based regimens and high-dose chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 22, p. 5217-5223, 2005.
- TAKESHITA, W. M., IWAKI, L. C. V., SILVA, M. C., TONIN, R. A. Evaluation of diagnostic accuracy of conventional and digital periapical radiography, panoramic radiography, and cone-beam computed tomography in the assessment of alveolar bone loss. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 5, n. 3, p. 318-323, 2014.
- TANIGUCHI, Y., YOKOYAMA, K., INUI, K., DEGUCHI, Y., FURUKAWA, K., NODA, K. Inhibition of brain cyclooxygenase-2 activity and the antipyretic action of nimesulide. **European Journal of Pharmacology**, v. 330, n. 2-3, p. 221–229, 1997.
- TIAN, L., WEN, Q., DANG, X., FAN, L., WANG, K. Immune response associated with Toll-like receptor 4 signaling pathway leads to steroid-induced femoral head osteonecrosis. **BME Musculoskeletal Disorders**, v. 15, p. 18-28, 2014.

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

TOOL, A. T., VERHOEVEN, A. J. Inhibition of the production of platelet activating factor and leukotriene B4 in activated neutrophils by nimesulide due to an elevation of intracellular cyclic adenosine monophosphate. **Arzneim. Forsch**, v. 45, n. 10, p. 1110-1114, 1995.

TORRES, S. R., CHEN, C. S. K., LEROUX, B. G., LEE, P. P., HOLLENDER, L. G., SANTOS, E. C. A., DREW, S. P., HUNG, K-C., SCHUBERT, M. M. Mandibular cortical bone evaluation on cone beam computed tomography images of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 113, n. 5, p. 695-703, 2012.

TOSI, P., ZAMAGI, E., CANGINI, D., TACCHETTI, P., DI RAIMONDO, CATALANO, L., D'ARCO, A., RONCONI, S., CELLINI, C., OFFIDANI, M., PERRONE, G., CECCOLINI, M., BRIOLI, A., TURA, S., BACCARANI, M., CAVO, M. Osteonecrosis of the jaws in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with zoledronic acid and thalidomide-dexamethasone. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3951-3952, 2006.

TREISTER, N., SHEEHY, N., BAE, E. H., FRIEDLAND, B., LERMAN, M., WOO, S. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. **Oral Diseases**, v. 15, n. 1, p. 88-92, 2009.

TSAO, C., DARBY, I., EBELING, P. R., WALSH, K., O'BRIEN-SIMPSON, N., REYNOLDS, E., BORROMEIO, G. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 8, p. 1360-1366, 2013.

VANE, J. R., BOTTING, R. M. Mechanism of Action of Aspirin-Like Drugs. **Seminars Arthritis and Rheumatis**, v. 26, n. 6 (Suppl. 1) p. 2-10, 1997.

VANE, J. R., BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, v.104, n. 3A, p. 2S-8S, 1998.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. **Nature**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VANNUCCHI, A. M., FICARRA, G., ANTONIOLI, E., BOSI, A. Osteonecrosis of the jaw associated with zoledronate therapy in a patient with multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, v. 128, n. 6, p. 738, 2005.

VASCONCELOS, M. C., BEZERRA, D. P., FONSECA, A. M., PEREIRA, M. R. P., LEMOS, T. L. G., PESSOA, O. D. L., PESSOA, C., MORAES, M. O., ALVES, A. P. N. N., COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of Biflorin, an *o*-Naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1416-1421, 2007.

VERHOEVEN, A. J., TOOL, A. T., KUIJPERS, T. W., ROOS, D. Nimesulide inhibits platelet-activating factor synthesis in activated human neutrophils. **Drugs**, v. 46, n. Suppl. 1, p. 52-8, 1993.

VITTE, C., FLEISCH, H., GUENTHER, H. L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, v.137, n. 6, p. 2324–33, 1996.

WALLACE, J. L., DICAY, M., McKNIGHT, W., BASTAKI, S., BLANK, M. A. N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, n. 12, p. 1675– 82, 1999.

WALTER, C., KLEIN, M. O., PABST, A., NAWAS, A., DUSCHNER, H., ZIEBART, T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. **Clinical Oral Investigation**, v. 14, n. 1, p. 35-41, 2010.

WANG, J., GOODGER, N. M., POGREL, M. A. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 9, p. 1104-1107, 2003.

WANG, P. E., KABAN, L. B., STREWLER, G. J., RAJE, N., TROULIS, M. J. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 7, p. 1328-1331, 2007.

WARK, J. D., BENSEN, W., RECKNOR, C., RYABITSEVA, O., CHIODO III, J., MESENBRINK, P., VILLIERS, T. J. Treatment with acetaminophen/paracetamol or ibuprofen alleviates post-dose symptoms related to intravenous infusion with zoledronic acid 5 mg. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 2, p. 503-512, 2012.

WEIDE, R., KÖPPLER, H., ANTRÀSL, L., SMITH, M., CHANG, E. MPH, GREEN, J., WINTFELD, N., NEARY, M. P., DUH, M. S. Renal toxicity in patients with multiple myeloma receiving zoledronic acid vs. ibandronate: A retrospective medical records review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 6, n. 1, p. 31-35, 2010.

WEINSTEIN, R. S., MANOLAGAS, S. C. Apoptosis in glucocorticoid-induced bone disease. **Current Opinion in Endocrinology and Diabetes**, v. 12, n. 3, p. 219–223, 2008.

WIKSTROM, A. C. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. **Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 3, p. 331–337, 2003.

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

WOOD, J., BONJEAN, K., RUETZ, S., BELLAHCÈNE, A., DEVY, L., FOIDART, J. M., CASTRONOVO, V., GREEN, J.R. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 1055-1061, 2002.

WUTZL, A., BIEDERMANN, E., WANSCHITZ, F., SEEMANN, R., KLUG, C., BAUMANN, A., WATZINGER, F., SCHICO, K., EWERS, R., MILLESI, G. Treatment results of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Head & Neck**, v. 30, n. 9, p. 1224–1230, 2008.

YANG, L., BOYD, K., KASTE, S. C., KAMDEM, L.K., RAHIJA, R. J., RELING, M. V. A Mouse Model for Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis: Effect of a Steroid Holiday. **Journal of Orthopedic Research**, v. 27, n. 2, p. 169–175, 2009.

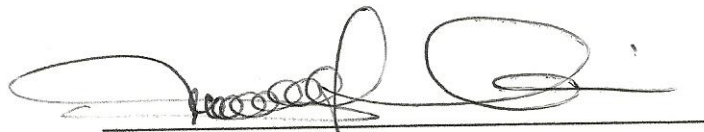
ZAMAN, M. U., NAKAMOTO, T., TANIMOTO K. A retrospective study of digital subtraction technique to detect sclerotic changes in alveolar bone on intraoral radiographs of bisphosphonate-treated patients. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 42, n. 10, p. 20130242. doi: 10.1259, 2013.

ZHU, M., LIANG, R., PAN, L-H., HUANG, B., QUIAN, W., ZHONG, J-H., ZHENG, W-W., LI, C-L. Zoledronate for metastatic bone disease and pain: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Pain Medicine**, v. 14, n. 2, p. 257–264, 2013.

ANEXOS**ANEXO A- TERMO DE ANUÊNCIA****TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação do Efeito da Dexametasona e da Nimesulida na Quimionecrose do Osso Mandibular Induzida por Ácido Zoledrônico em Modelo Murino”, sob a coordenação da Prof.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica.

Fortaleza, 28 de agosto de 2013.

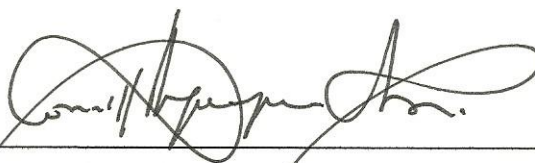


Manoel Oddrico de Moraes Filho
Professor Titular das Disciplinas de Farmacologia e Oncologia da
Universidade Federal do Ceará
Coordenador do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE),
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Ceará.

ANEXO B- TERMO DE ANUÊNCIA**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação do Efeito da Dexametasona e da Nimesulida na Quimionecrose do Osso Mandibular Induzida por Ácido Zoledrônico em Modelo Murino”**, sob a coordenação da Profa. **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, do Departamento de Clínica Odontológica.

Fortaleza, 15 de outubro de 2013.



Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
**Professor Titular das Disciplinas de Farmacologia e Oncologia da
Universidade Federal do Ceará**
**Coordenador do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
(LAFICA), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de
Medicina, Universidade Federal do Ceará.**

ANEXO C – TERMO DE ANUÊNCIA**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação do Efeito da Dexametasona e da Nimesulida na Quimionecrose do Osso Mandibular Induzida por Ácido Zoledrônico em Modelo Murino**”, sob a coordenação da Profa. **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, do Departamento de Clínica Odontológica.

Fortaleza, 28 de agosto de 2013.

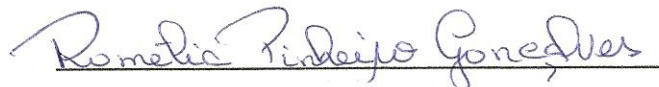


Fabrício Bitú Sousa
Professor Adjunto das Disciplinas de Estomatologia Clínica e Patologia Bucal da Universidade Federal do Ceará
Coordenador do Laboratório de Patologia Bucal, Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará.

ANEXO D- TERMO DE ANUÊNCIA**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação do Efeito da Dexametasona e da Nimesulida na Quimionecrose do Osso Mandibular Induzida por Ácido Zoledrônico em Modelo Murino”**, sob a coordenação da Profa. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica.

Fortaleza, 28 de agosto de 2013.

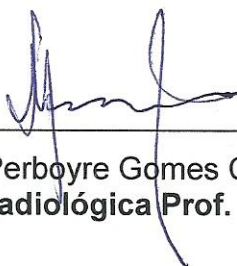


Romélia Pinheiro Gonçalves
Professora Associado no setor de Hematologia
Coordenadora do Curso de Especialização em Hematologia Clínica da
Universidade Federal do Ceará
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de
Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará.

ANEXO E – TERMO DE ANUÊNCIA**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que sou colaborador e estou ciente da execução das tomadas radiográficas do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação do Efeito da Dexametasona e da Nimesulida na Quimionecrose do Osso Mandibular Induzida por Ácido Zoledrônico em Modelo Murino**”, sob a coordenação da Prof.^a **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, na Clínica Radiológica Prof. Perboyre Castelo.

Fortaleza, 28 de agosto de 2013.

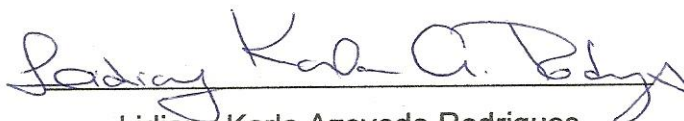


Manoel Perboyre Gomes Castelo
Diretor da Clínica Radiológica Prof. Perboyre Castelo

ANEXO F – TERMO DE ANUÊNCIA**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação do Efeito da Dexametasona e da Nimesulida na Quimionecrose do Osso Mandibular Induzida por Ácido Zoledrônico em Modelo Murino”, sob a coordenação da Profa. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica.

Fortaleza, 28 de agosto de 2013.



Lidiany Karla Azevedo Rodrigues
Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da
Universidade Federal do Ceará
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia
e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará.

ANEXO G – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 81/2013, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEXAMETASONA E DA NIMESULIDA NA QUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 18 de março de 2013.

Fortaleza, 06 de maio de 2014


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC
MAT. SIAPE 2160369