



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**VANESSA COSTA DE SOUSA FERREIRA**

**EFEITO DA ATORVASTATINA NO TECIDO ÓSSEO DE RATAS SUBMETIDAS A  
OSTEONECROSE DE MAXILARES INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

**FORTALEZA**

**2018**

**VANESSA COSTA DE SOUSA FERREIRA**

**EFEITO DA ATORVASTATINA NO TECIDO ÓSSEO DE RATAS SUBMETIDAS A  
OSTEONECROSE DE MAXILARES INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Goes Pinheiro Dutra.

Co – orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Virginia Cláudia Carneiro Girão.

**FORTALEZA**

**2018**

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

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

---

- F444e Ferreira, Vanessa Costa de Sousa.  
EFEITO DA ATORVASTATINA NO TECIDO ÓSSEO DE RATAS SUBMETIDAS A  
OSTEONECROSE DE MAXILARES INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO / Vanessa  
Costa de Sousa Ferreira. – 2018.  
101 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra .  
Coorientação: Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão.
1. Osteonecrose. 2. Bisfosfonatos. 3. Atorvastatina. I. Título.

CDD 611

---

**VANESSA COSTA DE SOUSA FERREIRA**

**EFEITO DA ATORVASTATINA NO TECIDO ÓSSEO DE RATAS SUBMETIDAS A  
OSTEONECROSE DE MAXILARES INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Goes Pinheiro Dutra

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Virginia Cláudia Carneiro Girão.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Banca Examinadora

---

Prof.a. Dra Paula Goes Pinheiro Dutra (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dr. Mario Rogério Lima Mota (Membro Externo)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico a Deus, fonte de inspiração e força, por ter permitido a realização desse sonho. Aos meus pais, pelo exemplo de luta e determinação. A meu esposo pelo amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por permitir tudo isso na minha vida, com todas as batalhas enfrentadas ao longo dessa árdua caminhada, permitindo a conclusão deste trabalho e sempre guiando minha vida.

Aos **meus pais (João Vionê e Vanuzia)** por sempre me motivarem a seguir em frente. Pela sabedoria em me educar, pelo amor e carinho para me proteger e me ensinar os limites da vida, por ter investido e acreditado na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento. Vocês são presença marcante em minha vida. Obrigada por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim e por compartilhar de muitas das minhas angústias, alegrias e conquistas.

Ao **meu querido irmão, Vionê**, presença constante em minha vida, exemplo de companheirismo, amizade, parceria infinita e dedicação à família.

Ao **meu esposo, Leocacio Neto**, obrigada pela sua força, ajuda, por sua dedicação, pela espera nos momentos de ausência, por toda a sua compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Sua parceria, seu carinho, seu incentivo e sua compreensão foram essenciais para que esse momento chegasse. Essa conquista, como tantas outras, é nossa!

A **minha orientadora, Profa. Paula Goes**, assumido a orientação dessa dissertação, desde a ideia do projeto para concorrer ao programa de Mestrado. Por ter me incentivado tendo ajudado com importante colaboração na discussão do trabalho, pela sua dedicação a pesquisa, pelo seu incentivo e confiança desde o princípio. Pelo exemplo de professora e pesquisadora, pela oportunidade, paciência e confiança. Meu muito obrigada pela sua orientação.

À **Profa. Gerly Anne de Castro Brito**, exemplo de competência, pelo empenho que mantém em fazer o Programa de Ciências Morfofuncionais.

Às **Professoras Virgínia Girão, Renata Leitão, Delane Gondim e Karuza Alves**, pelo grande apoio oferecido durante essa etapa de pesquisa e pelas preciosas contribuições que foram dadas a esse trabalho. Meus agradecimentos pela permanente solicitude em todas as fases do projeto, bem como pelo cuidado e ricas sugestões a esse trabalho.

Aos meus **professores** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos nesses anos.

Sou profundamente grata às amigas e companheiras **Fátima Regina e Mariana Reis**, pela indescritível solidariedade e afeto inigualável, que se traduziram sempre em pronta disposição em ajudar, estimulando sempre a busca por novas fontes de conhecimento e pela valiosa e constante parceria. Assim como pelo incentivo que sempre dedicou às minhas empreitadas e pela atenção zelosa comigo, sem dedicação de vocês essa jornada teria sido bem mais árdua.

Aos **Amigos e Colegas** do Laboratório NEMPI (Núcleo de Estudos e Processamento de Imagens), sempre dispostos a ajudar nos momentos difíceis, pela parceria diária e divisão das angústias da jornada de mestranda, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas, muito obrigada.

Ao nosso grupo de estudos **NepDio**, que motivava sempre o compartilhamento do conhecimento, explorando novidades científicas e estimulando o saber de pesquisador e pelo entusiasmo à busca de conhecimento .

Aos alunos de iniciação científica **Nicholas, Amanda, Pedro, Katherine e Sarah** pela convivência agradável e ajuda fundamental para o desenvolvimento do projeto! Meu Muito Obrigada! Sem vocês não seria possível.

Aos colegas de profissão do PPGO, **Samuel, Diego e Elisa** pela presteza em ajudar na realização dos experimentos que foram realizados no laboratório da Odontologia, me ensinaram com toda atenção e paciência.

Aos queridos servidores técnicos do laboratório NEMPI, **Júnior e Flávia**, pelos serviços prestados com destreza e competência. Em especial ao Júnior por ter feito todo o trabalho técnico necessário ao desenvolvimento do trabalho, você é impecável.

Ao **Davi**, técnico do laboratório do Programa de Pós – Graduação em odontologia pela solicitude em disponibilizar os equipamentos nos momentos de mais angustias e necessidades. Sempre pronto a nos ajudar.

A sempre solicita funcionária da Secretária do Programa, **Laísa** (Lalá) sempre lembrando dos nossos compromissos e tirando dos apuros burocráticos. Muitíssimo obrigada por toda ajuda e cooperação nesses anos.

Aos professores participantes da **banca examinadora Profa Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão e Prof Dr. Mario Rogério Lima Mota** pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões e por prestigiarem meu trabalho.

A **Universidade Federal do Ceará** por viabilizar a conclusão desse importante momento.

À **Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos** CAPES pelas excelentes imagens obtidas e pela aquisição das imagens de imunofluorescência no confocal e microscopia eletrônica de varredura.

A **CRISTÁLIA**, produtos químicos farmacêuticos LTDA., pelo apoio a pesquisa e por acreditar no nosso projeto, com a doação de ampolas de Ácido Zoledrônico, muito obrigada pelo apoio a pesquisa no Brasil.

A **EMS**, indústria farmacêutica, por acreditar no nosso projeto e pelo apoio a pesquisa com a doação de toda a Atorvastatina Cálcica comprimido, utilizada na pesquisa.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Cada vez que você faz uma opção está transformando sua essência em alguma coisa um pouco diferente do que era antes”.*

C.S. Lewis

## RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonato (OMB) é definida como uma exposição óssea na mucosa que não cicatriza por mais de 8 semanas, após uso de bisfosfonato sem história de radioterapia ou doença metastática. Apesar dos mecanismos fisiopatológicos da OMB ainda não estarem bem definidos, inflamação, alteração na vascularização e supressão de remodelação parecem ter papel importante nessa condição. A Atorvastatina (ATV) é um agente hipolipemiante, que apresenta efeitos pleiotrópicos: anti-inflamatórios, angiogênicos e anabólicos ósseos, que podem auxiliar na prevenção da OMB. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da ATV sobre os aspectos morfofuncionais do tecido ósseo de animais submetidos a OMB. Para tanto, foram utilizadas 72 ratas Wistar (180-220 g) divididas em 04 grupos: Salina (SAL), Ácido Zoledrônico (AZ), ATV pré (ATV - PRÉ) ou pós-operatória (ATV - PÓS). A OMB foi induzida pela administração de 0,1 mg/kg de AZ, (i.p.) 3x/sem por 09 sem. Os animais do grupo SAL receberam 0,1 ml de solução salina 0,9% (i.p.) pelo mesmo período. No 42º dia (D42), todos os animais tiveram os 3 molares superiores esquerdos extraídos. A ATV foi administrada na dose de 27 mg/kg (v.o.) diariamente por 03 semanas de forma pré-operatória (D21-D42); ou pós-operatória (D42-D77). Estes animais foram acompanhados diariamente e eutanasiados no D77 ou semana 11 (S11). As maxilas foram removidas para análises macroscópica, histopatológica, histométrica, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise do percentual de preenchimento ósseo por microscopia confocal, análise de colágeno por coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada, análise da composição óssea por espectroscopia Raman e imunohistoquímica para DKK-1, Wnt10b,  $\beta$ -catenina e caspase-3. O tecido gengival foi coletado para quantificação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e amostras sanguíneas foram coletadas para dosagens bioquímicas. O tratamento com ATV reduziu a intensidade do processo inflamatório bem como a presença de sequestros ósseos, aumentou o número de osteócitos viáveis e reduziu o número de lacunas vazias, comparado ao AZ ( $p < 0,05$ ). A ATV (PRÉ e PÓS) manteve mais regular a superfície óssea comparada ao grupo AZ. A ATV (PRÉ e PÓS) aumentou o preenchimento ósseo e o percentual de colágeno tipo I e reduziu percentual colágeno tipo III ( $p < 0,05$ ), reduziu a imunomarcação de Caspase-3, e aumentou a imunomarcação de Wnt10b e  $\beta$ -catenina, reduziu os níveis gengivais de IL-1 $\beta$  (ATV - PRÉ e ATV - PÓS) e TNF (ATV - PÓS), comparado ao AZ ( $p < 0,05$ ). Na análise Raman foi observado um aumento de todas as bandas no grupo AZ e da relação mineral/matriz nos grupos ATV-PRÉ e ATV-PÓS em relação ao AZ ( $p < 0,05$ ). O tratamento com ATV reduziu os níveis de Cálcio, e aumentou os níveis de Fósforo bem como de Fosfatase alcalina óssea comparada ao AZ ( $p < 0,05$ ). Em suma, os achados desse estudo mostraram que ATV exerceu atividade anti-inflamatória e efeito anti-reabsortivo, bem como manteve a vitalidade, metabolismo e a estrutura óssea, podendo ser uma ferramenta farmacológica interessante como adjuvante à terapia da OMB.

Palavras-chave: Osteonecrose. Bisfosfonatos. Atorvastatina

## ABSTRACT

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is defined as exposed bone that has persisted for than 8 weeks after the use of bisphosphonate and without history of radiation therapy or metastatic disease. Despite the physiopathological mechanism are yet to be understood, inflammation, vascular problems and bone turnover suppression seem to play a role on this condition. In this way highlights Atorvastatin (ATV), an hypolipemiant agent, that also presents importante pleiotropic effects: anti-inflammatory, angiogenic and bone anabolic. In this contexto, the aim of this study was to evaluate the effect of ATV over que morphofunctional aspects of bone tissue on animais subjected to BRONJ. For this, it was used 72 female Wistar rats (180-220 g), divided in 4 groups: Saline (SAL), Zoledronic Acid (ZA); ATV pre (ATV - PRÉ) or post-operative (ATV - PÓS). BRONJ was induced by administration of 0.1 mg/kg of AZ, (i.p.) 3x/wk for 9 weeks. The animals from SAL group received 0.1 ml of 0.9% saline solution (i.p.) for the same period. On day 42 (D42) all animals had the 3 left superior molars extracted. ATV was administered at 27 mg/kg (v.o.) daily for 3 weeks pre-operative (D21-D42) or post-operative (D42-D77). These animals were followed daily and euthanized on D77 ou week 11 (W11). Maxillae were removed for macroscopic, histopathological and histometric analyses, scanning electron microscopy (SEM), bone-filling percentage analysis using confocal microscopy, collagen analysis by picosirius red staining under polarized light and immunohistochemistry for DKK-1, Wnt 10b,  $\beta$ -catenin and caspase-3. The gingival tissue was colleted for TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  quantification, and the blood samples were collected to biochemical dosage. The treatment with ATV reduced the intensity of the inflammatory process, as well as the presence of bone sequesters, increased the number of osteocytes and reduced the number of empty lacunae, compared to ZA ( $p < 0.05$ ). ATV kept the regular topography on SEM analysis, compared to ZA. ATV (PRE and POS) increased bone-filling and type I-collagen percentage and reduced III-collagen percentage ( $p < 0.05$ ), reduced immunolabelling Caspase-3, and increased immunolabelling for Wnt10b and  $\beta$ -catenin, reduced the gingival levels of IL-1 $\beta$  (ATV – PRE and ATV - POS) and TNF (ATV - POS), compared to ZA ( $p < 0.05$ ). On Raman, it was observed an increase on all bands as well as on mineral/matriz ratio on ATV-PRE and ATV-POS groups, when compared to ZA ( $p < 0,05$ ).The treatment with ATV lowered the serum levels of Calcium, and raised seric Phosphorus as well as Bone-specific alkaline phosphatase compared to ZA ( $p < 0.05$ ). In summary, the findings of this study showed that ATV presented anti-inflammatory activity and anti-resorptive effect as well as kept bone vitality, metabolism and structure, which can be an interesting pharmacological tool as adjuvant to BRONJ therapy.

Keywords: Osteonecrosis. Bisphosphonates. Atorvastatin

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina.	21
Figura 2 –	Ativação da Wnt/ $\beta$ -catenina nos osteócitos.	22
Figura 3 –	Representação esquemática da estrutura química geral dos bisfosfonatos e do pirofosfato endógeno.	23
Figura 4 –	Protocolo experimental do estudo	33
Figura 5 –	Imagens representativas do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidos a OMB.	43
Figura 6 –	Fotomicrografia dos aspectos histopatológicos do efeito do AZ no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	45
Figura 7 –	Fotomicrografia dos aspectos histopatológicos do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	46
Figura 8 –	Análise histomorfométrica do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	48
Figura 9 –	Fotomicrografia dos aspectos histopatológicos do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	49
Figura 10 –	Eletrofotomicrografia do efeito da ATV na superfície da maxila de ratas submetidas a OMB.	50
Figura 11 –	Fotomicrografia do efeito da ATV no percentual de preenchimento ósseo na maxila de ratas submetidas a OMB.	52
Figura 12 –	Efeito da ATV sobre os componentes do osso da maxila de ratas submetidas a OMB.	53
Figura 13 –	Efeito da ATV no percentual de colágeno total, tipo I e tipo III da hemimaxila de ratas submetidas a OMB.	57
Figura 14 –	Fotomicrografia do efeito da ATV nas fibras colágenas da matriz óssea coradas com Picrosírius Red e sob filtro de luz polarizada em modelo de OMB.	58

Figura 15 – Análise imunohistoquímica do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	60
Figura 16 – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoexpressão de Wnt10b no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	61
Figura 17 – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoexpressão de $\beta$ -catenina no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	62
Figura 18 – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoexpressão de DKK-1 no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	63
Figura 19 – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoexpressão de Caspase 3 no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.	64
Figura 20 – Efeito da ATV nos níveis gengivais de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ de ratas submetidas a OMB.	65
Figura 21 – Efeito da ATV nos níveis séricos de Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina de ratas submetidas a OMB.	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de aspectos histológicos de infiltrado inflamatório e de presença de áreas necróticas e/ou sequestros ósseo.	35
Tabela 2 – Análise histopatológica do efeito na ATV na intensidade de infiltrado inflamatório após OMB.	47
Tabela 3 – Análise histopatológica do efeito na ATV na presença de sequestro ósseo após OMB.	47
Tabela 4 – Efeito da ATV no componente Principais bandas (cm-1) relacionadas aos espectros de tecido ósseo tratado e não tratado.	54
Tabela 5 – Comparação dos parâmetros da espectroscopia Raman dos substratos ósseos.	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**μL** - Microlitro (s)

**ANOVA** - Análise de variância

**ATV** – Atorvastatina Cálcica

**ATV - PRÉ** – Atorvastatina pré-operatória

**ATV - PÓS** – Atorvastatina pós-operatória

**AZ** – Ácido Zoledrônico

**BF** – Bisfosfonatos

**CE** – Ceará

**Cm** - Centímetro (s)

**DP** - Desvio-Padrão

**DKK** – Dickkopf

**E.P.M** - Erro padrão da média

**ELISA** – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**Et al.** - ...e colaboradores

**FAO** – Fosfatase Alcalina Óssea

**g** – gramas

**GSK3β** – Quinase Glicogênio Sintase 3β

**H** - Hora (s)

**HE** - Hematoxilina-Eosina

**HMG-CoA** – enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

**i.p** – intraperitoneal

**IL-1β** - Interleucina-1

**IL-6** - Interleucina-6

**Kg** – Kilograma

**Md** – Mediana

**Mg** – Miligrama

**MI** – Mililitro

**MSE** – molares superiores esquerdo

**PBS** - Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)

**PDGF** - Fator de crescimento derivado das plaquetas

**OMB** – Osteonecrose dos maxilares

**OPG** – osteoprotegerina

**Pg** - Picograma (s)

**PMN** - Polimorfonucleares

**RANK** – Receptor ativador do fator nuclear K $\beta$

**RANKL** – Ligante do Receptor do Fator Nuclear Kappa beta

**SAL** – Salina

**SOST** – Esclerostina

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa (tumoral necrosis factor- alpha)

**UFC** – Universidade Federal do Ceará

**UI** – Unidades Internacionais.

**VEGF** – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

**Wnt** – Wingless

## LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

© Copyright

® Marca Registrada

α Alfa

B Beta

™ Trade Mark

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Tecido Ósseo .....	19
1.2 Osteonecrose Induzida por Bisfosfonatos .....	23
1.3 Atorvastatina .....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivos específicos .....	30
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 Desenho do Estudo e Aspectos Éticos.....	31
4.2 Seleção dos Animais.....	31
4.3 Modelo de Osteonecrose Experimental.....	31
4.4 Grupos experimentais.....	33
4.5 Tratamento com Atorvastatina (ATV) .....	33
4.6 Análise Macroscópica .....	34
4.7 Análise Histológica .....	34
4.8 Análise Histomorfométrica do número de osteócitos viáveis e lacunas vazias ..	35
4.9 Análise da Superfície óssea por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	36
4.10 Análise da Composição óssea por Espectroscopia Micro - Raman .....	36
4.11 Análise do Percentual da Área representada por Tecido Ósseo através da Microscopia Confocal. ....	37
4.12 Análise da quantidade e tipo de Colágeno .....	38
4.13 Imunohistoquímica para DKK – 1, WNT 10b, $\beta$ -catenina e Caspase -3.....	39
4.14 Níveis gengivais de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ .....	40
4.15 Dosagens Bioquímicas.....	41
4.16 Análise estatística .....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
5.1 Análise Macroscópica .....	43
5.2 Análise Histopatológica .....	44
5.3 Análise histomorfométrica do número de osteócitos viáveis e número de lacunas vazias .....	48
5.4 Análise Microscopia Eletrônica de Varredura.....	50

5.5	Análise Percentual da Área representada por Tecido Ósseo através da Microscopia Confocal .....	51
5.6	Análise da composição óssea por espectrometria RAMAN .....	53
5.7	Análise da quantidade e tipo de Colágeno por Coloração de <i>Picrosirius Red</i> sob filtro de luz polarizada .....	56
5.8	Análise Imuno-histoquímica para Wnt10b, $\beta$ -catenina, DKK-1 e Caspase-3 .....	59
5.9	Análise de Citocinas gengivais TNF – $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	65
5.10	Análise dos níveis séricos de Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina Óssea.....	66
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>98</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido dinâmico, que apesar da sua aparência inerte, está em constante remodelação (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Este tecido mineralizado e especializado exerce funções importantes no organismo, tais como: locomoção, suporte e proteção de outros tecidos e órgãos e ainda serve como meio para armazenar e estocar cálcio e fósforo (BUCKWALTER et al., 1996; DOWNEY et al., 2006; DATTA et al., 2008).

Assim como os demais tecidos conjuntivos, o tecido ósseo é formado por células e uma matriz extracelular, sendo esta última constituída por matéria orgânica e inorgânica, extremamente importante para o metabolismo ósseo, além de conferir rigidez e resistência a impactos, o que é essencial para manter a integridade deste tecido (VIGUET-CARRIN et al., 2006; SANTIN, 2014). A matéria inorgânica do osso se apresenta na forma de sais minerais de hidroxapatita fosfatada e carbonatada (NORDIN e FRANKEL, 2001; KIERSZENBAUM e TRES, 2012), enquanto o colágeno é considerado o principal componente orgânico da matriz óssea (ROSS e PAWLINA, 2008). A maior parte do colágeno do tecido ósseo é do tipo I, e em menor quantidade tem-se o colágeno do tipo V (ROSS e PAWLINA, 2008). O primeiro tipo de colágeno (I) apresenta-se como um importante componente da matriz óssea, auxiliando na formação dos cristais de apatita e conferindo suporte estrutural, flexibilidade e resistência para o osso neorformado, já o tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos (BARASCUK et al., 2011; COUDROY et al., 2015).

Além da matriz, as células ósseas exercem papel fundamental no metabolismo deste tecido. Osteoclastos são células multinucleares que degradam matriz óssea mineralizada, derivada da diferenciação terminal de células progenitoras hematopoiéticas originárias da linhagem monócitos macrófagos (HAYNES, 2004). Os Osteoblastos, por sua vez, são as células responsáveis pela secreção da matriz orgânica óssea, que posteriormente se calcifica formando o tecido ósseo (STEVENS e LOWE, 2001). Com o desenvolvimento ósseo, alguns osteoblastos são aprisionados no interior da matriz e passam a ser chamados de Osteócitos (UDA et al., 2017). Apesar de os osteócitos abandonarem a função de secretar a matriz, eles permanecem secretando substâncias necessárias à

homeostasia óssea. Eles se adaptam à forma da lacuna e irradiam prolongamentos que formam canalículos, o que permite a comunicação entre os osteócitos, formando junções comunicantes que permitem o compartilhamento de íons, nutrientes e fluido extracelular, sendo assim responsáveis por dirigir a remodelação óssea em resposta à tensão mecânica e outros estímulos (BONEWALD, 2011; FLORENCIO-SILVA et al., 2015; UDA et al., 2017), atuando como mecanossensores e orquestradores do processo de remodelação óssea (TEITELBAUM et al., 2007; CLARKE et al., 2008; KARSENTY et al., 2009; BONEWALD et al., 2011).

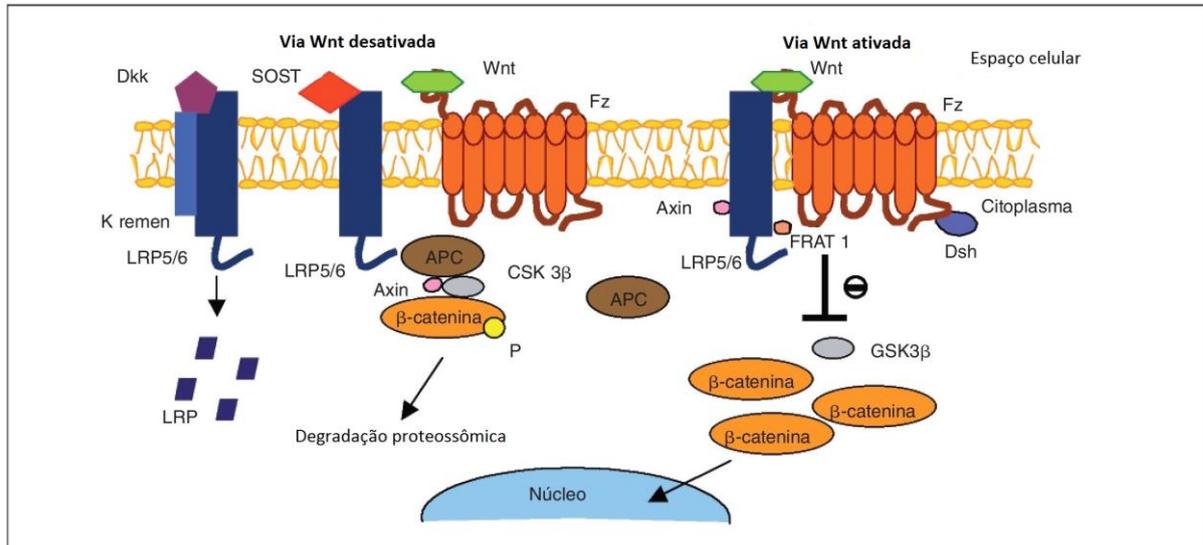
Tais processos de remodelação podem ser regulados por diversas vias. A via RANK-RANKL-OPG tem sido uma das mais bem descritas (AGHALOO et al., 2011; OHE et al., 2012; EI-KHASSAWNA et al., 2017). O RANK (receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B) é um receptor da superfamília do TNF- $\alpha$ , que está expresso nas células precursoras de osteoclastos, enquanto o RANKL (ligante de RANK) pode ser encontrado expresso na superfície celular de osteoblastos ou na forma solúvel (YASUDA et al., 1998; LACEY et al., 1998). A interação RANK-RANKL favorece a osteoclastogênese com consequente reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG) é o regulador desse eixo. Ela é produzida especialmente por osteoblastos, e age como um inibidor natural da interação RANK-RANKL, favorecendo a síntese de matriz óssea (KHOSLA et al., 2008; GRAVES, 2011).

No entanto, outra via de sinalização ainda pouco estudada, vem ganhando grande destaque como um regulador da homeostasia óssea, a via Wnt (RING et al., 2014; SAPIR-KOREN et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016). As proteínas wingless (Wnt) compreendem uma família de 19 proteínas que orquestram diversos processos biológicos (WILLERT e NUSSE, 2012), tais como o desenvolvimento embrionário, a carcinogênese e mais recentemente foi visto que elas também atuam no metabolismo ósseo, influenciando a osteoblastogênese e consequente formação óssea (SAPIR-KOREN et al., 2014; TAN et al., 2014; LIMA et al., 2017; JOENG et al., 2017;). A via de sinalização de Wnt é dividida em: não-canônica (via polaridade celular planar, via Wnt/cálcio, via da proteína quinase A envolvendo CREB) e canônica (Wnt/ $\beta$ -catenina), sendo esta última mais bem estudada e descrita na literatura (LI; CHONG e MAIESE, 2005; WANG et al., 2015).

Dentre as diversas proteínas Wnt, a Wnt10b tem se mostrado como uma das proteínas chave no metabolismo do tecido ósseo (BODINE e KOMM, 2006; RAUNER et al., 2008). Quando a proteína Wnt se liga ao seu receptor, LRP5/6 e

Frizzled ocorre ativação de Dishvelled (Dsh) que fosforila a enzima citoplasmática glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). GSK3 $\beta$  é componente chave para a formação de um grande complexo de degradação protéica responsável por controlar os níveis intracelulares de  $\beta$ -catenina livre. Quando GSK3 $\beta$  é fosforilada não ocorre a formação do complexo de degradação e a  $\beta$ -catenina permanece estável no citoplasma, sendo posteriormente translocada para o núcleo (KUBOTA, MICHIGAMI, OZONO, 2009). No núcleo, a  $\beta$ -catenina interage com a família Tcf/Lef de fatores de transcrição que regulam a expressão de diversos genes importantes para diferenciação, proliferação, apoptose e funcionalidade das células ósseas (BONEWALD e JOHNSON, 2008). A regulação dessa via é mediada pela ação de Dickkopf (DKK) e Esclerostina (produto do gene SOST), que impedem a interação Wnt-receptor, permitindo a formação de um complexo quaternário com Axina, GSK3 $\beta$  e APC, o que leva a um processo de ubiquitinação e consequente degradação proteossômica da  $\beta$ -catenina (BARON e KNEISSEL, 2013). (Fig. 1).

**Figura 1** – Via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina.



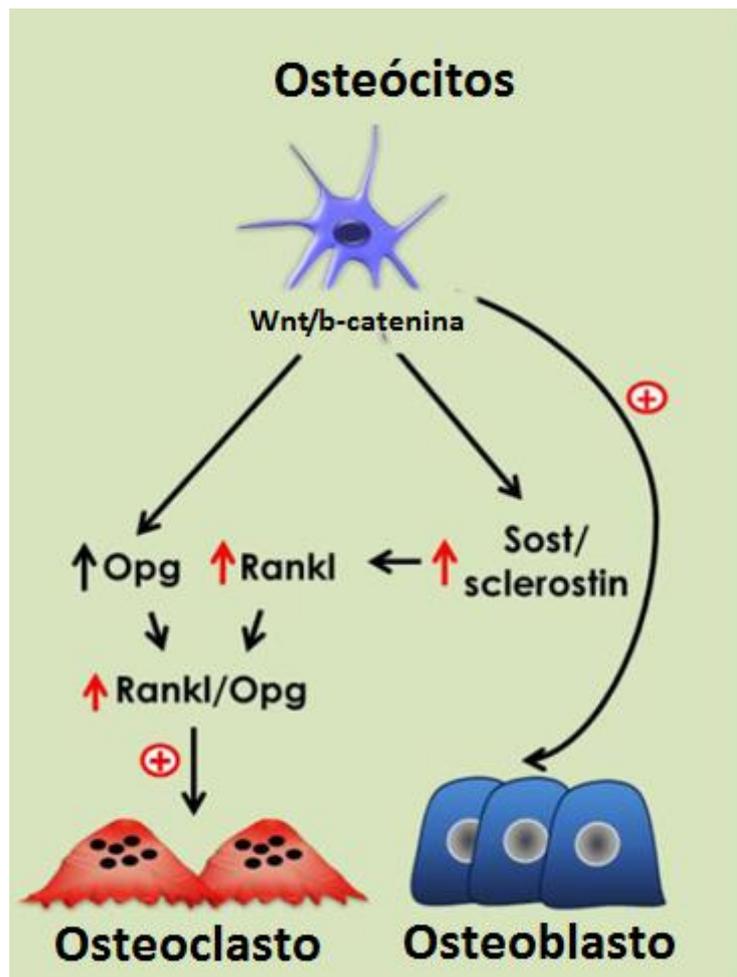
**Fonte:** Adaptado de ESCOBAR-GÓMEZ et al. (2009). Quando as Wnts se ligam ao seu receptor, ocorre inibição de GSK3 $\beta$ , favorecendo a estabilização da  $\beta$ -catenina que por sua vez se acumula no núcleo e ativa fatores de transcrição que promovem diferenciação de osteoblastos.. A regulação desta via é feita pela ação de DKKs e Esclerostina, que impedem a interação ao Wnts: receptor, favorecendo a fosforilação e degradação proteossômica da  $\beta$ -catenina.

Além da ação da via Wnt sobre osteoblastos (BONEWALD e JOHNSON, 2008), mais recentemente tem sido dada atenção a participação da via Wnt na

viabilidade e função dos osteócitos (PIETRZYK, SMERTKA, CHUDEK, 2017). Osteócitos expressam diversas moléculas que negativamente afetam a formação óssea incluindo DKK-1 (PAIC et al., 2009), e esclerostina (BELLIDO et al., 2013). Por outro lado, novas evidências demonstraram que os osteócitos também medeiam as ações anabólicas no osso através da via canônica da Wnt (XU et al., 2017) (Fig. 2). Porém, em condições patológicas que interferem diretamente na viabilidade de osteócitos, pouco ainda se sabe sobre o papel da via Wnt.

Dessa maneira é interessante avaliar a interferência dos bisfosfonatos nessa via, em especial o ácido zoledrônico, já que é o fármaco mais utilizado na clínica médica para tratamento das metástases ósseas e que apresenta efeitos adversos importantes que podem ter participação na via wnt- $\beta$ catenina.

**Figura 2** – Ativação da Wnt/ $\beta$ -catenina nos osteócitos



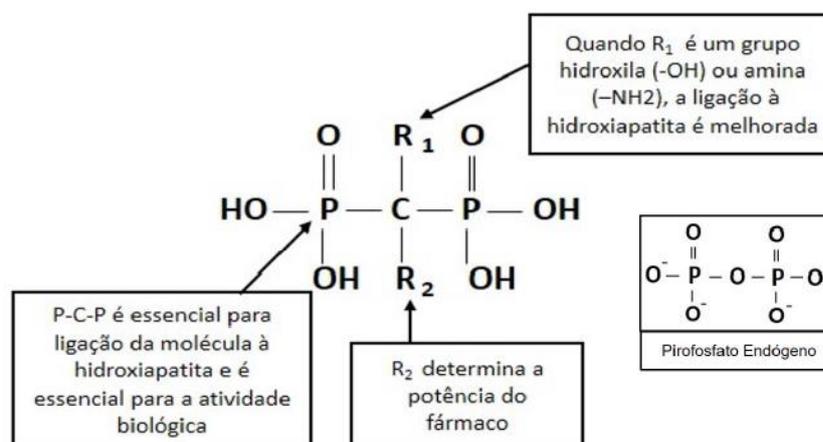
**Fonte:** Adaptado de DELGADO-CALLE e BELLIDO (2015). Legenda: A ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina em osteócitos aumenta tanto a formação óssea como a reabsorção, com equilíbrio positivo que resulta em ganho ósseo.

## 1.2 Osteonecrose Induzida por Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BFs) são medicamentos utilizados no tratamento de diferentes tipos de cânceres, doenças ósseas e osteoporoses graves. (MIGLIORATI, et al., 2005; PAZIANAS et al., 2007; SCHWARTZ et al., 2008). Estes compostos foram sintetizados quimicamente pela primeira vez em 1800 (RUSSEL, 2007), e utilizados na indústria farmacêutica desde o século XIX, contudo, apenas na década de 1960 passaram a ser aplicados clinicamente para tratar desordens no metabolismo ósseo (McLEOD, BRENNAN, RUGGIERO, 2011).

Os BFs pertencem a uma classe de fármacos estruturalmente análogos ao pirofosfato, sendo o átomo de oxigênio substituído pelo carbono, o que confere propriedades cálcio-quelantes (RODAN, 2004; ROGERS et al., 2000), maior resistência à hidrólise química e enzimática, além de aumentar a resistência à degradação biológica (RUSSEL et al., 2007), fazendo que os BFs não sejam metabolizados, o que favorece o aumento a meia vida e a excreção inalterada deste fármaco (ROGERS et al., 2000; RUSSELL, CROUCHER, ROGERS, 1999). Adicionalmente, diferentes grupos químicos podem ser acrescentados à estrutura dos BFs por meio de duas ligações covalentes adicionais ao átomo de carbono central (ROGERS et al., 2000). O grupo R1 determina a afinidade dos BFs pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência e atividade farmacológica do agente (JUNG, BISZA, 1973; FLEISCH, 1995) (Fig. 3).

**Figura 3** – Representação esquemática da estrutura química geral dos bisfosfonatos e do pirofosfato endógeno.



Fonte: Adaptado de Russell et al., 1999.

Os BFs podem ser divididos em duas classes, os amino- e não-amino-BFs, considerando a presença ou não do grupo amina, respectivamente. Os amino-BFs apresentam uma potência aumentada e por isso tem sido indicado como fármacos de escolha para a prevenção e tratamento de desordens ósseas com alta taxa de reabsorção (HARVEY et al., 2007). Alendronato, ibandronato e risedronato têm sido indicados para tratamento de osteoporose, enquanto o pamidronato e o zoledronato são mais recomendados para metástases ósseas, por exemplo (MARX et al., 2005).

Apesar de seus importantes efeitos terapêuticos, os amino-BFs apresentam alguns efeitos adversos tais com: hipersensibilidade, intolerância gastrointestinal (TWISS et al., 2001), desenvolvimento de resistência bacteriana (REDDI et al., 2001) e também úlceras de esôfago e estômago (PARFITT e DRIMAN, 2007). Adicionalmente, diversos casos de osteonecrose de maxilares foram relatados em associação ao uso de BFs, em especial com o pamidronato e ácido zoledrônico (SARKARAT, 2014; SIGUA-RODRIGUEZ, 2014; SCARPA, 2010).

O fármaco utilizado para o modelo de indução de OMB no nosso estudo foi o Ácido Zoledrônico (AZ), que é o principal BF associado a OMB (SILVERMAN & LANDEBERG, 2009), sendo um aminobisfosfonato derivado imidazólico heterocíclico de terceira geração (REID et al., 2002; KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2014). O AZ é o mais potente dos bisfosfonatos, possuindo cerca de 10.000 vezes a potência do etidronato (FERNANDES, LEITE, LANÇAS, 2005), ele é administrado por via endovenosa (EV), na dose de 4 ou 5 mg do fármaco por cerca de 15 minutos, sua concentração plasmática eleva-se rapidamente, seguido de um declínio após 24 h chegando à uma concentração plasmática de 1% (RUSSEL et al., 1999; LYSENG-WILLIAMSON, 2008).

A osteonecrose de maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB) atualmente é classificada dentro do grande grupo de Osteonecrose induzida por medicamentos. A *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, (AAOMS) recomendou a alteração da designação em seu último *Position Paper*, de 2014 (RUGGIERO et al, 2014). Assim, esta condição é definida como uma exposição óssea na mucosa que não cicatriza por mais de 8 semanas, após o uso de bisfosfonato em pacientes sem história de radioterapia na região da cabeça e pescoço ou doença metastática (LANDEBERG et al., 2011; RUGGIERO et al., 2014).

Dados epidemiológicos mostram que o desenvolvimento de OMB está

mais associados a bisfosfonatos de uso parenteral do que no tratamento pela via oral (KHAN et al., 2015). A OMB tem se mostrado mais prevalente em mulheres (VIEILLARD, et al., 2007; LAZAROVICI et al., 2009; THUMBIGERE-MATH, et al., 2009; MIGLIORATI et al., 2005; ELAD et al., 2010), podendo atingir proporções de até 8:1 (PAZIANAS et al., 2007), talvez porque as mulheres utilizem bisfosfonatos com mais frequência (MALDEN, BELTES e LOPES, 2009), no manejo da osteoporose (PAZIANAS et al., 2007) ou tratamento de metástases óssea relacionadas ao câncer de mama (VIEILLARD et al., 2007), sendo este último com maior importância no fator de 10 vezes mais (DODSON, 2015).

Caracteristicamente a osteonecrose devido ao uso de bisfosfonatos afeta mais frequentemente os ossos maxilares do que outros ossos do esqueleto. Diversos fatores anatômicos e fisiológicos contribuem para esse achado (SIRI et al., 2012). Os ossos maxilares apresentam maior taxa de remodelação o que favorece a alta concentração de bisfosfonatos, além disso as forças mastigatórias estimulam o turnover ósseo e podem facilmente induzir microfraturas (SARIN, DeROSSI, 2008; IKEBE, 2013). Os maxilares são separados do ambiente oral por uma fina camada de epitélio que pode ser facilmente traumatizada e exposta a diversos tipos de microrganismos diferentes permitindo contaminação e infecção (WATTS, MARCIANI, 2008). Diferentemente de outros ossos do esqueleto, após trauma ou cirurgia nos maxilares, a ferida é continuamente exposta a microrganismos que podem alcançar o osso necrótico e retardar o processo de cicatrização. A mandíbula é mais comumente afetada do que a maxila, razão de 2:1 (FICARRA, BENINATI, 2007), por apresentar menor quantidade de vasos em especial na região de pré-molares e molares, além de apresentar medula óssea mais adiposa o que pode dificultar o processo de reparo ósseo (WATTS, MARCIANI, 2008; YU et al., 2012).

Apesar dos relatos da literatura relacionando os BFs com a osteonecrose, os mecanismos fisiopatológicos desta condição ainda não estão bem definidos. Diversas hipóteses têm sido propostas para tentar explicar a osteonecrose nos maxilares, tais como: alteração na remodelação ou super-supressão da reabsorção óssea (MOZZATI et al., 2012), inibição da angiogênese (FOURNIER et al., 2002; SANTINI et al., 2003) e inflamação ou infecção (MOZZATI et al., 2012; RUGGIERO et al., 2014), além do constante microtrauma, supressão da imunidade inata ou adquirida, deficiência de vitamina D e toxicidade em tecido mole (MOZZATI et al., 2012; RUGGIERO et al., 2014).

O tratamento com BFs também parecem reduzir os níveis circulantes de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), reduzindo o suprimento sanguíneo causando necrose óssea (FOURNIER et al., 2002; SANTINI et al., 2003). Adicionalmente, a inflamação causada por procedimentos cirúrgicos tais como exodontias, em elementos dentários comumente infectados devido a doença periodontal (AGHALOO et al., 2011) ou periapical (MARX et al., 2005; HOFF et al., 2008) são considerados componentes importantes para o desenvolvimento de osteonecrose.

Considerando que os BFs inibem a diferenciação e função dos osteoclastos, aumentando sua apoptose e alterando assim a remodelação óssea, que é processo vital para a cicatrização deste tecido (RUSSEL et al., 2007; RAGGAT, PARTIDGE, 2010; KOMORI et al., 2016), é possível compreender a instalação da osteonecrose. Além disso, os BFs podem acessar e ficar embebidos nas lacunas de osteócitos, permanecendo lá em altas concentrações, afetando dessa forma a viabilidade dos osteócitos, uma característica da necrose óssea (ALLEN e BURR 2009).

Sabendo que existem diversas tentativas de prevenção e tratamento da OMB e que não existe uma modalidade terapêutica realmente efetiva para ser aplicada com segurança para essa patologia, sendo considerada uma patologia de diagnóstico e tratamento extremamente difíceis (DIEGO et al., 2007). Ainda considerando a inflamação como processo potencial para o desencadeamento da OMB e que abordagens profiláticas ou terapêuticas que atuem sobre os fatores etiológicos da OMB podem ser um diferencial para estas condições e que a partir disso, pretendeu –se verificar se o uso da Atorvastatina junto ao AZ modularia o processo inflamatório associado e possivelmente evitaria ou interferiria no desenvolvimento da OMB.

### **1.3 Atorvastatina**

Estatinas são fármacos utilizados para o controle dos níveis sanguíneos de colesterol (EL-NABARAWI et al., 2017) Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, levando a redução da síntese hepática e secreção de lipoproteínas (MAHMOUNDI et al., 2007). Esta enzima catalisa a etapa limitante da síntese do colesterol, convertendo HMG-CoA em mevalonato (ENDO et al., 1977; ISTVAN, 2003).

As estatinas em geral possuem uma taxa de absorção entre 30 % e 98% da dose e atingem uma concentração máxima no plasma em até 04 horas após sua administração. A absorção diária pode variar de acordo com o horário da administração e a ingestão de alimentos (PAN et al., 1990; TSE; JAFFE; TROENDLE, 1992; GARNETT, 1995). A metabolização acontece predominantemente pelas enzimas do citocromo P450 presente no fígado, já a eliminação ocorre através da bile após o metabolismo hepático. Conseqüentemente a disfunção hepática é um fator de risco na prescrição das estatinas, devendo ser acompanhada (MARON; FAZIO; LINTON, 2000). Em geral, as estatinas são bem toleradas, sendo seus efeitos adversos mais frequentes cefaléia, flatulência, dispepsia, dores musculares, prurido e exantema cutâneo (SCHULZ, 2005).

Dentre a classe das estatinas, a Atorvastatina (ATV) assume grande destaque, como um dos agentes hipolipemiantes mais vendidos no mundo (KAPUR e MUSUNURU, 2008), com ampla utilização clínica, (PLOSKER e LYSENG, 2007) poucos efeitos colaterais e melhor relação custo-benefício (COSTA-SCHARPLATZ et al., 2008).

A ATV, assim como as demais estatinas, possuem propriedades pleiotrópicas importantes (KRONMANN et al., 2007), dentre elas tem-se: melhoria da disfunção endotelial, ação hemorreológica, efeito antioxidante, atividade anti-inflamatória e capacidade anabólica óssea (MUNDY et al., 1999; KAPUR e MUSUNURU, 2008; GOES et al., 2014, 2016). Tal efeito pleiotrópico esta diretamente relacionado lipofilicidade do fármaco, (IZUMO et al., 2001). Portanto, a ATV, uma estatina lipofílica (IZUMO et al., 2001), se destaca por apresentar alto potencial osteogênico bem como, além de exercer maior influência na via regulatória de monócitos que regulam a produção de citocinas, modulando a resposta inflamatória tanto *in vivo* como *in vitro* (KIENER et al., 2001).

Em tecido ósseo, estudos mostraram que a ATV foi capaz de promover diferenciação osteoblástica, mediada pela expressão de sialoproteína óssea, osteocalcina e colágeno tipo I (MAEDA et al., 2003) e ativar a via Wnt (SOUSA et al., 2016). Esse fármaco também é capaz de inibir a transformação de pré-osteoclastos em osteoclastos, atuando sobre a via RANK/RANKL/OPG (SONG et al., 2008), e inibir a apoptose de osteoblastos e supressão da osteoclastogênese via TGF- $\beta$ /SMAD3 (KAJI et al., 2008). A ATV também pode contribuir para a homeostasia óssea devido seu efeito anti-inflamatório, através da redução dos níveis de TNF- $\alpha$ ,

IL-1 $\beta$  e IL-6 (FENTOGLU et al., 2012; GOES et al., 2014). Especificamente na osteonecrose dos maxilares, nenhum estudo foi desenvolvido até então, para avaliar o efeito da ATV e sua possível contribuição para prevenção da OMB.

## 2 JUSTIFICATIVA

A osteonecrose de maxilares induzida por bisfosfonatos é uma condição grave e debilitante que vem aumentando sua prevalência na população em geral (CONTE-NETO et al., 2011), considerando o aumento na expectativa de vida da população, o que aumenta os casos de osteoporose e câncer.

Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos etiopatogênicos, bem como as formas de prevenção ou tratamento dessa condição. Antibioticoterapia local ou sistêmica, oxigenoterapia hiperbárica ou debridamento cirúrgico vêm as sendo modalidades terapêuticas mais empregadas atualmente. Porém, relatos de insucesso para cada uma delas também tem sido descritos (DEL CONTE et al., 2010; POZZI et al., 2007) o que tem suscitado na comunidade científica uma grande discussão, tendo em vista que até o momento nenhuma modalidade terapêutica proposta para a OMB tem eficácia confirmada.

Neste contexto, sabendo do papel da supressão do metabolismo ósseo e da inflamação na OMB, torna-se interessante estudar novas abordagens terapêuticas para esta condição. Assim, destaca-se a Atorvastatina, um agente hipolipemiante, mas que apresenta importantes efeitos pleiotrópicos no tecido ósseo e no processo inflamatório, sendo estes achados confirmados por estudos prévios do nosso grupo em modelos de periodontite em ratos. Além disso, considerando que altas taxas de colesterol consistam numa epidemia mundial, parece-nos interessante investigar o efeito da Atorvastatina sobre os aspectos morfofuncionais do tecido ósseo de ratos submetidos a osteonecrose de maxilares induzida por bisfosfonatos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito da Atorvastatina (ATV) sobre os aspectos morfofuncionais do tecido ósseo de ratas *Wistar* submetidas a osteonecrose induzida por bisfosfonatos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Análise morfológica do tecido ósseo de ratas submetidas à OMB e recebendo ATV:
  - Avaliar o grau de cicatrização, intensidade do infiltrado inflamatório e a presença de sequestro ósseo por análise histológica.
  - Realizar a contagem de osteócitos viáveis e o número de lacunas vazias através análise histomorfométrica.
  - Avaliar as características da superfície óssea através de microscopia eletrônica de varredura.
  - Analisar o percentual de preenchimento ósseo após exodontia a partir de imagens obtidas por microscopia confocal.
  - Avaliar composição e qualidade do tecido ósseo através de espectrometria micro - Raman.
  - Analisar a quantidade e tipo de colágeno por meio de coloração por picrossírus red sob luz polarizada.
  
- Análise funcional do tecido de ratas submetidas à OMB e recebendo ATV:
  - Determinar a imunexpressão de Wnt10b,  $\beta$ -catenina, DKK-1 e caspase-3 nos osteócitos.
  - Quantificar a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  no tecido gengival.
  - Avaliar os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Desenho do Estudo e Aspectos Éticos

Este foi um estudo pré-clínico, randomizado, controlado e cego. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no ARRIVE (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) *guidelines* para uso de animais experimentais (KILKENNY et al., 2010).

Os experimentos foram iniciados logo após aprovação no Comitê de Ética Animal da UFC, protocolo nº 19/2016 (Anexo A), o qual é regido pela Declaração Universal de Direitos Animais (UNESCO – 27 de Janeiro 1978) e pelos *Guidelines Éticos Internacionais para Pesquisa Biomédica envolvendo Animais* (Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas – CIOMS).

Todos os esforços foram realizados no sentido de diminuir o número de animais e seu sofrimento, com base nas orientações para pesquisas com animais e apreciadas pelo comitê de pesquisa em animais institucional.

### 4.2 Seleção dos animais

Para este estudo foram utilizados 72 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea de aproximadamente 180 - 200 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do *Campus* do Pici - UFC.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em número de 06 animais por caixa, todos receberam ração comercial balanceada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 22 - 24° C durante todo o experimento. Os animais foram pesados semanalmente.

### 4.3 Modelo de Osteonecrose Experimental

A osteonecrose foi realizada por meio da administração intraperitoneal de ácido zoledrônico (BARBA-RECREO et al., 2014), seguido de exodontia (SILVA et al., 2015) que replica os achados histológicos e radiográficos da doença.

Inicialmente os animais dos grupos AZ, ATV - PRÉ e ATV - PÓS receberam 0,1 mg/kg de AZ (Ácido Zoledrônico, Cristália, Itapira – SP – BRASIL) por via intraperitoneal (i.p.) três vezes por semana por 09 semanas (HIKITA et al., 2009; HUJA et al., 2006, 2011; BARBA-RECREO et al., 2014). Os animais do grupo Salina

(SAL) receberam 0,1 mg/kg, solução salina a 0,9%, por via i.p. 3x/semana por 9 semanas.

Na semana 8 (49<sup>o</sup> dia experimental – D49/S8), todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de exodontia dos 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> molares superiores esquerdos (MSE) conforme protocolo estabelecido por BARBA-RECREO (2014), em que foi utilizada a maxila como região de escolha. Para tanto os animais foram previamente anestesiados com cetamina (37 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg) por via intramuscular. Em seguida foi realizada a sindesmotomia com sonda exploradora (GOLGRAN®, São Caetano do Sul/SP), sendo a remoção do dente feita por luxação com uso de espátula Hollembach 3S (GOLGRAN®, São Caetano do Sul/SP) e a extração através a espátula Lecron-Zalle (GOLGRAN®, São Caetano do Sul/SP) em movimento de alavanca, de acordo com a técnica adaptada de MAAHS et al. (2011).

Todas as exodontias foram realizadas por um único operador e os animais foram randomizados quanto à ordem que foram submetidos ao procedimento cirúrgico (comando aleatorização, Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation®) (SILVA et al., 2016).

O tempo de cada procedimento cirúrgico foi cronometrado e os dentes foram secos em papel absorvente e pesados em balança de 10<sup>-5</sup> g de precisão de acordo com protocolo estabelecido por FERREIRA JÚNIOR (2016), sendo verificado a presença ou ausência de fratura radicular durante a cirurgia.

No dia 77/semana11 (D77/S11) todos os animais foram eutanasiados por meio de overdose de barbitúrico Tiopental (100mg/kg) + Lidocaína (7 mg/kg) por via intraperitoneal.

#### 4.4 Grupos experimentais

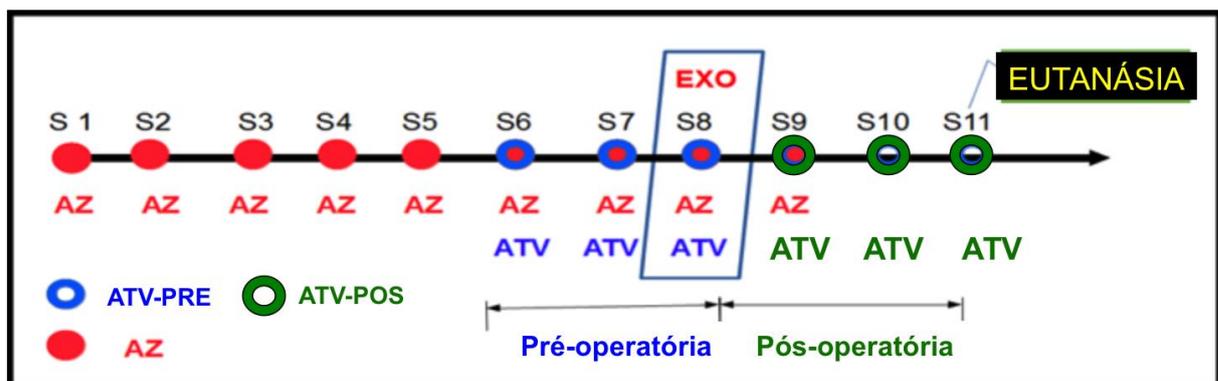
Para este estudo os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6):

- Grupo Salina (SAL)
- Grupo Ácido Zoledrônico (AZ)
- Grupo Atorvastatina pré-operatória (ATV - PRÉ)
- Grupo Atorvastatina pós-operatória (ATV - PÓS)

#### 4.5 Tratamento com Atorvastatina (ATV)

A ATV (Atorvastatina Cálcica, EMS, Hortolândia – SP – BRASIL na dose de 27 mg/kg (GOES et al., 2014) administrada por via oral (v.o.), diariamente, por três semanas consecutivas de acordo com o grupo experimental. No grupo pré-operatório a ATV foi administrada a partir do dia 28/semana 6 (D28/S6) até do dia 49/semana8 (D49/S8), 01h antes da realização da exodontia dos molares superiores esquerdos. No grupo pós-operatório a ATV foi administrada 01h após a exodontia dos molares superiores esquerdos no dia 49/semana8 (D49/S8) até o dia 77/semana11 (D77/S11). (Fig. 4).

**Figura 4** – Protocolo experimental do estudo.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: No grupo Salina os animais não foram submetidos à OMB, nenhuma medicação foi administrada, sendo feita a exodontia (D49/S8) e acompanhados até a eutanásia (D77/S11); no grupo Controle os animais receberam AZ (0,1 mg/kg), e foram submetidos a exodontia (D49/S8) e acompanhados até a eutanásia (D77/S11); no grupo ATV – PRÉ antes do procedimento de extração dentária (D49/S8), foi administrada Atorvastatina na dose de 27 mg/kg por via oral diariamente por 03 semanas consecutivas (S6, S7 e S8); (D28-D49), para prevenir OMB e no grupo ATV – PÓS, 01 hora após o procedimento de extração dentária (D49/S8), foi administrada Atorvastatina na dose de 27 mg/kg por via oral diariamente por 03 semanas consecutivas (D49-D70) (27 mg/kg, diariamente) para prevenir OMB. Os animais foram acompanhados até a eutanásia (D77/S11).

#### **4.6 Avaliação Macroscópica**

Após a anestesia e previamente ao procedimento cirúrgico, foi realizada avaliação da cavidade oral do animal, com o objetivo de identificar a presença de lesão na cavidade oral ou qualquer alteração na mucosa oral das ratas antes da exodontia (adaptado de MAAHS et al., 2008).

Após a eutanásia dos animais, a maxila foi removida e uma nova avaliação macroscópica da cavidade oral foi realizada para avaliar presença ou ausência de exposição óssea; presença ou ausência de solução de continuidade da mucosa oral nas regiões das exodontias, esta última com auxílio de uma sonda clínica número 5 (GOLGRAN®, São Caetano do Sul/SP) (MAAHS et al, 2011).

#### **4.7 Análise Histológica**

Após análise macroscópica as maxilas foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. A seguir, foram submetidas a descalcificação com EDTA a 10%, por aproximadamente 90 dias, para a desmineralização, seguido de banho em água corrente por 24 horas. As peças foram armazenadas em álcool absoluto até sua inclusão em parafina. Foram feitos cortes seriados de 04 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

A análise histopatológica foi realizada por um observador experiente que desconhecia os grupos, nas magnificações de 100X, 200X e 400X. Os parâmetros analisados foram: o aspecto histológico geral de cicatrização, a intensidade do infiltrado inflamatório e a presença de sequestro ósseo.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi analisada na área do defeito próximo do local das exodontias, por meio de escores variando de 0 a 3, onde 0 = ausência ou discreto infiltrado de Polimorfonucleares (PMN); 1 = 1/3 do campo observado com PMN; 2 = 2/3 do campo observado com PMN; 3 = campo completamente repleto de PMN (Adaptado de YANIK et al., 2016).

A presença de sequestro ósseo também foi analisada na área do defeito próximo do local das exodontias, por meio de escores variando de 0 a 2, onde 0= ausência de sequestro ósseo; 1 = 3 do campo observado com sequestro ósseo; 2 = 2/3 do campo observado com sequestro ósseo (Adaptado de YANIK et al., 2016). O sequestro ósseo foi caracterizado por uma área isolada de tecido ósseo sem osteócitos viáveis e circundado por tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório.

Estes parâmetros foram mensurados conforme descrito na tabela 01 e os dados foram apresentados como mediana (valores extremos).

**Tabela 01** – Parâmetros de aspectos histológicos de infiltrado inflamatório e de presença de áreas necróticas e/ou sequestros ósseos.

PARÂMETRO	ESCALA			
Infiltrado inflamatório:	0=Normal. ausência ou discreto infiltrado de PMN	1=Discreta. 1/3 do campo observado com PMN	2=Moderada. 2/3 do campo observado com PMN	3=Intensa. campo completamente repleto de PMN
Sequestro ósseo:	0 = Ausente. Ausência de sequestro ósseo	1=Leve. 1/3 do campo observado com sequestro ósseo	2=Intenso. 2/3 do campo observado com sequestro ósseo	

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018), adaptado de Yanik et al., 2016.

#### 4.8 Análise histomorfométrica do número de osteócitos viáveis e lacunas vazias

As mesmas lâminas do estudo histopatológico foram utilizadas para a análise histomorfométrica. Para tanto, em magnificação de 400x, no local referente às extrações, foram fotografados 10 (dez) campos em cada lâmina, selecionados de forma aleatória seguindo as seguintes regiões (coronária, intermediária e apical). O número de osteócitos e lacunas vazias foram contados com o auxílio do software Image J® (NIH, Bethesda – MD - EUA) utilizando o comando *cell conter* (JILKA, NOBLE, WEISNTEIN, 2013). A soma do número de osteócitos e de lacunas vazias presentes nos dez campos analisados foi utilizada para a avaliação quantitativa. O somatório dos campos de cada lâmina foi considerado como unidade amostral.

#### 4.9 Análise da Superfície óssea por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Um experimento adicional foi realizado para análise em microscopia eletrônica de varredura. Após a eutanásia dos animais, as hemiarcadas foram removidas e fixadas em Karnovsky por no mínimo 6 horas, depois mantidas em um tampão Cacodilato. As maxilas foram cortadas em uma cortadeira com disco diamantado (vestibular-palatina) para a obtenção do fragmento da maxila (fragmento de 0,5 X 0,2 cm e com 0,5 mm de espessura), delimitado a região onde realizou – se as exodontias. O fragmento foi colocado em um eppendorf e deixado no dessecador por 24h para secagem. Os fragmentos foram montados em *stubs* para a realização da metalização com ouro em pó (Metalizador Quorum QT150ES, Quorum Technologies, Laughton, Inglaterra) para a análise por microscopia eletrônica por varredura (MEV inspect-50, FEI, Hillsboro, Oregon, USA) (LIMA et al., 2017). A superfície óssea próximo ao local de extração foi analisada quanto a rugosidade nas ampliações de 300x, 800x, 1000x.

#### 4.10 Análise da Composição óssea por Espectroscopia Micro-Raman

Um experimento adicional foi realizado para coleta de maxilas para a realizar espectroscopia Raman. Após eutanásia as peças foram armazenadas no freezer a -80 °C para posterior análise em espectrofotômetro Micro-Raman (XploRA™, Horiba JobinYvon, Paris, França) acoplado a um microscópio Confocal, modelo XploRA™ e fabricado pela Horiba Jobin Yvon. Os espectros raman foram obtidos com excitação em 785 nm e a potência do laser foi de 50%.

Para a padronização do presente estudo, as peças tiveram suas aquisições realizadas em dois pontos distintos, próximos à região de exodontia (dentro e fora do alvéolo). A distribuição espacial dos componentes orgânicos e inorgânicos foram determinadas através das intensidades relativas correspondentes aos picos Raman. Os espectros Raman foram obtidos utilizando laser de argônio com comprimento de onda de 638 nm e potência de 3,2 mW (Olympus). Além disso, aumentos de 10 e 100 vezes foram utilizados para permitir o foco as regiões avaliadas (CARVALHO, 2017).

O espectro Raman foi obtido na faixa de 750  $\text{cm}^{-1}$  a 1500  $\text{cm}^{-1}$  com 10 segundos de análise e total de 3 acumulações por região. As bandas Raman selecionadas para avaliação foram em ~960 e ~1070  $\text{cm}^{-1}$ , as quais são atribuídas à

hidroxiapatita (HA) fosfatada e HA carbonatada, respectivamente, e a banda  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$  que é atribuída ao componente de colágeno da matriz óssea (PENEL, et al., 1998; TIMLIN, CARDEN, MORRIS, 1999; TARNOWSKI, IGNELZI e MORRIS, 2002; MORRIS e MANDAIR, 2011).

Os dados foram obtidos por um sistema de comando de aquisição de dados LabSpec 6 software (Horiba, JobinYvon, Paris, França) e analisados pelo programa Origin 9 (Originlab© Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060, U.S.A.), em que foi calculada a intensidade dos espectros referente ao Fosfato ( $981,9 - 925,7 \text{ cm}^{-1}$ ), Prolina ( $921 - 855 \text{ cm}^{-1}$ ), Fenilalanina ( $1002 \text{ cm}^{-1}$ ), Hidroxiapatita ( $876 \text{ cm}^{-1}$ ), Amida I ( $1, 716.3 - 1, 541.2 \text{ cm}^{-1}$ ), Amida III ( $1243 - 1320 \text{ cm}^{-1}$ ) (PENEL et al., 1998; TIMLIN, CARDEN, MORRIS, 1999; MORRIS e MANDAIR, 2011). As bandas de Fosfato e Hidroxiapatita correspondem a porção mineral do tecido ósseo, enquanto as bandas de matriz são marcadas pela Prolina, Fenilalanina, Amida I e Amida III.

Além das bandas, foram calculadas a relação mineral/matriz ( $\sim 960 \text{ cm}^{-1}/\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ ), relação carbonato/Amida I ( $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}/\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ ) e também a relação entre a HA carbonatada/fosfatada ( $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}/\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ ) (KOURKOUMELIS e TZAPHLIDOU, 2010; ARUWAJOYE, KIM e ASWATH, 2015). Todos os espectros foram adquiridos no mesmo dia e, sob condições ambientais, para evitar desalinhamentos ópticos e alterações na potência do laser.

#### **4.11 Análise do Percentual da Área representada por Tecido Ósseo através da Microscopia Confocal**

Sabendo que o colágeno é uma proteína estrutural que apresenta um fenômeno natural de autofluorescência (MONICI, 2005), as mesmas lâminas utilizadas para o estudo histopatológico foram analisadas por Microscópio Confocal LSM 710 (Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) através do software do fabricante (Zen 2.1 lite black, 64-bit version, 758 MB, Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha). Para obtenção das imagens foi utilizado um laser de comprimento de onda de 488 nm e canal de emissão de fluorescência FITC-verde (CARVALHO et al., 1999; ORIÁ et al., 2003; GONÇALVES et al., 2014; LIMA et al., 2017).

Após a obtenção da imagem em uma magnificação de 20x, foi mensurado o percentual de preenchimento ósseo na região do alvéolo, utilizando a imagem de toda a extensão da lâmina.

Para medida do percentual de preenchimento ósseo foi realizada inicialmente a delimitação e recorte da área dos alvéolos com auxílio do Software ImageJ®, utilizando o comando de seleção de área livre (*Freehand selections > Clear Outside*). Após essa etapa, foi mensurada a área total de cada alvéolo através do comando Measure (*Analyze > Measure*). Posteriormente, a imagem teve suas cores invertidas a partir do comando Invert (*Edit > Invert*) e foi feita calibração das imagens pelo comando Color Thershold (*Image > Adjust > Color Thershold*) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 35 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255). Depois da calibração, com destaque para tecido ósseo, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (*Image > Type > 8-bit*), binarizadas (*Process > Binary > Make Binary*) para então ser mensurada a porcentagem da área marcada em branco, referente ao tecido ósseo (*Analyze > Analyze Particles*) (FERREIRA JÚNIOR, 2016). Os dados foram expressos como média ± E.P.M.

#### **4.12 Análise da quantidade e tipo de Colágeno**

A coloração de Picrosirius Red (PSR) é um método simples e sensível de detectar a presença de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979) aumentando sua birrefringência quando analisado sob luz polarizada (JUNQUEIRA et al. 1979; MONTES e JUNQUEIRA 1991), permitindo assim a identificação do tipo de colágeno (colágeno tipo I - coloração amarelo-avermelhada e colágeno tipo III - coloração verde-esbranquiçada) (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES e JUNQUEIRA 1991).

Para esta análise, secções histológicas de 3 µm foram dispostas em lâminas de vidro silanizadas e desparafinados em estufa a 60°C por 3h e três banhos de xilol (5 minutos). Após reidratação em série decrescente de álcool as lâminas foram incubadas em solução de Picrosirius (ScyTek®, Logan, UT, USA) por 30 minutos e então lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan®. Após preparo, as lâminas foram analisadas sob microscópio convencional e sob filtro de luz polarizada.

Para avaliação do colágeno foram fotografados 6 campos em um aumento de 200x (Microscópio Leica) na região em que foi realizada as exodontias. As fotomicrografias foram avaliadas quantitativamente pelo software de análise de imagem ImageJ®, após calibração das imagens pelo comando Color Thershold

(Image > Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92). Depois da calibração as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área total de colágeno marcada em preto (*Analyse > Analyse Particles*). Após polarização de luz, o mesmo protocolo foi realizado ajustando-se as cores na função RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32). Após ajuste, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (*Process > Binary > Make Binary*) e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo avermelhado relativa à área marcada em vermelho. Foi obtida a área verde-esbranquiçada através de processo semelhante ao descrito para a área amarelo avermelhada alterando-se os canais de cores RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 65), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255) (ANDRADE et al., 2011; FERREIRA JÚNIOR, 2016). A média das porcentagens das lâminas foi utilizada como uma unidade de amostra e os dados foram apresentados como média percentual  $\pm$  E.P.M.

#### **4.13 Imunohistoquímica para DKK-1, Wnt10b, $\beta$ -catenina e Caspase-3**

A partir dos blocos de parafina usados para análise histológica foram removidas secções de tecido que foram submetidos aos anticorpos DKK-1, Wnt10b,  $\beta$ -catenina e Caspase-3 utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU e RAINE, 1981).

Para tanto, as secções foram desidratados em álcool sendo, então, incluídas em parafina. Em seguida, foram feitos cortes seriados de 4  $\mu$ m em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de poli-L-lisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0) sob aquecimento em banho-maria, por 1 hora e 30 minutos para a recuperação antigênica a 69 °C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (30 minutos). Posteriormente, foi feito bloqueio de proteína com albumina sérica bovina (BSA) a 5% por 30 minutos.

Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário de cabra para  $\beta$ -catenina 1:100 (ABCAM<sup>®</sup>, Cambridge, MA, EUA), anticorpo policlonal anti-coelho para Wnt10b diluído 1:200 (ABCAM<sup>®</sup>, Cambridge, MA, USA) em anticorpo diluente, para DKK-1 diluído 1:100 (ABCAM<sup>®</sup>, Cambridge, MA, EUA) e para Caspase-3 diluído em 1:50 (SantaCruz Biotechnology<sup>®</sup>, Dallas, TX, EUA) Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) biotilado IgG de cabra diluído 1:400 (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Dallas, TX, EUA), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles foram processados simultaneamente como descritos acima, para o controle negativo o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5% (HSU e RAINE, 1981; DALCICO et al., 2013) e para o positivo foram utilizados os tecidos de referencia de acordo com o fabricante. As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3.5 (LEICA DM 1000, Wetzlar, Alemanha). Foi realizada a contagem de células imunomarcadas positivamente ao redor do tecido ósseo localizado na região próxima as exodontias em 05 campos por lâmina (ANDRADE et al., 2008; LISBOA et al., 2015).

#### **4.14 Níveis gengivais de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$**

As concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram determinadas, pelo método ELISA, a partir do tecido gengival vestibular dos MSE coletado após eutanásia em todos os grupos experimentais. O tecido gengival foi removido e armazenado a -80°C. O material foi homogeneizado em PBS e o sobrenadante foi usado para determinar os níveis de citocina por meio do *Kit DuoSet* (ReD Systems, Minneapolis, MN, EUA) (DALCICO et al., 2013).

Inicialmente as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$  por 18h em temperatura ambiente com 100  $\mu$ L de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200  $\mu$ L de tampão de lavagem (ReD Systems, EUA) e bloqueadas com 200  $\mu$ L de BSA 1% (ReD Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100  $\mu$ L das

amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 µl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1β ou TNF-α em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200 µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação (ReD Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/ml.

#### **4.15 Dosagens Bioquímicas**

Dois dias antes do início do experimento (D0), e no dia do sacrifício (D77), foram coletados de cada animal 2 ml de amostra de sangue do plexo retro-orbital sob anestesia, com o objetivo de dosar as concentrações séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea dos animais. Em seguida, para a reposição dos fluídos, 2 ml de solução salina a 0,9% foram administrados por via intraperitoneal. Os tubos de sangue foram centrifugados 20 minutos (a 4000 rpm) e o sobrenadante foi coletado e armazenado - 80°C para posterior análise.

As dosagem de Cálcio e Fósforo foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa –MG, Brasil). Os níveis séricos de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), um marcador de formação óssea, foram determinados usando a metodologia da inativação térmica de amostras (MOSS e WHITBY, 1975). Inicialmente fez-se a dosagem de fosfatase alcalina total (FAT), seguindo a metodologia do fabricante (Labtest<sup>®</sup>). A FAT é composta pelas isoformas hepáticas, entérica e óssea. Considerando que a isoforma óssea é termosensível uma nova dosagem foi feita após aquecimento da amostra a 56°C por 10 min (FAA). Os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO) foram obtidos pela diferença entre os valores de FAT e FAA. Os níveis séricos das enzimas foram expressos em U/L.

#### 4.16 Análise Estatística

A normalidade dos dados foram verificadas através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey no caso de homogeneidade de variâncias ( $p \geq 0,05$ ) ou pelo teste Games-Howell caso não houvesse homogeneidade de variâncias ( $p < 0,05$ ). Os dados não paramétricos foram apresentados com mediana (valores extremos), sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Em todas as situações foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

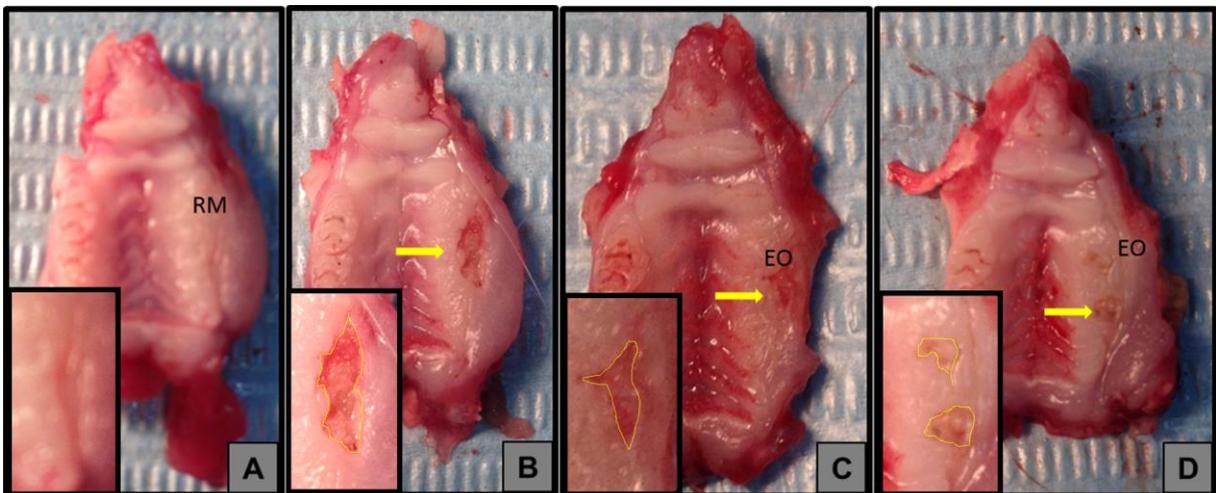
O software utilizado para todas as análises foi o IBM® SPSS® statistics 20 e gráficos elaborados usando recursos do GraphPad Prism® versão 6.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Macroscópica

Após a eutanásia, todas as maxilas extraídas foram examinadas para verificar a presença de exposição óssea nos locais de extração, formação de abscessos e fístulas e cicatrização óssea (Fig. 5).

**Figura 5** – Imagens representativas do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidos a OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Aspecto macroscópico da maxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV pré (C) ou ATV pós (D). Seta amarela indica Exposição Óssea (EO) na cavidade oral, Recobrimento Mucoso (RM).

Todos os animais do grupo AZ (Fig. 5B) apresentaram exposição óssea com solução de continuidade da mucosa oral, enquanto os animais do grupo Salina (Fig. 5A) apresentaram recobrimento da ferida cirúrgica. No grupo ATV - PRÉ (Fig. 5C), 05 animais apresentaram recobrimento da mucosa oral e 01 animal com pequena área de exposição óssea, já no grupo ATV - PÓS (Fig. 5D), 04 animais apresentaram recobrimento da mucosa oral e 02 animais com pequena área de exposição óssea.

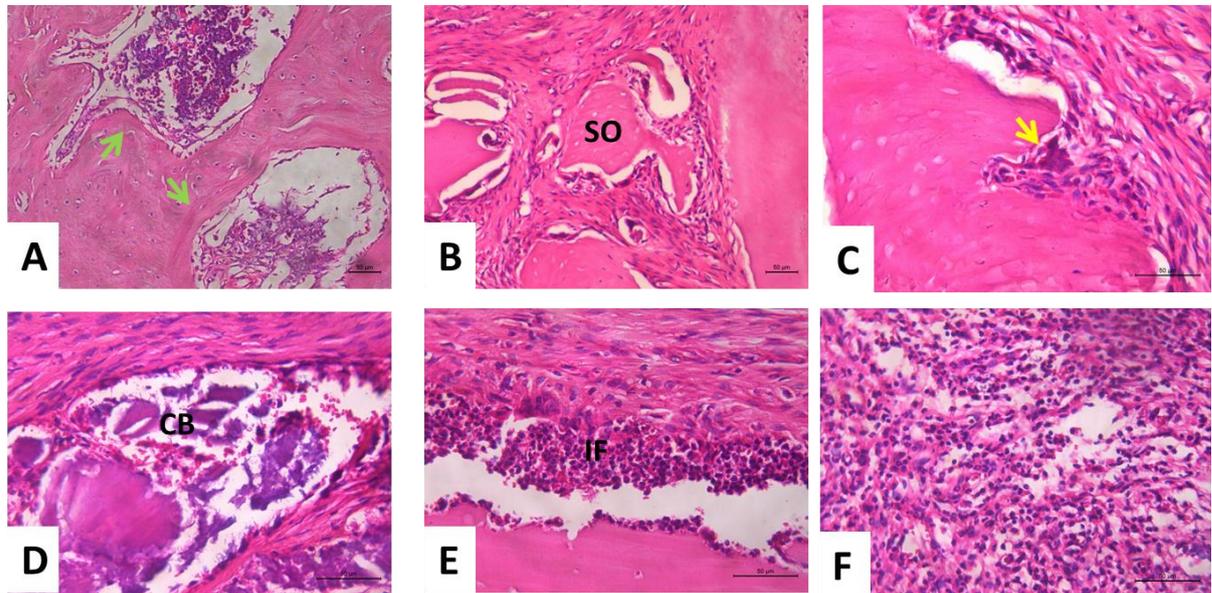
## 5.2 Análise Histopatológica

De forma geral a hemimaxila de animais submetido à OMB (Fig.7B), mostrou um tecido ósseo com inúmeras lacunas de osteócitos vazias, áreas de grande infiltrado inflamatório, aumento de vasos congestionados e sequestros ósseos, além de áreas sugestivas de colônias bacterianas (Fig. 6 A - 6F). Por outro lado, os animais do grupo SAL (Fig. 7A) apresentaram tecido ósseo mais organizado e celularizado, preservação de osteócitos viáveis, com atividade osteoblástica e raros osteoclastos, sem alterações teciduais, além de eventuais focos inflamatórios residuais ao redor do sítio de exodontia (Fig. 7A). Nos grupos que utilizaram ATV foi observada de forma geral uma melhora no infiltrado inflamatório, com redução da congestão dos vasos sanguíneos, redução do número das lacunas vazias de osteócitos (ATV - PRÉ [Fig. 7C]; ATV - PÓS [Fig. 7D]). Em todos os grupos o osso recém-formado apresentou aspecto imaturo, com lamelas desorganizadas e muitos espaços medulares nas áreas onde foram realizadas as exodontias.

A tabela 2 mostra a análise da intensidade do infiltrado inflamatório nos animais submetidos a OMB e tratados com ATV. Os animais do grupo SAL apresentaram discreto infiltrado inflamatório (Fig. 7A). O modelo de OMB apresentou um infiltrado inflamatório neutrófilico moderado (Fig. 7B) O tratamento com ATV (grupos ATV - PRÉ [Fig. 7C] e ATV - PÓS [Fig. 7D]) reduziu a intensidade do infiltrado. Apesar da tendência a proteção tecidual mediada pela ATV não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos (Tabela 2).

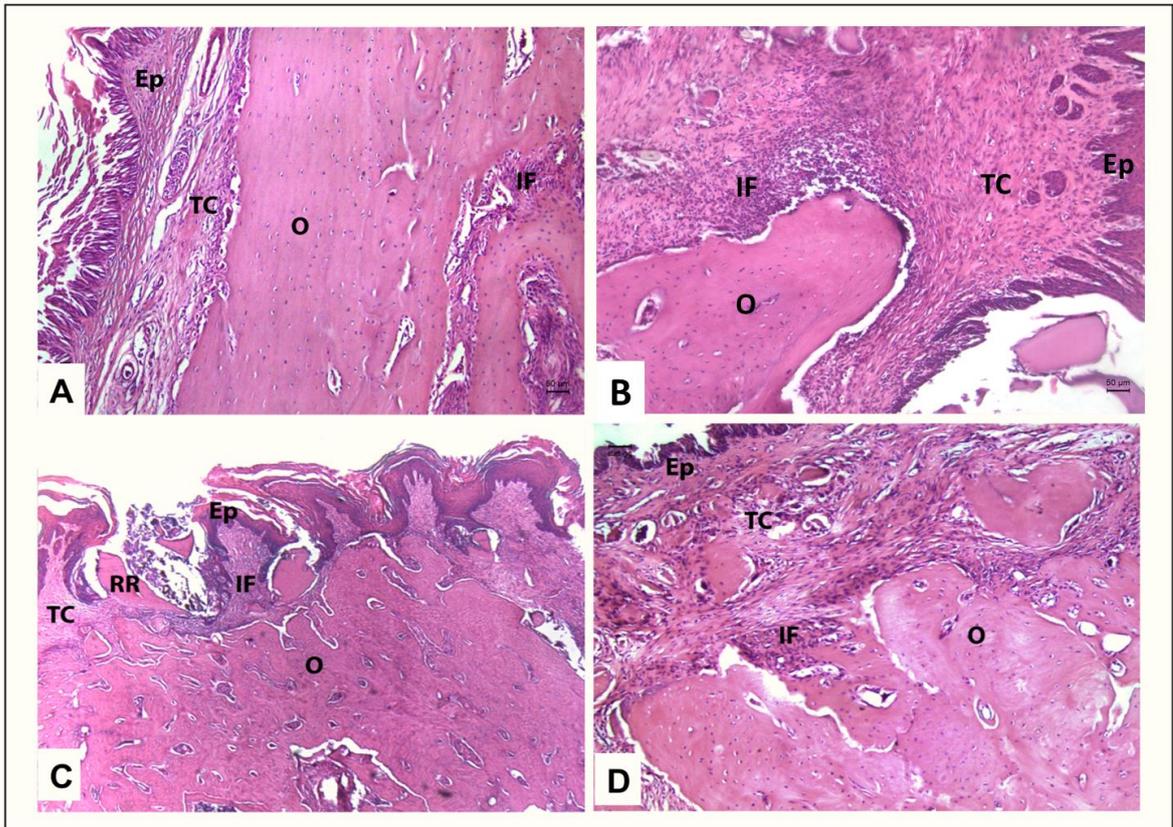
A avaliação da presença de sequestros ósseos pode ser analisada na tabela 3. Os animais do grupo SAL apresentaram ausência de sequestro ósseo na sua maioria (Fig. 7A). No grupo AZ os sequestros estavam levemente presentes (Fig. 7B). Já no grupo tratado com ATV (PRE [Fig. 7C] ou POS [Fig. 7D]) se observou redução desses achados (Tabela 3). Não houve diferença estatística entre os grupos.

**Figura 6** – Fotomicrografia dos aspectos histopatológicos do efeito do AZ no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia da hemimaxila de ratas que receberam AZ. (A) Presença de vasos congestionados (setas verdes); (B) presença de sequestro ósseo no aumento de 200x; (C) sequestro ósseo no aumento de 400x e osteoclasto (seta amarela); (D) áreas sugestivas de colônia bacteriana; (E) presença de infiltrado inflamatório moderado no aumento de 200x e (F) Infiltrado inflamatório no aumento de 400x. SO= Sequestro ósseo; CB= colônia bacteriana; IF= Infiltrado Inflamatório. Barra – 50 µm, Hematoxilina e Eosina (H&E). (200x e 400x magnificação).

**Figura 7** – Fotomicrografia dos aspectos histopatológicos do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia da hemimaxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV pré (C) ou ATV pós (D). O=Osso; TC=Tecido conjuntivo; Ep=Epitélio; RR=Raiz residual; IF= Infiltrado Inflamatório. Barra – 50 µm, Hematoxilina e Eosina (H&E). (100x magnificação).

**Tabela 2** – Análise histopatológica do efeito da ATV na intensidade de infiltrado inflamatório no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.

<b>Intensidade do infiltrado inflamatório</b>	<b>SAL</b>	<b>AZ</b>	<b>ATV-PRÉ</b>	<b>ATV-PÓS</b>
(0) Normal	02	00	01	02
(1) Discreta (1/3)	03	01	03	03
(2) Moderada (2/3)	01	05	02	01
(3) Intensa (3/3)	00	00	00	00
<b>Mediana (valores extremos)</b>	1 (0-3)	2 (1-2)	1 (0-3)	1 (0-3)

**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: SAL=Salina, AZ=Ácido Zoledrônico, ATV-PRÉ=Pré-operatório e ATV-PÓS=Pós-operatório. Valores são apresentados em Mediana (Valores extremos) de 6 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

**Tabela 3** – Análise histopatológica do efeito na ATV sobre presença de sequestro ósseo no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.

<b>Sequestro ósseo/ Necrose óssea</b>	<b>SAL</b>	<b>AZ</b>	<b>ATV PRÉ</b>	<b>ATV PÓS</b>
(0) ausente	04	01	04	04
(1) levemente presente (1/3)	02	04	02	01
(2) presente acentuadamente (2/3)	00	01	00	01
<b>Mediana (valores extremos)</b>	0 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-2)

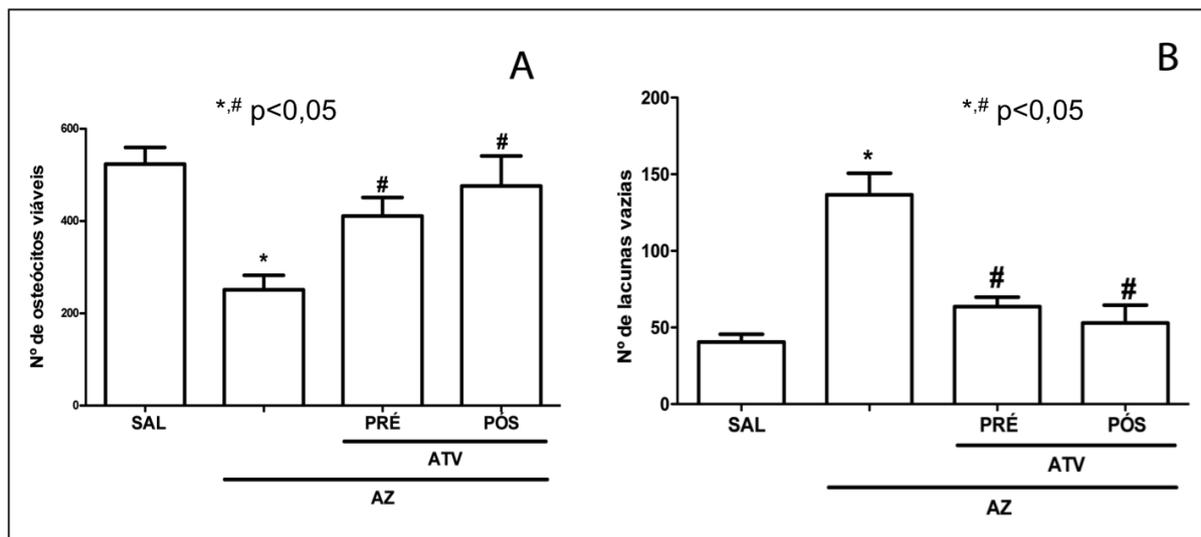
**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: SAL=Salina, AZ=Ácido Zoledrônico, ATV-PRÉ=Pré-operatório e ATV-PÓS=Pós-operatório. Valores são apresentados em Mediana (Valores extremos) de 6 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

### 5.3 Análise histomofométrica do número de osteócitos viáveis e número de lacunas vazias.

A figura 7A mostra distribuição do número de osteócitos viáveis nos animais submetidos a OMB e tratados com ATV. O modelo de OMB causou uma redução significativa do número de osteócitos viáveis ( $251,25 \pm 31,44$  células) (Fig. 9B) quando comparado ao grupo SAL ( $523,50 \pm 36,02$  [Fig. 9A]). O tratamento com ATV (ATV-PRÉ=  $411,16 \pm 40,12$ ; [Fig. 9C]) (ATV-PÓS=  $476,20 \pm 65,13$ ; [Fig. 9D]) preveniu a morte de osteócitos no tecido ósseo quando comparado ao grupo AZ.

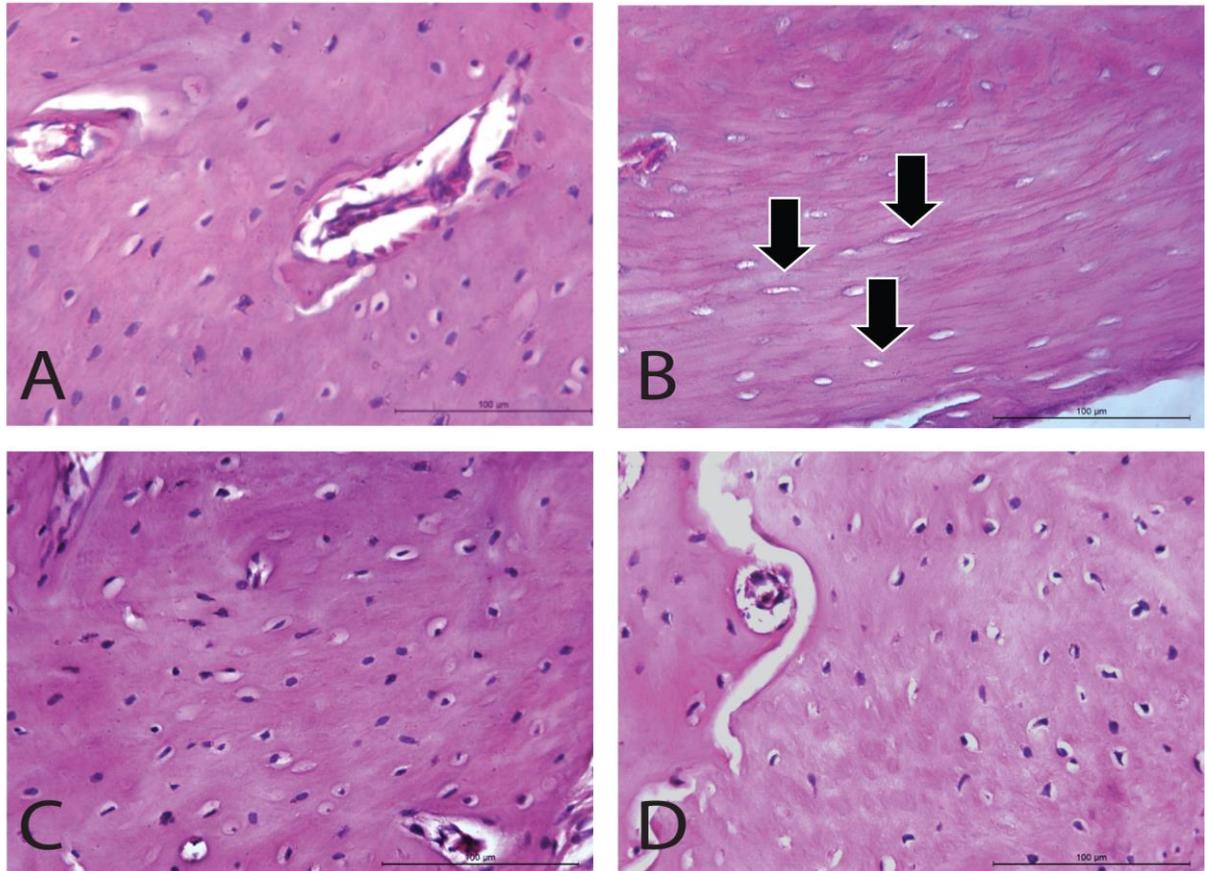
Considerando o número de lacunas vazias (Fig. 8B), o AZ provocou um aumento no número de lacunas vazias ( $136,66 \pm 13,94$ ) (Fig. 9B) quando comparado com o SAL ( $40,50 \pm 5,03$ ) (Fig. 9A) ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o tratamento com ATV ([ATV-PRÉ =  $63,66 \pm 6,15$  [Fig. 9C]) (ATV-PÓS =  $53,00 \pm 11,64$  [Fig. 9D]) reduziu o número de lacunas vazias de osteócitos quando comparado ao grupo AZ ( $p < 0,05$ ).

**Figura 8** – Análise histomorfométrica do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Análise histomorfométrica do efeito da ATV no número de osteócitos viáveis (A) e número de lacunas de osteócitos vazias (B) na hemimaxila de ratas submetidas a OMB (B), Barras representam média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. (\*) indica diferença quando comparado ao grupo SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ. (ANOVA e Tukey). ( $p < 0,05$ ).

**Figura 9** – Fotomicrografia dos aspectos histopatológicos do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.

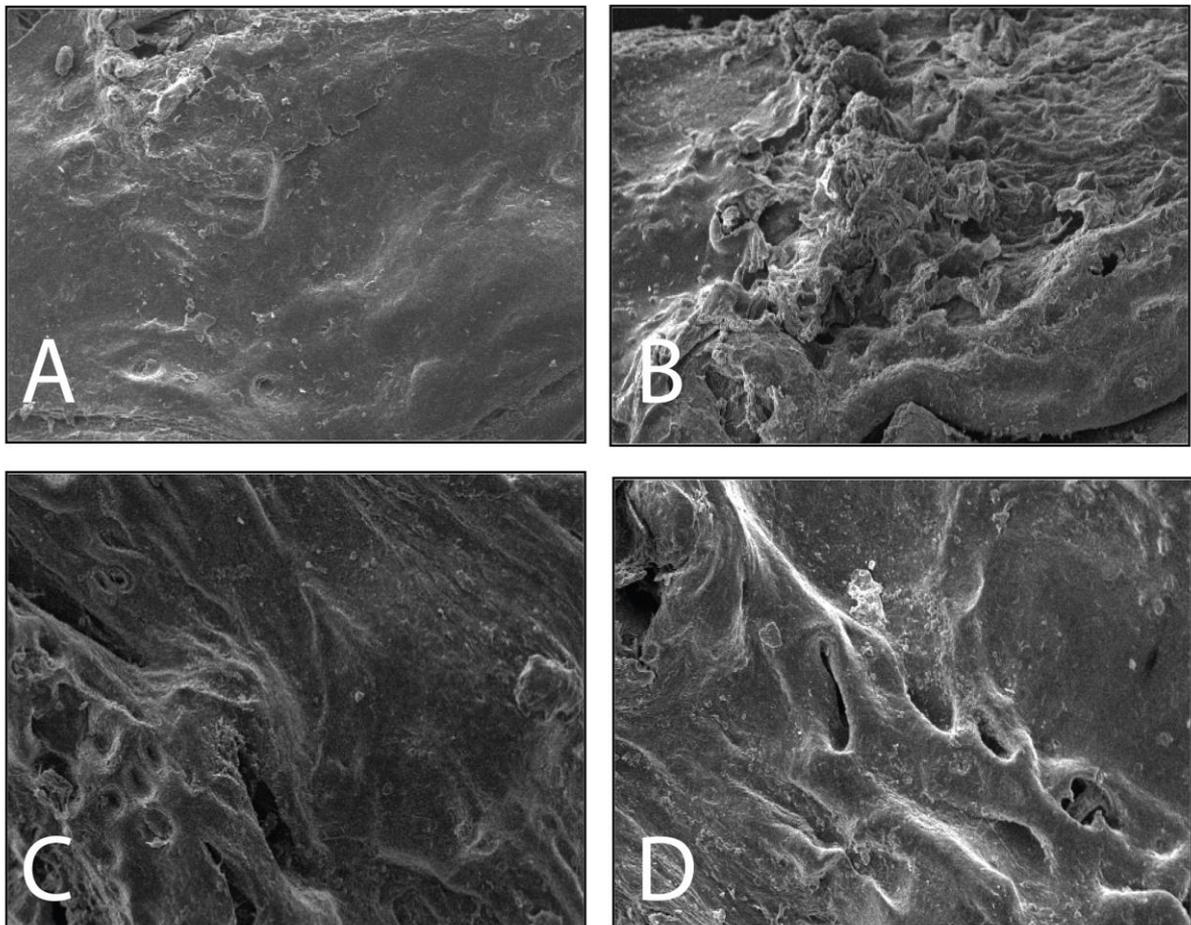


**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia da maxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV pré (C) ou ATV pós (D). Lacunas vazias (setas preta). Barra – 100 µm, Hematoxilina e Eosina (H&E). (400x magnificação).

#### 5.4 Análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na análise da superfície óssea pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar que o AZ modificou a superfície óssea tornando-a mais rugosa (Fig. 10B) quando comparado ao grupo SAL (Fig. 10A), que caracteriza uma superfície reabsorvida, passando por escavações de osteoclastos. O tratamento com ATV, seja pré-operatório (Fig. 10C) ou pós-operatório (Fig. 10D), preservou a estrutura óssea, com menor rugosidade da superfície óssea, caracterizando formação óssea.

**Figura 10** – Eletrofotomicrografia do efeito da ATV na superfície da maxila de ratas submetidas a OMB.

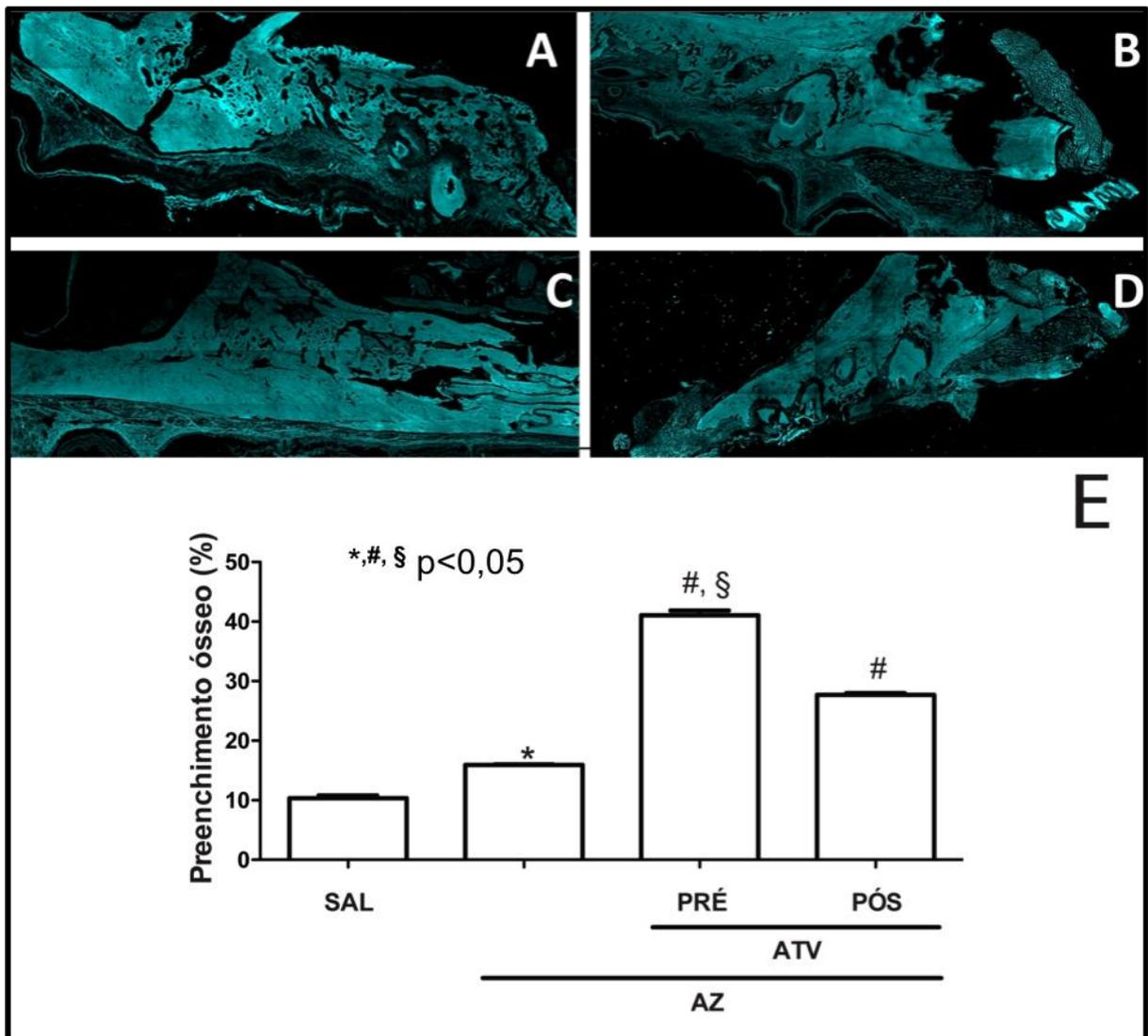


**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia do efeito da ATV na superfície da maxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV-PRÉ (C) ou ATV-PÓS (D). Barra – 1mm, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (80x magnificação).

### **5.5 Análise do Percentual da Área representada por Tecido Ósseo através da Microscopia Confocal**

Os animais do grupo AZ ( $15,88\% \pm 0,0850$ ) (Fig. 11B) demonstram um aumento da porcentagem do preenchimento ósseo comparado ao grupo SAL ( $10,57\% \pm 0,4064$ ) (Fig.11A) ( $p < 0,05$ ). O tratamento com ATV-PRÉ ( $40,65\% \pm 0,7048$ ) (Fig. 11C) ou ATV-PÓS ( $27,69\% \pm 0,2451$ ) (Fig.11D) aumentou de forma significativa o percentual de preenchimento de tecido ósseo quando comparado ao grupo AZ. Houve diferença estatística entre os grupos ATV-PRÉ ( $40,65\% \pm 0,7880$ ) e ATV-PÓS ( $27,69\% \pm 0,2740$ ) (Fig.11E). ( $p < 0,05$ ).

**Figura 11** – Fotomicrografia do efeito da ATV no percentual de preenchimento ósseo na maxila de ratas submetidas a OMB.

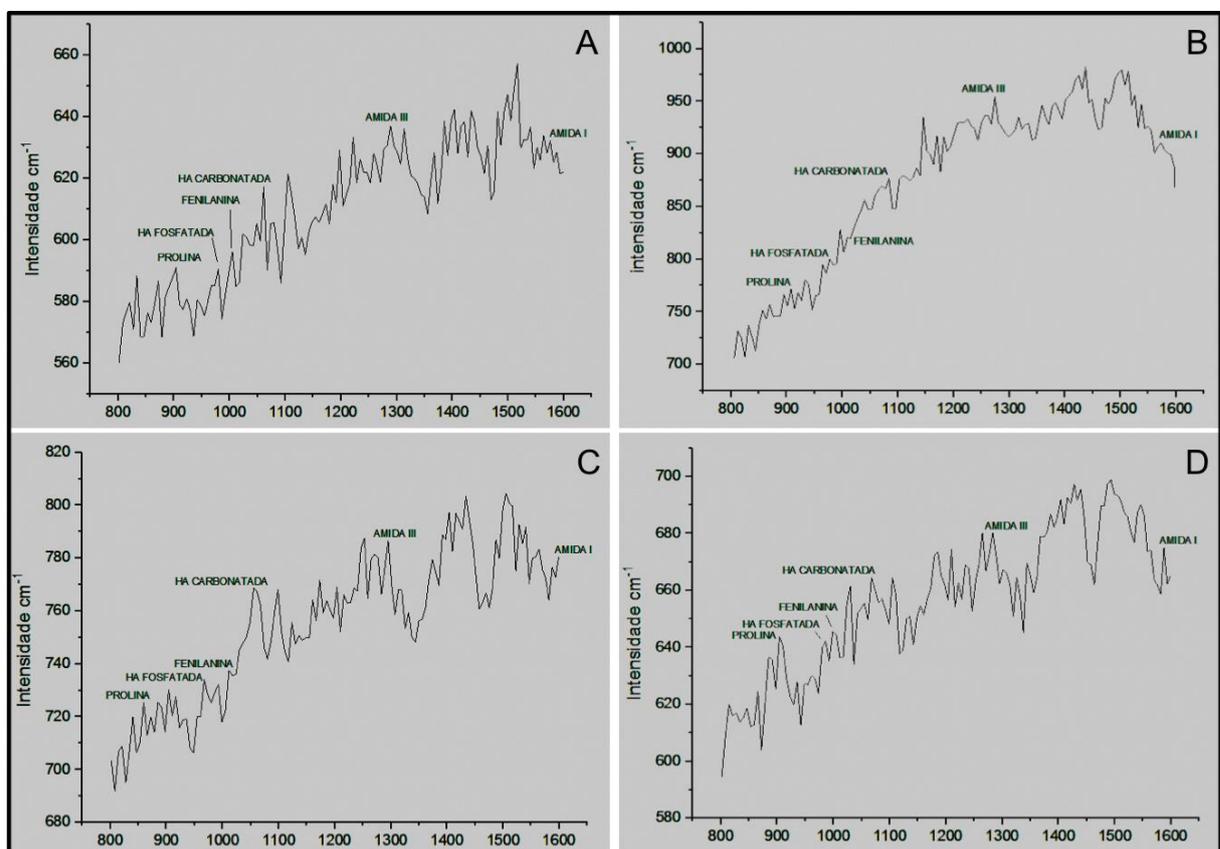


**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia do efeito da ATV no preenchimento ósseo da hemimaxila de animais que receberam SAL (A), AZ (B) ATV - PRÉ (C) ou ATV - PÓS (D) em imagem binária. (20x magnificação). Efeito da ATV preenchimento ósseo da hemimaxilla de animais submetidos a OMB. Barras representam média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. (\*) indica diferença quando comparado ao SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ. (§) indica diferença entre os grupos ATV (ANOVA e Tukey) ( $p < 0,05$ ).

## 5.6 Análise da composição óssea por espectrometria RAMAN

O espectro Raman de todos os grupos pode ser visto na Figura 12. Os dados das bandas vibracionais são mostradas na Tabela 4. Foi possível observar que houve um aumento significativo em todas as bandas selecionadas para análise no grupo AZ quando comparado a SAL. O tratamento com ATV (PRÉ e PÓS) reduziu o aumento da banda de HA carbonatada e de Amida I e ATV – PÓS reduziu Amida III ( $p < 0,05$ ).

**Figura 12** – Efeito da ATV sobre os componentes do osso da maxila de ratas submetidas a OMB.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Espectros representativos das bandas estudadas no maxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV-PRÉ (C) ou ATV-PÓS (D).

**Tabela 4** – Efeito da ATV nos espectros Raman dos principais componentes relacionadas ao tecido ósseo.

GRUPO RAMAN SHIFT (cm <sup>-1</sup> )	SAL	AZ	ATV – PRÉ	ATV – PÓS
PROLINA (921 - 855 cm <sup>-1</sup> )	610.3±30,33	725,7±85,01*	741,6±46,60	676,0±31,90
HA FOSFATADA (981.9 - 925.7 cm <sup>-1</sup> )	616.6±32,40	748,9±88,98*	763,2±31,61	681,5±34,14
FENILANINA (1002 cm <sup>-1</sup> )	630,5±33,70	775,2±93,71*	760,1±45,39	693,7±43,25
HA CARBONATADA (~1070 cm <sup>-1</sup> )	633,6±29,36	807,5±113,89*	781,5±47,43 <sup>#</sup>	711,9±33,65 <sup>#</sup>
AMIDA III (1243 – 1320 cm <sup>-1</sup> )	655,1±22,90	872,1±147,95*	822,9±35,50	728,1±45,64 <sup>#</sup>
AMIDA I (1. 716.3 - 1. 541.2-1 cm <sup>-1</sup> )	655,9±20,30	803,0±152,30*	792,7±16,97 <sup>#</sup>	726,8±45,10 <sup>#</sup>

**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: SAL=Salina, AZ=Ácido Zoledrônico, ATV-PRÉ=Pré-operatório e ATV-PÓS=Pós-operatório. Valores são apresentados em médias±EPM das intensidades dos picos Raman estudados. (\*) indica diferença quando comparado ao grupo SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ. (ANOVA e Tukey).(p<0,05).

Na tabela 5 podem ser analisadas as razões entre os picos absolutos. No grupo AZ houve redução significativa da relação mineral/matriz na superfície óssea quando comparado ao grupo SAL. O tratamento com ATV (PRÉ e PÓS) preveniu tal redução (p<0,05). Com relação à proporção HA carbonatada/ HA fosfatada do osso, no grupo que recebeu apenas AZ houve aumento significativo desse parâmetro enquanto a o tratamento com ATV (PRÉ e PÓS) preveniu este aumento (p<0,05). O padrão de comportamento HA carbonatada/amida I não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos.

**Tabela 05** – Comparação dos parâmetros da espectroscopia Raman dos substratos ósseos.

Relações	SAL	AZ	ATV – PRÉ	ATV – PÓS
Mineral/matriz	0,940±0,012	0,816±0,043*	0,923±0,006 <sup>#</sup>	0,938±0,008 <sup>#</sup>
HA carbonatada /HA fosfatada	1,028±0,006	1,115±0,026*	1,048±0,002 <sup>#</sup>	1,045±0,010 <sup>#</sup>
HA carbonatada /Amida I	0,966±0,010	0,923±0,018	0,973±0,003	0,980±0,010

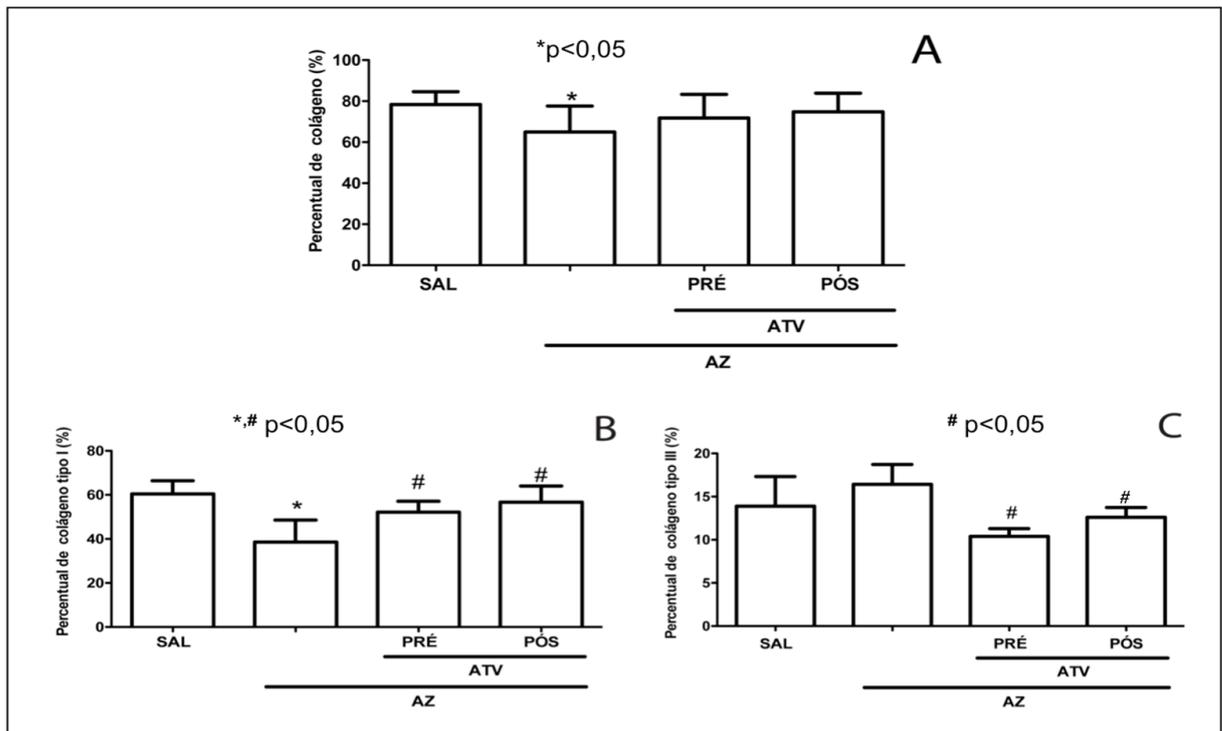
**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: SAL=Salina, AZ=Ácido Zoledrônico, ATV-PRÉ=Pré-operatório e ATV-PÓS=Pós-operatório. Valores são apresentados em médias ( $\pm$ desvio padrão) das variáveis estudadas. (\*) indica diferença quando comparado ao grupo SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ. (ANOVA e Tukey).(p<0,05).

### **5.7 Análise da quantidade e tipo de Colágeno por Coloração de *Picrossirius Red* sob filtro de luz polarizada.**

Usando a coloração de *Picrossirius red* foi possível observar uma redução significativa no percentual de colágeno no grupo AZ ( $63,08\% \pm 3,079$ ) (Fig. 14C) quando comparado a SAL ( $78,39\% \pm 1,467$ ) (Fig. 14A). O tratamento com ATV – PRÉ ( $71,78\% \pm 3,829$ ) (Fig. 14E) ou ATV – PÓS ( $74,78\% \pm 3,031$ ) (Fig. 14G) manteve o percentual de colágeno semelhante ao grupo SAL ( $78,39\% \pm 1,467$ ) (Fig. 13A). ( $p < 0,05$ ).

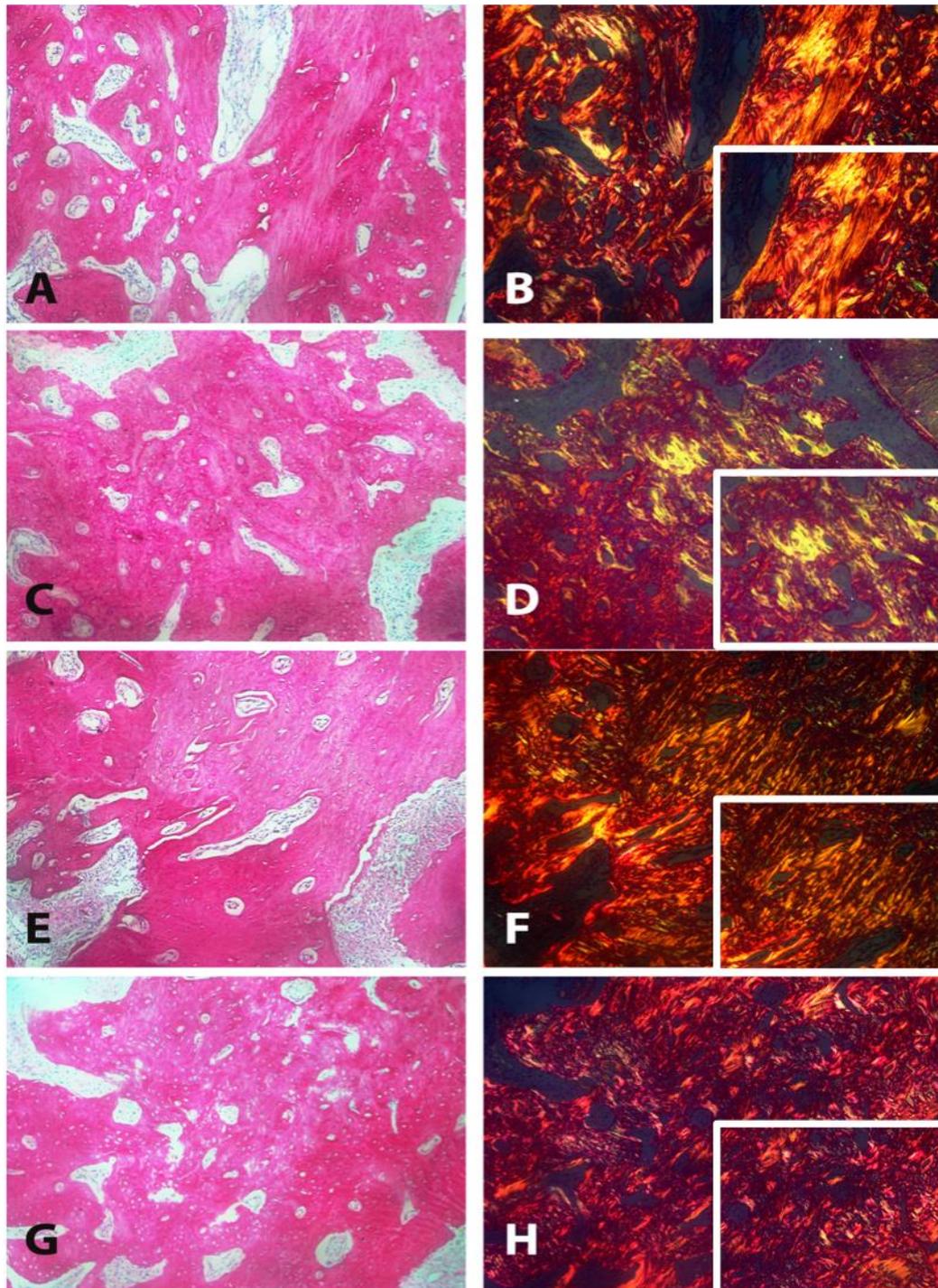
Sob luz polarizada as fibras colágenas do tecido ósseo dos animais do grupo AZ ( $38,58\% \pm 4,081$ ) mostraram redução da birrefringência amarelo-avermelhada (Fig. 13B; 14D), característica de colágeno tipo I, quando comparado aos do grupo SAL ( $60,44\% \pm 1,993$ ) (Fig. 14B). O tratamento com ATV – PRÉ ( $52,14\% \pm 2,224$ ) (Fig. 13F) ou ATV – PÓS ( $56,73\% \pm 3,255$ ) (Fig. 14G) causou aumento da birrefringência amarelo-avermelhada quando comparado a AZ ( $38,58\% \pm 4,081$ ) ( $p < 0,05$ ). Considerando a birrefringência verde-esbranquiçada, característica de colágeno tipo III, não houve diferença entre os grupos AZ ( $16,43\% \pm 0,8690$ ) e SAL ( $13,89\% \pm 1,148$ ) (Fig. 13C) No grupo tratado com ATV – PRÉ ( $10,40\% \pm 0,4$ ) e ATV – PÓS ( $12,60\% \pm 0,5099$ ) foi possível observar uma redução significativa desta birrefringência quando comparado a AZ ( $16,43\% \pm 0,8690$ ) ( $p < 0,05$ ).

**Figura 13** – Efeito da ATV no percentual de colágeno total, tipo I e tipo III da hemimaxila de ratas submetidas a OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Efeito da ATV no percentual de colágeno total (A), de colágeno tipo I (B) e colágeno tipo III (C) de animais submetidos a OMB. Barras representam média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. (\*) indica diferença quando comparado ao grupo SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ (ANOVA e Tukey) ( $p < 0,05$ ).

**Figura 14** – Fotomicrografia do efeito da ATV nas fibras colágenas da matriz óssea coradas com Picosírius Red e sob filtro de luz polarizada em modelo de OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia do efeito da ATV no preenchimento ósseo da hemimaxila de ratas que receberam SAL (A e B), AZ (C e D) ATV - PRÉ (E e F) ou ATV - PÓS (G e H) Coloração Picrosirius Red sem (imagens à esquerda) e após polarização de luz (à direita). (200x magnificação).

### 5.8 Análise Imuno-histoquímica para Wnt10b, $\beta$ -catenina, DKK-1 e Caspase-3

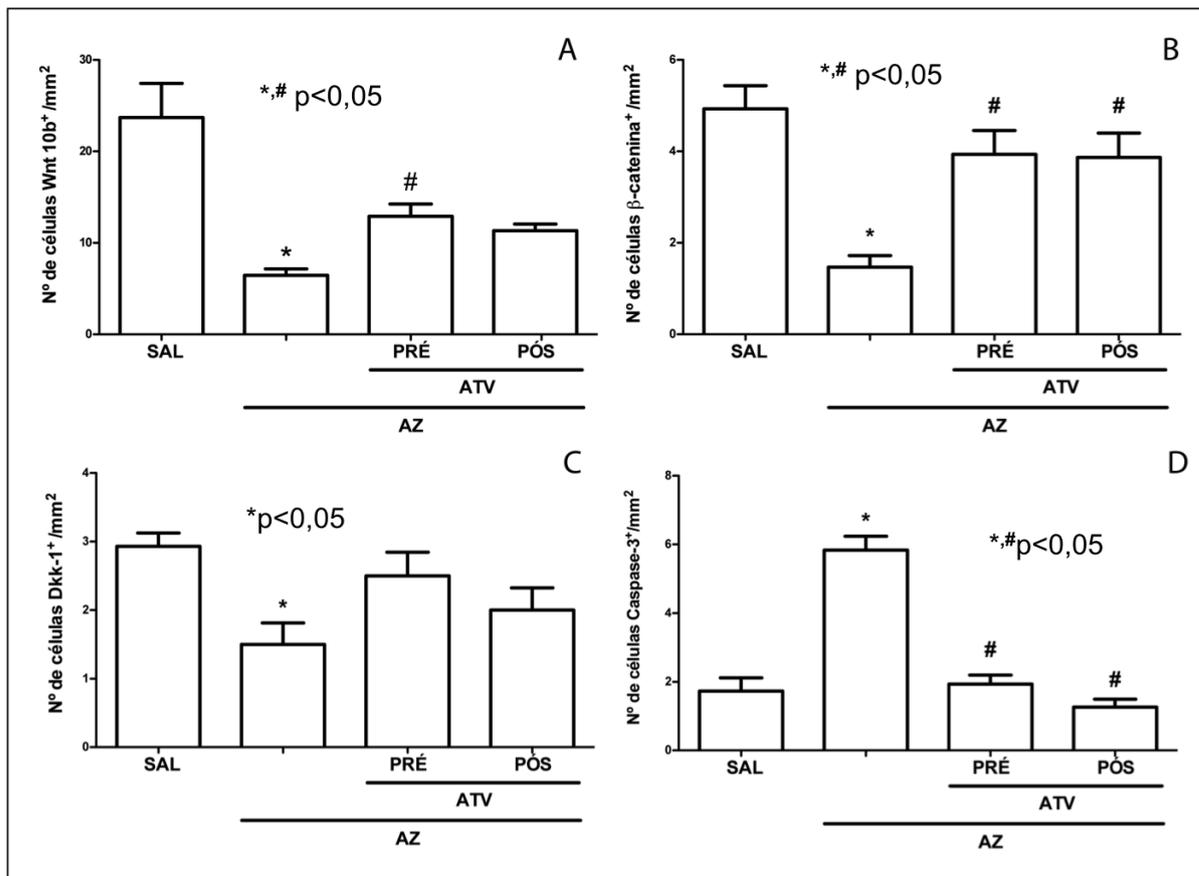
Em relação à via de sinalização Wnt, os animais do grupo AZ mostraram redução da quantidade de células imunopositivas para Wnt10b ( $6,455 \pm 2,535$  células positivas/ $\text{mm}^2$ ) quando comparado ao grupo SAL ( $23,75 \pm 2,535$ ); (Fig.15A e Fig.16A, 16B); ( $p < 0,05$ ). O tratamento com ATV-PRÉ preveniu a redução da imunomarcaçãode Wnt10b ( $12,91 \pm 2,535$ ) induzida pelo AZ de forma significativa (Fig. 14A, 15C). Não houve diferença significativa comparando o grupo ATV-POS (Fig. 16 C) e AZ.

O AZ (Fig. 17B) causou redução da imunoexpressão de  $\beta$ -catenina ( $1,467 \pm 0,667$ ) (Fig. 15B) ( $p > 0,05$ ), quando comparado a SAL ( $4,929 \pm 0,667$ );(Fig.17A) . O tratamento com ATV-PRÉ (Fig. 17C) e ATV-PÓS (Fig. 17D) preveniu tal redução ( $3,933 \pm 0,656$  e  $3,867 \pm 0,656$ , respectivamente) de forma significativa quando comparado ao grupo AZ.

Na quantificação da expressão de DKK-1 (Fig. 15C) foi possível observar uma redução significativa deste marcador no grupo AZ ( $1,500 \pm 0,4227$ ) (Fig. 18B) quando comparado ao grupo SAL ( $12,929 \pm 0,4227$ ) [Fig.18A)]. O tratamento com ATV-PRE (Fig. 18C) ou ATV-POS (Fig. 18D) não apresentou alteração significativa quando comparado a AZ.

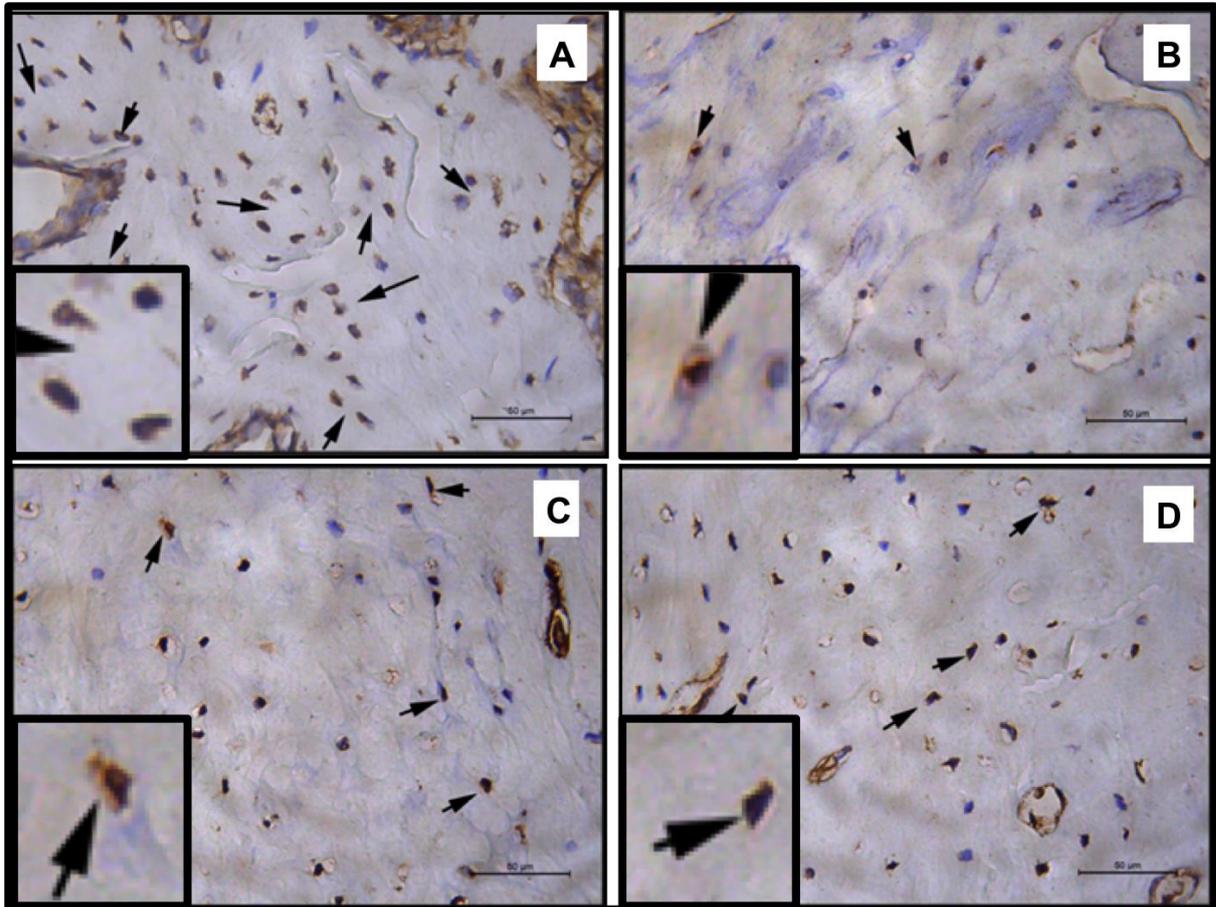
Quanto a Caspase 3 (Fig. 14D), os animais do grupo AZ mostraram aumento significativo desta enzima ( $5,833 \pm 0,471$ ) (Fig.18B), quando comparado ao SAL ( $1,733 \pm 0,471$ ) (Fig. 19A). O tratamento com ATV (ATV-PRÉ= $1,933 \pm 0,4712$  [Fig. 19C] e ATV-PÓS = $1,267 \pm 0,4712$  Fig. 19D]) reduziu de forma significativa a imunomarcação para Caspase 3 quando comparado a AZ.

**Figura 15** – Análise imunohistoquímica do efeito da ATV no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.



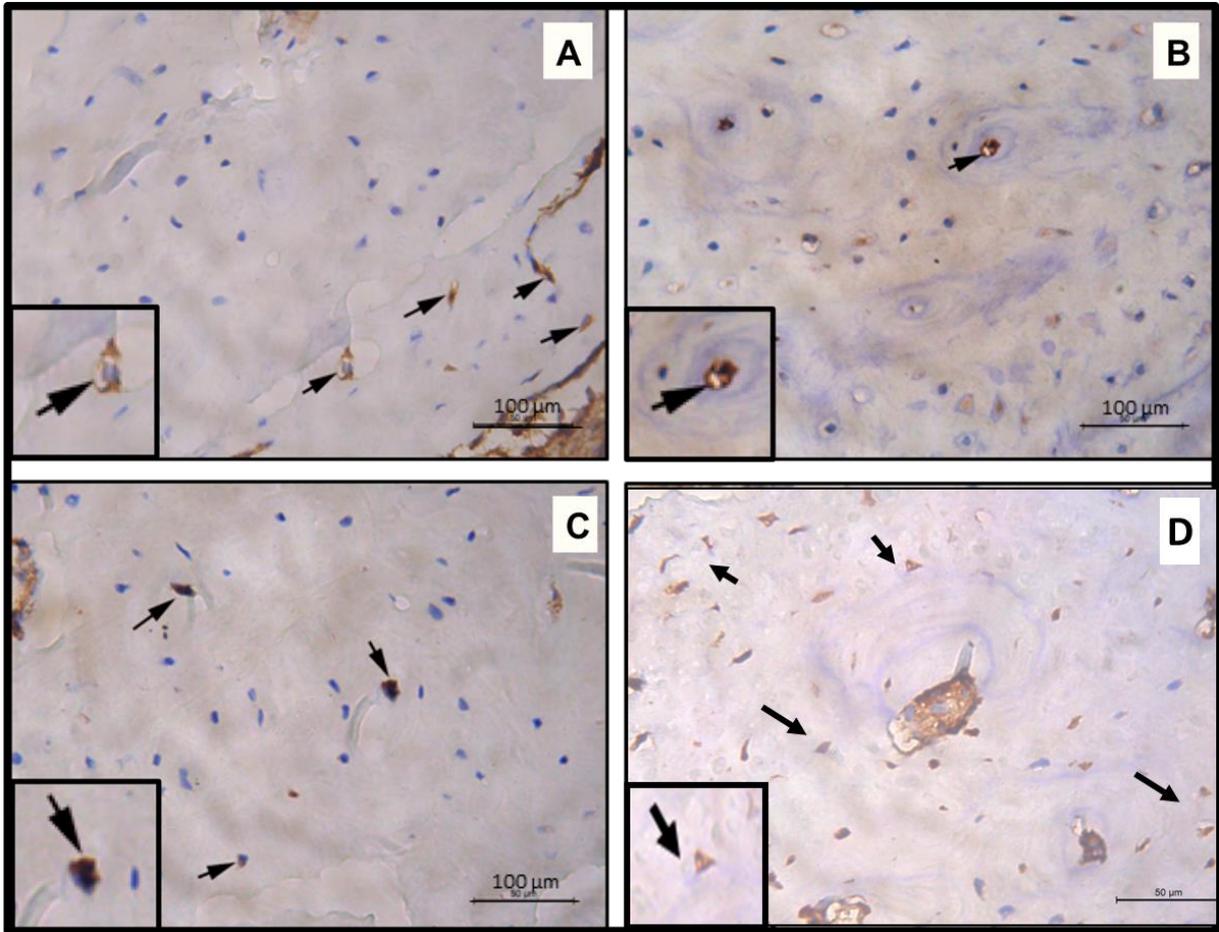
**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Efeito da ATV na imunomarcção para Wnt10b (A), Beta-catenina (B), DKK-1 (C) e Caspase-3 (D). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (\*) indica diferença quando comparado ao grupo SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ. (ANOVA e Tukey).(p<0,05).

**Figura 16** – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoposição de Wnt10b no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.



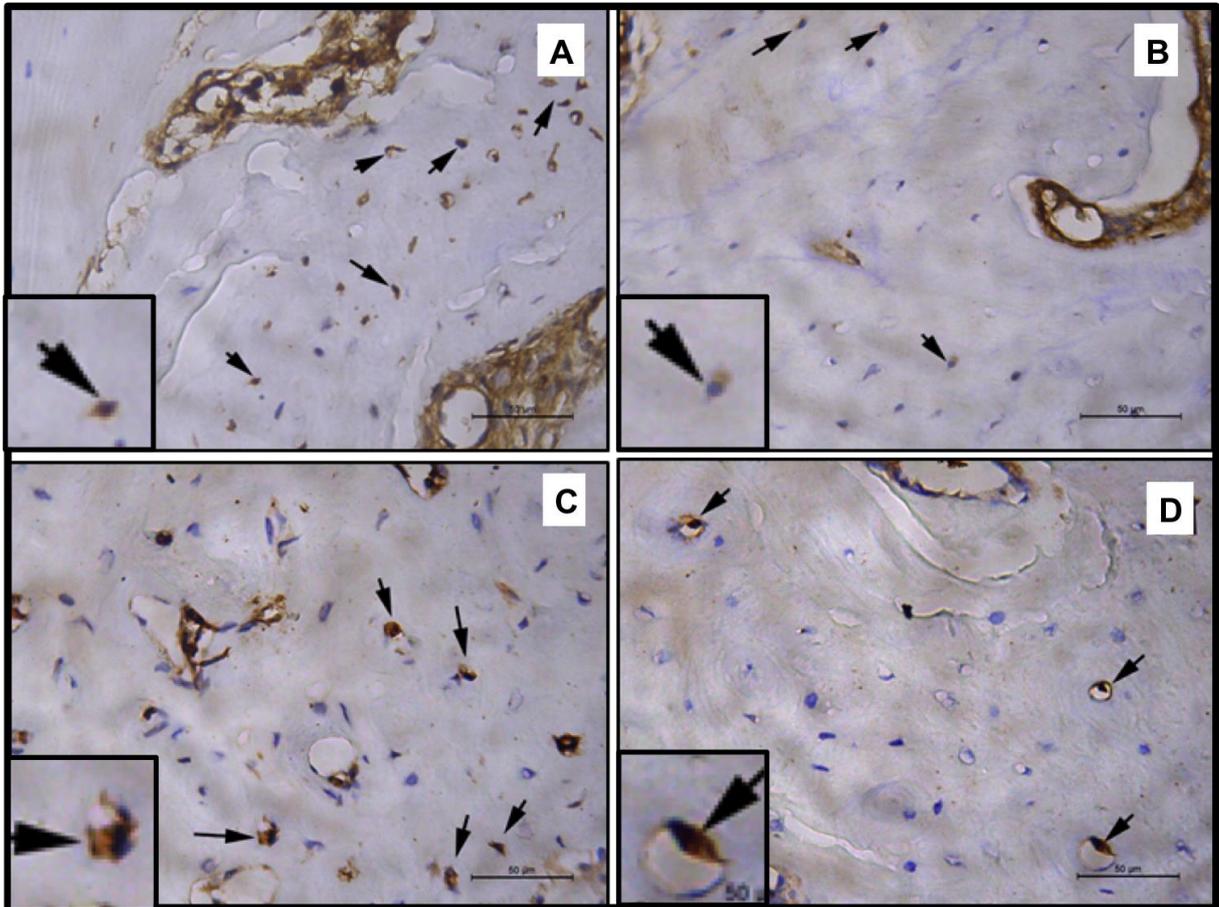
**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia mostrando o efeito da ATV na imunoposição de Wnt 10b na hemimaxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV - PRÉ (C) ou ATV - PÓS (D). Setas pretas indicam a imunomarcção. Barra – 100 µm. (400x magnificação).

**Figura 17** – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoposição de  $\beta$ -catenina no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.



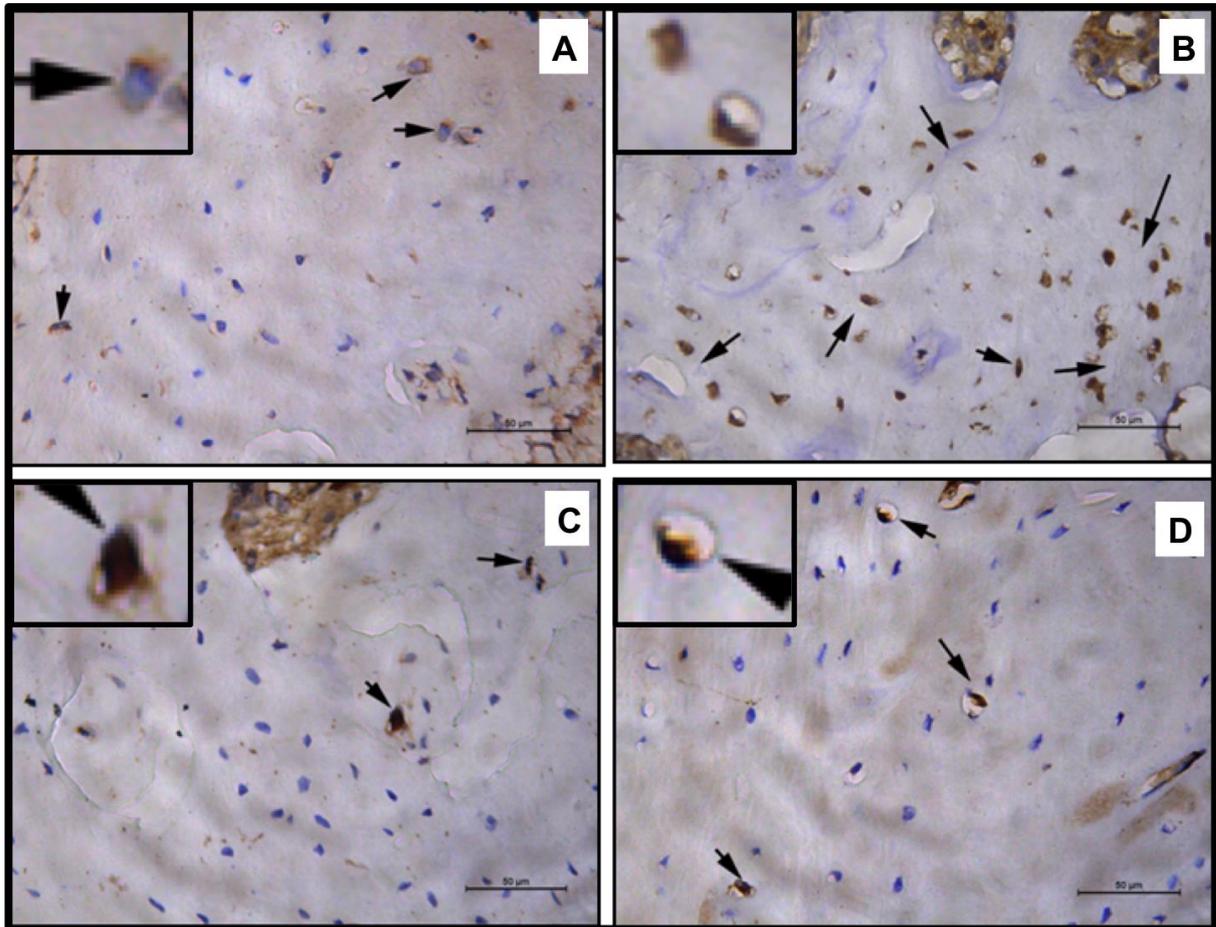
**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). **Legenda:** Fotomicrografia mostrando o efeito da ATV na imunoposição de  $\beta$ -catenina na hemimaxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV - PRÉ (C) ou ATV - PÓS (D). Setas pretas indicam a imunomarcação. Barra – 100 µm. (400x magnificação).

**Figura 18** – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoposição de DKK-1 no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia mostrando o efeito da ATV na imunoposição de DKK-1 na hemimaxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV - PRÉ (C) ou ATV - PÓS (D). Setas pretas indicam a imunomarcação. Barra – 100 µm. (400x magnificação).

**Figura 19** – Fotomicrografia do efeito da ATV na imunoposição de Caspase 3 no tecido ósseo de ratas submetidas a OMB.

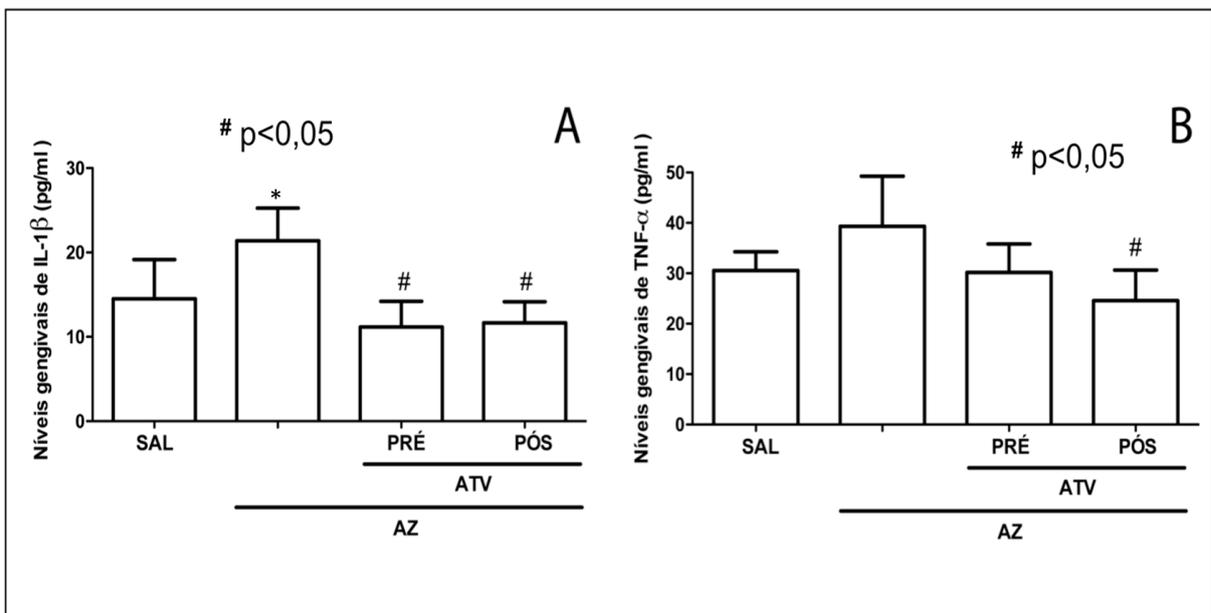


**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia mostrando o efeito da ATV na imunoposição de Caspase 3 na hemimaxila de ratas que receberam SAL (A), AZ (B) ATV - PRÉ (C) ou ATV - PÓS (D). Setas pretas indicam a imunomarcção. Barra – 100 µm. (400x magnificação).

### 5.9 Análise de Citocinas gengivais TNF – $\alpha$ e IL 1 $\beta$ .

Os animais tratados com AZ apresentaram tendência ao aumento dos níveis gengivais de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  quando comparado ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ) (Fig. 20). O tratamento com ATV - PRÉ preveniu o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  (Fig. 20A) quando comparado a AZ ( $p < 0,05$ ). Os animais que receberam ATV pós-operatória apresentaram redução significativa de IL-1 $\beta$  (Fig. 20A) e TNF- $\alpha$  (Fig. 20B).

**Figura 20** - Efeito da ATV nos níveis gengivais de IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$  de ratas submetidas a OMB.

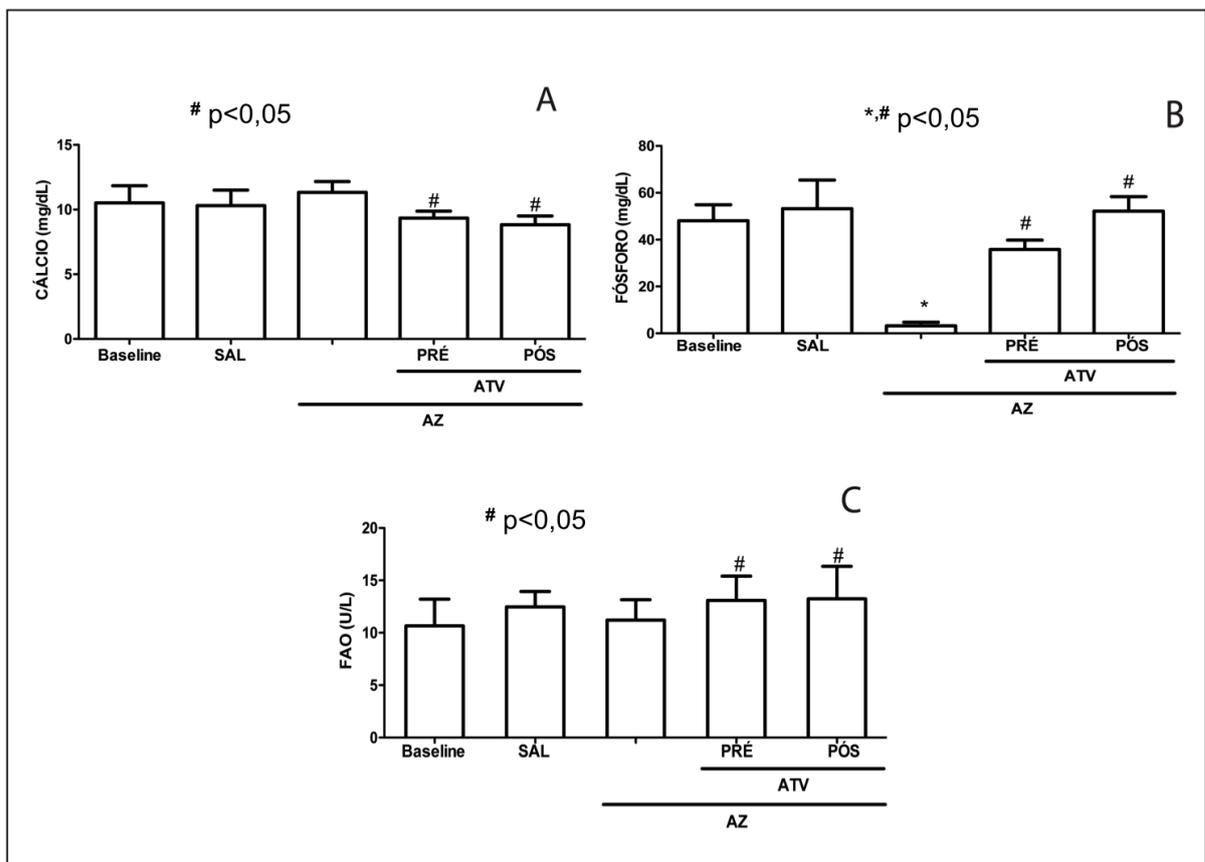


**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Efeito da ATV nos níveis gengivais de IL-1 $\beta$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) de animais submetidos a OMB. Barras representam média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. (\*) indica diferença quando comparado ao grupo SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ (ANOVA e Tukey) ( $p < 0,05$ ).

## 5.10 Análise dos níveis séricos de Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

Os ensaios bioquímicos (Fig. 21) evidenciaram que o AZ não alterou os níveis séricos de Cálcio (Fig. 21A) e FAO (Fig. 21C), mas causou redução nos níveis de Fósforo (Fig. 21B) ( $p < 0,05$ ) quando comparado a SAL e Baseline. O tratamento com ATV-PRÉ ou ATV-PÓS promoveu uma redução significativa dos níveis de Cálcio, aumento de Fósforo e de FAO quando comparado a AZ ( $p < 0,05$ )

**Figura 21** - Efeito da ATV nos níveis séricos de Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina de ratas submetidas a OMB.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Efeito da ATV nos níveis séricos de Cálcio (A), Fósforo (B) e Fosfatase Alcalina Óssea (C) de animais submetidos a OMB. Barras representam média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. (\*) indica diferença quando comparado ao grupo SAL. (#) indica diferença quando comprado ao grupo AZ (ANOVA e Tukey) ( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A osteonecrose de maxilares é caracterizada por uma área de osso exposto na região maxilo-facial que não cicatriza por um período de 8 semanas em paciente que faz uso de bisfosfonatos sem história prévia de radiação na região craniofacial (LANDESBURG et al., 2011; RUGGIERO et al., 2014). Nenhum mecanismo biológico foi mostrado estar especificamente associado a patogênese, estabelecimento e progressão da osteonecrose de maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB). Nesse contexto, o foco atual das pesquisas sobre OMB tem objetivado determinar possíveis mecanismos de ação, vias de sinalização além de abordagens terapêuticas, necessitando para isso o uso de modelos animais (SHARMA et al., 2013)

O uso de minipigs (PAUTKE et al., 2012), cães (ALLEN et al., 2011) e mais frequentemente ratos (PLOTKIN et al., 2011; ALLEN et al., 2011; ABTAHI et al., 2013; BARBA-RECREO et al., 2014,2015; CONTE-NETO et al., 2016; YANIK, et al., 2016; SILVA et al., 2016) tem sido bem descrito na literatura como meio para se estudar a OMB. No entanto, os protocolos para indução da OMB tem variado bastante quanto ao tipo, dose, posologia, tempo de uso e a via de administração do BF. Além disso, o uso de co-medicações, como por exemplo glicocorticóides, e diferentes métodos de intervenção cirúrgica, seja através da extração de dente único ou múltiplo na maxila ou mandíbula (ABTAHI et al., 2013; TSURUSHIMA et al., 2013; BARBA-RECREO et al., 2014; DAYISOYLU et al., 2014; SILVA et al., 2016) também são relatados. Portanto, para estudar os mecanismos envolvidos no estabelecimento desta doença e para avançar em pesquisas sobre novas estratégias preventivas e terapêuticas, faz-se necessário um protocolo confiável, reprodutível e padronizado para desenvolvimento da OMB.

Dos vários bisfosfonatos disponíveis no mercado o fármaco escolhido nesse estudo foi o ácido zoledrônico (AZ). O AZ é um agente potente, está associado ao maior risco de OMB, e tem sido amplamente utilizado no manejo de doenças ósseas na prática clínica (DODSON, 2009). Clinicamente, o AZ é aplicado por via endovenosa, mas neste estudo, considerando a segurança e facilidade de acesso, o AZ foi administrado por via intraperitoneal na dose de 0,1 mg/kg 03 vezes por semana por 09 semanas consecutivas o que corresponde a dose comumente aplicada no tratamento clínico de seres humanos (DODSON, 2009). Vale salientar

que, de acordo com o trabalho de Ottewell et al., (2009) a dose de 0,1 mg/kg/semana de AZ, por via intraperitoneal, durante 6 semanas, em ratos, é equivalente à dose humana de 4 mg.

Neste estudo, o modelo de OMB causou exposição óssea com presença de solução de continuidade da mucosa oral (LANDESBURG et al., 2008), associado a aumento do infiltrado inflamatório bem como nos níveis gengivais de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , (BARBA-RECREO et al., 2014; SILVA et al., 2016). Foi possível observar também que a administração de AZ aumentou a presença de sequestros ósseos, reduziu número de osteócitos viáveis, aumentando a quantidade de lacunas vazias no osso (SONIS et al., 2009; SENEL et al., 2010; BI et al., 2010; MARINO et al., 2012; BARBA-RECREO et al., 2014; DE MOLON et al., 2014). Além disso, foi visto uma mudança na composição do tecido ósseo, redução do percentual de colágeno do tipo I e alterações nos níveis séricos de marcadores do metabolismo ósseo nos animais que receberam AZ. Tais achados confirmam os descritos por Barba-Recreo (2014) e reproduzem as principais características da doença em humanos (RUGGIERO et al., 2014).

A fisiopatologia da OMB ainda pouco entendida, mas estudos relatam que a inflamação e a supressão da remodelação óssea são fatores etiológicos importantes para esta condição (RUGGIERO et al., 2014). Neste contexto abordagens farmacológicas que modulem estes fatores merecem destaque, justificando, portanto o uso da Atorvastatina (ATV). A ATV é um agente hipolipemiante, mas que apresenta efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios, antioxidantes e anabólicos ósseos (MUNDY et al., 1999; CALIXTO et al., 2011) já descritos por nosso grupo em trabalhos utilizando o modelo de periodontite induzida por ligadura (GOES et al., 2014, 2016; SOUSA et al., 2016). Vale ainda salientar que, à luz dos nossos conhecimentos, essa é a primeira vez em que o efeito da ATV é analisado no modelo de osteonecrose induzida por bisfosfonato em ratos.

Neste estudo, a ATV apresentou efeito benéfico, uma vez que preservou a integridade da mucosa oral, reduziu a intensidade do infiltrado inflamatório, assim como os níveis gengivais de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Estudos confirmam o efeito anti-inflamatório da ATV em tecido ósseo no modelo de periodontite induzida (GOES et al., 2014, 2016; SOUSA et al., 2016), que pode ser explicado pela inibição da expressão de marcadores pró-inflamatórios, tais como: molécula de adesão intercelular (ICAM), IL-6 (NAWAWI et al., 2003); proteína C-reativa (ARNAUD et al.,

2005; MOZAFFARIAN et al., 2005); fator nuclear de transcrição (NF- $\kappa$ B), IL-8 e seus receptores (CCR1 e CCR2), TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (WAEHRE et al., 2004; ARNAUD et al., 2005; MOZAFFARIAN et al., 2005; RIAD et al., 2007; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2013). Sabendo que estes mediadores, em especial TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , estão envolvidos na lesão óssea (ARAÚJO et al., 2017), podemos inferir que o efeito anti-inflamatório da ATV pode contribuir para a proteção óssea vista nesse estudo.

Adicionalmente a ATV também mostrou um importante efeito protetor do tecido ósseo. Na análise histomorfométrica, a ATV foi capaz de prevenir a osteonecrose, pois observou – se um aumentou no número de osteócitos viáveis, reduziu a quantidade de sequestros ósseos e reduziu o número de lacunas vazias quando comparado ao grupo AZ. Os osteócitos são células fundamentais para manutenção da homeostasia óssea, sua presença garante vitalidade do tecido ósseo (NOBLE et al., 2008; JOENG et al., 2017; UDA et al., 2017). Por isso, a morte de osteócitos é um sinal patognomônico de necrose óssea, e tem sido relatado que estresse oxidativo, decorrente do processo inflamatório, é uma das causas para a apoptose destas células. Um estudo recente mostrou que a Anidrase Carbônica III, uma enzima antioxidante, foi capaz de proteger osteócitos da apoptose mediada por estresse oxidativo (SHI et al., 2018). Neste contexto, apesar de pouco conhecimento sobre o efeito das estatinas nos osteócitos, nossos achados podem ser explicados considerando a ação antioxidante da ATV. A ATV regula a expressão e translocação transmembrana das subunidades de NADPH oxidase, Nox1 e Nox2 (KANAZAWA et al., 2007), Nox4 (YIN e al., 2012), enzimas conhecidamente oxidantes. Adicionalmente, a inibição *downstream* HMG-CoA redutase, enzima alvo no mecanismo de ação das estatinas, também parece exercer importante papel anti-inflamatório, reduzindo citocinas inflamatórias e anti-apoptótico nos osteócitos, pois a ativação de AMP quinase, conhecidamente inibidora da HMG-CoA redutase também evita a apoptose de osteócitos (TAKENO et al., 2015; FISSALTHALER e FLEMING, 2009). Assim pode-se inferir que a ATV exerça seu efeito anti-apoptótico através desses dois mecanismos.

A fim de confirmar o efeito protetor da ATV nos osteócitos foi realizada a análise da imunomarcagem de Caspase-3, que é conhecida por controlar os eventos citoplasmáticos e nucleares associados a apoptose *in vivo* (ZHENG et al., 1998), e pode ser utilizada como preditor de osteonecrose (GAO et al., 2012). Como visto neste estudo, os animais do grupo AZ mostraram aumento de Caspase-3,

confirmando que a apoptose foi regulada positivamente nos osteócitos (JIA et al., 2017). Além disso, foi observado que a ATV reduziu a imunomarcagem de Caspase-3, corroborando com outros achados (HAUSENLOY e YELLON, 2004; YANG et al., 2015). Contudo, vale salientar que os estudos que analisaram o efeito da ATV sobre Caspase-3 foram realizados em tecido nervoso de ratos (YANG et al., 2015; PRAJAPATI et al., 2017; SHAO et al., 2017) ou em modelos de microembolização em porcos (WANG et al. 2016). Não há relatos sobre o efeito da ATV sobre a expressão de Caspase-3 no tecido ósseo.

Considerando a via de sinalização Wnt, nossos resultados mostraram que o AZ reduz a expressão de Wnt10b,  $\beta$ -catenina nos osteócitos. Esta ausência de marcação pode ser explicada pelo fato de o AZ ser capaz de aumentar a expressão de antagonistas da via, como o SOST, em outras células, além de reduzir as conexões de junção gap, bloqueando assim a comunicação celular entre osteócitos e osteoblasto, o que leva ao bloqueio da via de sinalização Wnt (CUI et al., 2018), com consequente ausência de formação óssea (JOENG, 2017).

A imunomarcagem de Dkk-1 no grupo AZ também se mostrou reduzida. Dkk-1 é um antagonista da via Wnt (GUAÑABENS et al., 2014) e seu aumento leva a supressão da osteogênese e metabolismo ósseo (UEDA et al., 2014). Sabendo que Dkk-1 é expressa especialmente por osteócitos (PENG et al., 2006; BUTLER et al., 2010; ZHANG et al., 2012; GIFRE et al., 2013; ROSSINI et al., 2013; UEDA et al., 2015) a redução da imunomarcagem para Dkk-1 no grupo AZ pode estar relacionada a ausência de osteócitos viáveis, como visto nas análises histológicas deste estudo.

A Wnt10b se destaca como modulador positivo da formação óssea (BENNETT et al., 2007; STEVENS et al., 2010) enquanto a  $\beta$ -catenina parece estar envolvida na viabilidade e comunicação de osteócitos (KITASE et al., 2010; XIA et al., 2010). Neste estudo, o tratamento com ATV preveniu a redução da imunomarcagem de  $\beta$ -catenina e Wnt10b em osteócitos ocasionada pelo AZ. Uma explicação para este achado pode estar relacionada ao efeito anti-inflamatório da ATV (GOES et al., 2014, 2016), uma vez que, a alta concentração de citocinas inflamatórias estimula a expressão dos inibidores da via, Dkk-1 e Esclerostina (RAUNER et al., 2014) e em nosso estudo ATV promoveu uma redução de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Recentemente, um trabalho do nosso grupo mostrou que a ATV estimula a via Wnt osso, porém em osteoblastos (SOUSA et al., 2016). A partir dos resultados

deste estudo, podemos inferir que a via Wnt pode ser usada como um marcador da viabilidade de osteócitos.

Ainda sobre o efeito protetor ósseo exercido pela ATV, neste estudo, foi visto que o tratamento com Atorvastatina manteve a regularidade da superfície óssea, o que sugere menor perda de osso. Superfícies reabsorvidas ou em processo de reabsorção são caracterizadas por escavações decorrentes da ação de osteoclastos. Em superfícies onde ocorre a neoformação óssea não é possível visualizar tais escavações, apresentando - se com uma superfície mais preservada, com ausência de rugosidade. Nestas regiões o tecido podem ter sido mineralizadas sob os osteoblastos ou ser uma frente de mineralização na interface osso-matriz osteóide (BROMAGE et al., 1984). Assim, considerando as propriedade anabólicas ósseas da ATV (MUNDY et al., 1999; GOES et al., 2010, 2014, 2016; SOUSA et al., 2016), podemos explicar os achados da MEV, já que encontramos no grupo tratado com ATV um maior número de osteócitos viáveis, quando comparado ao grupo AZ.

A quantidade de tecido ósseo foi analisada por meio do percentual de preenchimento de tecido ósseo no alveólo. No entanto, mais do que analisar a quantidade de osso é de extrema importante a avaliação da composição e qualidade desse tecido. Para isso realizou-se a espectrometria Raman, que é um técnica de espectrometria vibracional usando a luz dispersada proveniente de íons e moléculas biológicas do tecido (MORRIS et al., 2011). A diferença do comprimento de onda entre a luz dispersada e incidente corresponde a vibração molecular e leva formação de bandas em frequências variáveis, características no espectro Raman (MORRIS et al., 2011). As variações de frequências servem como fonte importante de contraste para acessar a composição do tecido, como por exemplo nas substituições de carbonato em posições de fosfato. A matriz extracelular também pode provê outra fonte de contraste para avaliar composição do tecido ósseo (MORRIS et al., 2011).

Este estudo mostrou que, no espectro Raman, o AZ alterou todos os picos brutos relacionados a parte mineral (HA fosfatada), ao carbonato (HA carbonatada) e a matriz (Prolina, Fenilalanina, Amida I e Amida III). A ATV, por outro lado, foi capaz de prevenir o aumento Amida I e HA carbonatada. A banda de Amida I é um marcador de qualidade de colágeno (MORRIS et al., 2011). No tecido ósseo bandas de Amida I na posição de  $1678\text{ cm}^{-1}$  indicam a ruptura das ligações cruzadas de colágeno (CARDEN et al., 2003). As ligações cruzadas do colágeno são importantes para manter a qualidade e rigidez do tecido (BAILEY, PAUL e KNOTT, 1998;

DEPALLE et al., 2015). Por sua vez, a HA carbonatada na posição de  $1070\text{ cm}^{-1}$  no espectro Raman, mostra que o fosfato presente na estrutura da apatita está suscetível a substituição iônica, o que aumenta as propriedades bioreabsorvíveis desta HA (MORRIS et al., 2011). Já a banda HA fosfatada na posição  $959\text{ cm}^{-1}$  que pode fornecer informações valiosas sobre a composição química de ossos, porque ela varia com arquitetura óssea, idade e cristalinidade mineral.

Vale salientar, que as medidas absolutas das intensidades das bandas do Raman são difíceis, especialmente em um meio turvo com o osso. Por isso, a métrica Raman é geralmente analisada em intensidade das razões (MANDAIR, MORRIS, 2015). Neste estudo, o tratamento com ATV aumentou a razão mineral-matriz quando comparado a AZ. A razão mineral-matriz indica a quantidade de mineralização do tecido (McCREADIE et al., 2006). A ATV também reduziu a razão HA carbonatada/HA fosfatada que é indicativo de maior solubilidade fisiológica da estrutura da HA uma vez que o fosfato está sendo substituído pelo carbonato (ABOU et al., 2016). O tecido ósseo submetido tanto a AZ isoladamente quando a ATV não mostrou alteração na razão HA carbonatada/Amida I, confirmando a ausência de remodelação (McCREADIE et al., 2006).

Por ocasião da análise histológica, foi feita a coloração para Picrosirius e análise sob luz polarizada, para determinação do quantidade de colágeno total e diferencial (Tipo I e III) no tecido ósseo. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular (CUTTLE et al. 2005) e atua como arcabouço estrutural no tecidos durante o processo de cicatrização modulando a proliferação e migração celular (TRACY et al. 2016). O colágeno tipo III é um importante componente da matriz extracelular, predominando nas fases iniciais do processo de cicatrização, sendo sintetizado por fibroblastos no tecido de granulação (OLCZYK et al., 2014). Com a maturação e fechamento da ferida, o colágeno tipo III é degradado e a síntese do colágeno tipo I aumenta (OLCZYK et al., 2014). Doenças crônicas inflamatórias tem sido relacionadas ao aumento da expressão de colágeno tipo III (PAUSCHINGER et al. 1998; HIROTA et al., 2003). Adicionalmente, Soundia et al. (2017) mostraram que a desorganização da rede colágeno com predominância do colágeno tipo III no osso necrótico, está associada a imunomarcagem positiva para metaloproteinases de matriz (MMP) -9 e -13. Assim, a presença da inflamação e osteonecrose podem contribuir para o leve aumento de colágeno tipo III visto nos animais do grupo AZ e redução do colágeno tipo I, podendo ser causada pelo retardo na cicatrização

causada pelo uso do bisfosfonato, uma vez que o colágeno tipo I é presente em tecido mais maduro (TRACY et al. 2016).

O tratamento com ATV, por sua vez, reduziu a degradação do percentual de colágeno tipo I, corroborando os resultados observados no espectro Raman para banda de Amida I vistos nesse estudo. Conhecendo o papel fundamental da inflamação na arquitetura e organização do colágeno, o efeito, principalmente, anti-inflamatório da ATV pode ter contribuído explicar nosso achado. Apenas um estudo mostra o efeito positivo das estatinas em colágeno tipo I (ZHANG et al., 2014), sendo a sinvastatina a estatina utilizada. No entanto, a sinvastatina apresenta menor potência quando comparado a ATV (IZUMO et al., 2001) por esta tratar-se de uma estatina lipofílica. Não existem relatos na literatura mostrando o efeito da ATV sobre colágeno tipo I em modelos de cicatrização, sendo o nosso estudo o primeiro a verificar o efeito da ATV sobre as fibras colágenas em tecido ósseo no modelo de OMB.

Ainda, para avaliação da remodelação óssea, como método de diagnóstico, no monitoramento de doenças ósseas metabólicas, bem como no monitoramento da terapia com fármacos que possam alterar o funcionamento de células ósseas (SEIBEL et al., 1989; DELMAS et al., 1993; CHRISTGAU et al., 1998) marcadores bioquímicos séricos tais como fosfatase alcalina óssea (FAO), cálcio (Ca) e fósforo (P) também podem ser utilizados (CHAVASSIEUX et al., 2001).

A FAO é considerada um marcador específico de formação óssea (KELES et al., 2005), trata-se de uma enzima produzida pelos osteoblastos e essencial para mineralização óssea (BREUR et al., 2004; WITTKOWSKE et al. 2016). O aumento nos níveis séricos dessa enzima foi observado após a administração de ATV (KAJINAMI et al., 2003; MAJIMA et al., 2007; DU et al., 2011; GOES et al., 2016), corroborando com nossos achados em que FAO teve um aumento significativo tanto no grupo ATV-PRÉ quanto no ATV-PÓS. Foi relatado que o ATV pode ou não aumentar ligeiramente os níveis séricos de FAO (MAJIMA et al., 2007; DU et al., 2011), pela estimulação da proteína morfogenética óssea (BMP) -2 e pela indução da diferenciação osteoblástica (MUNDY et al., 1999).

O tecido ósseo é o maior depósito de íons como cálcio e fósforo (OLIVEIRA et al., 2005) e os processos de formação e reabsorção óssea são os maiores reguladores dos níveis destes íons na circulação (AMADEI et al., 2006). Neste estudo, foi observado que o modelo de OMB não modificou os níveis de Ca, mas

reduziu de forma significativa os níveis séricos de P. Um trabalho publicado por Fidan et al. (2012) e Chew e Clark (2017) confirmam nossos achados em relação aos níveis séricos de P, e afirmam que esta redução está relacionada ao baixo *turnover* ósseo. Desta forma, o aumento nos níveis de P após o uso de ATV reflete o efeito benéfico desta estatina no metabolismo ósseo, de acordo com El-Nabarawi et al. (2017) que demonstraram a capacidade da atorvastatina em regular os níveis dos marcadores metabólicos ósseos.

## 7 CONCLUSÃO

Em suma, os achados deste estudo mostraram que a ATV apresentou efeito anti-inflamatório, com preservação do recobrimento da mucosa oral redução da intensidade do infiltrado inflamatório e dos níveis gengivais de TNF $\alpha$  e IL1- $\beta$ . O tratamento com ATV também exerceu efeito protetor ósseo, aumentando o número de osteócitos viáveis, com redução de lacunas vazias aliada a redução da imunexpressão para Caspase-3. Tal efeito parece estar relacionado a via Wnt pois a ATV aumentou a imunexpressão de Wnt 10b e  $\beta$ -catenina. Além disso, a ATV manteve a regularidade na superfície óssea, aumentou o percentual de preenchimento de tecido ósseo e melhorou a qualidade deste tecido. A ATV também preservou as fibras colágenas, em especial as fibras colágenas do tipo I, características de um tecido organizado e maduro. Assim, considerando os limites desse estudo, sugerimos que a ATV deve ser futuramente investigada como uma ferramenta potencial para melhoria das características morfofisiológicas do tecido ósseo na prevenção da OMB em humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU, N.E.A., et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. **Int J Nanomedicine.**, v.11, n.01, p.4743-4763, 2016.

ABTAHI, J., et al. 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., et al. 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.

AKKUS, O.; ADAR, F.; SCHAFFLER, M.B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone.**, v.34, n.1, p. 443–453, 2004.

ALLEN, M. R. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: Moving from the bedside to the bench. **Cells Tissues Organs**, v. 189, n. 1, p. 289-294, 2008.

ALLEN, M. R.; BURR, D. B. The Pathogenesis of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: So Many Hypotheses, So Few Data. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5, p. 61-70, 2009. Suplemento.

ALLEN, M.R. The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue proproetoes, end extraction healing. **Odontology**, v.99, n.1, p. 8-17, 2011.

AMADEI, S.U. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 1, p. 5-12, Feb. 2006

American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS). Position paper on bisphosphonate: related osteonecrosis of the jaws. **J MaxillofacSurg**, v.65, n. 3, p.369-76, 2007.

ANBINDER, A.L.; QUIRINO, M.R.S.; ROCHA, R.F. Statins and bone tissue: a literature review. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.35, n.4, p.239- 246, 2006.

ANDRADE, F. R., et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, n. 106, v. 4, p. 548-555, 2008.

ANDRADE, T.A.; IYER, A.; DAS, P.K. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res.** v. 44, n.01, p.1036 - 1047, 2011.

ARAÚJO - JUNIOR, et al. Atorvastatin Decreases Bone Loss, Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Periodontitis. **PLoS ONE**, v.8, n.10, e75322, 2013.

ARÊAS, E.P.G.; KAWANO, Y. Aplicações de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo conformacional de proteínas. **Química Nova**. v.14, n.1, p. 31-43, 1991.

ARNAUD, C., et al. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 6, p. 1231-1236, Jun. 2005.

AYDOGAN, A., et al. Immunohistochemical expression of caspase-3, caspase-5, caspase-7 and apoptotic proteaseactivating 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.

ARUWAJOYE, O.O.; KIM, H. K.W.; ASWATH, P.B. Bone Apatite Composition of Necrotic Trabecular Bone in the Femoral Head of Immature Piglets. **Calcified Tissue International**, v.96, n.4, p.324–334, 2015

BAHR, M.; WILKINSON, J. H. Urea as a selective inhibitor of human tissue alkaline phosphatases. **Clin Chim Acta**, v. 17, p. 367-370, 1967.

BAILEY, A.J.; PAUL, R.G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mech Ageing Dev.**, v.106, n.1-2, p.:1–56, 1998.

BARBA-RECREO, P. et al. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 7, p. 1161-1168, 2015.

BARBA-RECREO, P. et al. Zoledronic acid - Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 6, p. 744-750, 2014.

BARASCUK, N. et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen — A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 10-11, p. 900–906, 2011.

BARON, R. e KNEISSEL, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 179-192, 2013.

BELLIDO, T. Osteocytes and their role in bone remodeling. **Actualizaciones en Osteología**, v. 9, n.1, p.56–64, 2013.

BENNETT, C.N.; OUYANG, H.; MA, Y.L. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res.**, v.22, p.1924–1932, 2007.

BENFORD, H. L., et al. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, v.28, n. 5, p. 465-73, 2001.

BI, Y., et al. Bisphosphonates Cause Osteonecrosis of the Jaw-Like Disease in Mice. *The American Journal of Pathology*, v.177,n.1,p: 280-290, 2010.

BODINE, P. V.; KOMM, B. S. Wnt signaling and osteoblastogenesis. **Rev Endocr Metab Disord.**, v. 1-2, n. 7, p. 33-39, 2006.

BONEWALD, L.F.; JOHNSON, M.L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v.42, n.4, p.606–615, 2008.

BONEWALD, L. F. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. **Annals of the New York Academy of Scienc.**, v. 1116, p. 281-290, 2007.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Res.**, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.

BREUR, G.J., et al. Markers of bone metabolism in dog breeds of different size. **Research Veterinary Scienc.**, v.76n.1, p. 53-55, 2004.

BROMAGE, T.G. Interpretation of scanning electron microscopic images of abraded forming bone surfaces. *Am J Phys Anthropol.*,v.64,n.2, p.161-78, 1984.

BUCKWALTER, J. A., et al. Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. **Instructional Course Lectur.**, v. 45, p. 371– 386, 1996.

BUTLER, J.S., et al. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation. **BMC Musculoskeletal Disord.**, v.11, p.210, 2010.

CALIXTO, J.C., et al. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. **J Craniomaxillofac Surg.**, v.39, n.3, p. 215-220, 2011.

CAMPISI, G., et al. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. **Future Oncol.**, v.10, n.2, p.257-275, 2014.

CARDEN, A., et al. Ultrastructural changes accompanying the mechanical deformation of bone tissue: a Raman imaging study. **Calcif Tissue Int.**, v.72, n.1,

p.166–175, 2003

CARVALHO, H. F.; TABOGA, S. B.; FELISBINO, S. L. Fluorescence and confocal laser scanning microscopy of HeE stained sections for the study of elastic fibers in skin and in some skin disorders. **Braz J Morphol Sci.**, v. 16, n. 1, p. 97-103, 1999.

CARVALHO, F.S.R., et al. Physicochemical and rheological characterization of different Carnoy's solutions applied in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Raman Spectroscopy** , v. 48, n.01, p. 1375-1384, 2017.

CHANG, M.C. e TANAKA, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v.23, n.24, p. 4811-4818, 2002.

CHAVASSIEUX, P., et al. Effects of a new selective estrogen receptor modulator (Mdl 103,323) on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and densitometric study. **Journal Bone Mineral Res.**, v.16, n.1, p. 89-96, 2001.

CHEW, C.K.; CLARKE, B.L. Biochemical Testing Relevant to Bone. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v.46, n.3, p.649-667, 2017.

CHONG, Z. Z.; MAIESE, K. Vital Elements of the Wnt-Frizzled Signaling Pathway in the Nervous System. **Current Neurovascular Res.**, v.2, n.4, p.331–340, 2005.

CHRISTGAU, S., et al. Clinical evaluation of the Serum CroosLaps One Step Elisa, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. **Clinical Chemistry**, v.44, n.1, p. 2290-2300, 1998.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.3, n. 3, p. 131–139, 2008.

CONTE-NETO, N., et al. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rheumatoid arthritis patients: a critical discussion and two case reports. **Head & Face Medicine**, v. 7, n.0, p.1-7, 2011.

CONTE NETO, N. et al. Experimental osteonecrosis: development of a model in rodents administered alendronate. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2016.

COSTA-SCHARPLATZ M. et al. Cost-effectiveness analysis of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin from a Canadian health system perspective. **Clin. Ther.**, v. 30, n. 7, p. 1345-1357, 2008.

COUDROY, R. et al. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibroproliferative

therapy? *Intensive care medicine*, v. 41, n. 6, p. 1159–60, jun. 2015.

CUI, P., et al. Zoledronate promotes bone formation by blocking osteocyte-osteoblast communication during bone defect healing. ***Histol Histopathol.***, v.33, n.1, p.89-99, 2018.

CUTTLE, L., et al. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picrosirius-polarization. ***Wound Repair Regen.***, v.13, n.2, p.198–204, 2005.

DALCICO R. et al. Mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. ***J Periodontol***, v. 84, n. 8, p. 1145-1157, ago. 2013.

DATTA, H. K., et al. The cell biology of bone metabolism, ***Journal of Clinical Pathology***, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008.

DELMAS, P.D., et al. Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. ***Journal Bone Mineral Research*** , v.8, n.1, p. 643-648, 1993.

DE MOLON, R., et al. Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive treatment: A novel ONJ mouse model. ***Bone***, v. 68, n.1, p.11 – 19, 2014.

DELGADO-CALLE, J.; BELLIDO, T. (2015). Osteocytes and Skeletal Pathophysiology. ***Current Molecular Biology Reports*** v.1, n.4, p. 157–167, 2015.

DEPALLE, B., et al. Large Deformation Mechanisms, Plasticity, and Failure of an Individual Collagen Fibril With Different Mineral Content. ***Journal of Bone and Mineral Research***, v.31, n.2, p. 380–390, 2016.

DIEGO, R., et al. 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.

DODSON, T.B. The Frequency of Medication-related Osteonecrosis of the Jaw and its Associated Risk Factors. ***Oral Maxillofac Surg Clin North Am.***, v. 27, n.4, p.509-516, 2015.

DONNELLY, E., et al. Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. ***J Biomed Mater Res A.***, v.92, n.1, p.1048–1056, 2010.

DOWNEY, P.A.; SIEGEL, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. ***Physical Therapy***, v. 86, n. 1, p. 77–91, 2006.

DU, Z.; CHEN, J.; YAN, F.; DOAN, N.; IVANOVSKI, S.; XIAO, Y. Serum bone formation marker correlation with improved osseointegration in osteoporotic rats treated with simvastatin. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 4, pp. 422-427, apr. 2011.

ELAD, S. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: clinical correlations with computerized tomography presentation. **Clinical Oral Investigations**, v.14, n. 1, p. 43, 2010.

EI-KHASSAWNA, T. et al. Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis. **The American Journal of Pathology**, v.06, p.1-15, 2017.

EL-NABARAWI, Nagla; EL-WAKD, M.; SALEM, M. Atorvastatin, a double weapon in osteoporosis treatment: an experimental and clinical study. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 1383-1391, 2017.

ENDO, A., et al. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Eur J Biochem**, v. 77, n. 1, pp. 3136, jul. 1977.

ESCOBAR-GÓMEZ, F.; JÓDAR, E.; HAWKINS, F. Receptor Wnt: Fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. **Revista Espanola de Enfermedades Metabolicas Oseas**, v.18,n.2, p. 39-44, 2009.

EVERTS,V.; DELAISSI´E,J. M.; KORPER et al.,W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation, **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 1, p. 77–90, 2002.

FALONI, A. P. S. Morte celular de osteoclastos do osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno. 2006. 79 f.Tese (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

FENTOĞLU, O., et al. Proinflammatory cytokine levels in hyperlipidemic patients with periodontitis after periodontal treatment. **Oral Dis**, v.18, n.01, p.299-306, 2012.

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.

FERNANDEZ – AVILA, D.G. Tratamiento farmacológico de la osteoporosis postmenopáusica. **Rev.Colomb.Reumatol.**, Bogotá, v.17, n.2, p.96-110, Apr. 2010.

FERREIRA JÚNIOR, A. E. C. Avaliação da influência da terapia por infliximabe na cicatrização óssea de alvéolos dentários pós-exodontia em ratos. 2016. 81

f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2016.

FICARRA, G.; BENINATI, F. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an update on clinical, pathological and management aspects. **Head Neck Pathol.**, v.1, n.2, p.132-40, 2007.

FIDAN, E., et al. Effects of zoledronic acid and ibandronic acid on renal functions and calcium, phosphorus and alkaline phosphatase levels in breast cancer patients with bone metastases: a retrospective analysis. **Contemp Oncol (Pozn)**. v.16, n.2, p. 176-178, 2012.

FISHMAN W. H.; SIE H. G. Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L homoarginine. **Enzymologia**, v. 41, 141-167, 1971.

FISLTHALER, B.; FLEMING, I. Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. **Circ Res.**, v.105, p.114-127, 2009.

FLEISHER, K.E.; WELCH, G.; KOTTAL, S.; CRAIG, R.G; SAXENA, D.; GLICKMAN, R.S. Predicting risk for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: CTX versus radiographic markers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**,v.110, n.4, p.509-516, 2010.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research Internacional**, v. 2015,n.01, p.1-17, 2015.

FOLLET, H. et al. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. **Bone**, v. 40, n. 4, p. 1172-1177, 2007.

FOURNIER, P. et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated. **Cancer Res**, v. 62, n. 22, p. 6538-6544, 15 nov. 2002.

GAO, Y.S., et al. Caspase-3 may be employed as an early predictor for fracture-induced osteonecrosis of the femoral head in a canine model. **Mol Med Rep.**,v.6, n.3, p.611-614,2012.

GARNETT, W. R. Interactions with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. **Am J Health Syst Pharm**, v. 52, n. 15, pp. 1639-1645, aug. 1995.

GEGLER, A. et al. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão da literatura e relato de dois casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 1, n. 52, p. 25-31, 2005.

GIFRE, L.; RUIZ-GASPA, S.; MONEGAL, A.; NOMDEDEU, B.; FILELLA, X.; GUAÑABENS, N.; PERIS, P. Effect of glucocorticoid treatment on Wnt signaling antagonists (sclerostin and Dkk-1) and their relationship with bone turnover. **Bone**, v.57, p.272–276, 2013.

GOES, P. et al. Anti-inflammatory and Anti-resorptive Effects of Atorvastatin on Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 3, p. 267-272, 2016.

GOES, P. et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 1, p. 45-54, 2014.

GONÇALVES, D. C. et al. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, p. 442–453, 2014.

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**. v. 3, p. 1-15, 2011.

GUAÑABENS, N.; GIFRE, L.; PERIS, P. The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep.**, v.12, n.1, p.90-97, 2014.

HALLEEN, J.M. et al. 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., et al. 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.

HARVEY, H. A.; CREAM, L. V. R. Biology of bone metastases: causes and consequence. *Clinical Breast Cancer*, v. 7, suppl 1, s7-s13, 2007.

HAYNES, D. R. Bone lysis and Inflammation. **Inflamm. Res.**, v.53, n.11, p.596-600, 2004.

HAUSENLOY, D.J.; YELLON, D.M. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway. **Cardiovasc Res.**, v.61, n.3, p.448-460, 2004.

HIKITA, H., et al. 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.

HIROTA, A., et al. Collagen of chronically inflamed skin is over-modified and upregulates secretion of matrix metalloproteinase 2 and matrix-degrading enzymes by endothelial cells and fibroblasts. **J Invest Dermatol**. v.121, n.6, p.1317–1325, 2003.

HOFF, A.O., et al. Frequency and Risk Factors Associated With Osteonecrosis of the Jaw in Cancer Patients Treated With Intravenous Bisphosphonates. **Journal Of Bone And Mineral Research**, Hoboken, v.23, n. 6, p. 826-36, 2008.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 29, p. 1349-53, 1981.

HUGHES, A. et al. A comparison between the effects of hydrophobic and hydrophilic statins on osteoclast function in vitro and ovariectomy-induced bone loss in vivo. **Calcified Tissue International**, v. 81, n. 5, p. 403-413, 2007.

HUJA S. S., et al. 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. Doença óssea em mieloma múltiplo. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.29, p.60-66, 2007.

IKEBE, T. Pathophysiology of BRONJ: drug-related osteoclastic disease of the jaw. **Oral Sci Int**, v.10, n.01, p.1-8, 2013.

ISTVAN, E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. **Atheroscler Suppl**, v. 4, n. 1, pp. 3-8, mar. 2003.

ITO, A., et al. Solubility product of OH-carbonated hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res**, v.36, n.1, p.522–528, 1997.

IZUMO, N., et al. Lipophilic statins can be osteogenic by promoting osteoblastic calcification in a Cbfa1- and BMP-2-independent manner. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.23, p. 389-394, 2001.

JIA, Y.B., et al. Inhibitory effects of vitamin E on osteocyte apoptosis and DNA oxidative damage in bone marrow hemopoietic cells at early stage of steroid-induced femoral head necrosis. **Mol Med Rep**, v.15, n.4, p.1585-1592, 2017.

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

JOENG, K. S., et al. Osteocyte-specific WNT1 regulates osteoblast function during bone homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.127, n.7, p. 2678–2688, 2017.

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

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picro sirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v.11, n.1, p. 447–455, 1979.

KAJI, H., et al. Statins modulate the levels of osteoprotegerin/receptor activator of NF kappa B ligand mRNA in mouse bone-cell cultures. **Horm Metab Res**, v.37, n.01, p.589–592, 2011.

KAJINAMI, K; TAKEKOSHI, N.; SAITO, Y. Pitavastatin: efficacy and safety profiles of a novel synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. **Cardiovasc Drug Rev.**, v.21, n.3, p.199-215, 2003.

KANAZAWA, I., et al. Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **BMC Cell Biol.**;v.8, n.51, p.1-12,2007.

KAPUR, N.K.; MUSUNURU, K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. **Vasc. Health Risk Manag.**, v. 4, n. 2, p. 341-353, 2008.

KARSENTY, G.; KRONENBERG, H. M.; SETTEMBRE, C. Genetic control of bone formation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 25, p. 629–648, 2009.

KELES, G.C., et al. Determination of systemically & locally induced periodontal defects in rats. **Indian J Med Res**, v. 121, n.01, p.176-184, 2005.

KESKINRUZGAR, A., et al. Histopathological effects of TRPD in medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.74, n01, p.68e78, 2016.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Zoledronic acid in combination with alfacalcidol has additive effects on trabecular microarchitecture and mechanical properties in osteopenic ovariectomized rats. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 19, n. 4, p. 646-656, 2014.

KHAN, A.A., et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. **J Bone Miner Res**, v.30, n.01,p.3-23,2015.

KHOSLA, S., et al. 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, 2008.

KIENER, P., et al. Effectiveness of maxillary overdentures supported by implants: maintenance and prosthetic complications. **Int J Prosthodont.**, v.14, n.2, p.133-140, 2001.

KIERSZENBAUM, B. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. 3º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 720p.

KILKENNY C. et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. **J Pharmacol Pharmacother.**, v. 1, n. 2, p. 94-99, 2010.

KITASE, Y., et al. Mechanical induction of PGE2 in osteocytes blocks glucocorticoid-induced apoptosis through both the beta-catenin and PKA pathways. **J Bone Miner Res.**, v.25, p.2657–2668, 2010.

KOBAYASHI, Y. et al. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. **J Biochem.**, v. 159, n. 4, p.387-392, 2016.

KOCH, F. P. et al. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in. **Clin Oral Investig**, v. 16, n. 1, p. 79-86, fev. 2012.

KOMORI, T. Cell death in Chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.2045, p.4-17, 2016.

KOURKOUMELIS, N.; TZAPHLIDOU, M. Spectroscopic Assessment of Normal Cortical Bone: Differences in Relation to Bone Site and Sex. **TheScientificWorldJOURNAL**, v.10, n.01, p. 402-412, 2010.

KRONMMAN L. et al. Statins therapy. Not Just used to lower cholesterol? **Crit. Care Nurs. Q.**, v. 30, n. 2, p. 154-160, 2007.

KUBOTA, T.; MICHIGAMI, T.; OZONO, K. Wnt signaling in bone metabolism. **J Bone Miner Metab.**, v. 27, n. 3, p. 265-271, 2009.

LACEY, D.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell.**, v.93, n.2, p. 165-176, 1998.

LANDESBURG, R., et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. **J Oral Maxillofac Surg**, v.66, n.1, p.839-847, 2008.

LAZAROVICI, T.S., et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a single-center study of 101 patients. **J Oral Maxillofac Surg**, v.67, n.1, p.850-85, 2009.

LEGROS, R.; BALMAIN, N.; BONEL, G. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. **Calcif Tissue Int**, v.41, n.1, p.137–144, 1987.

LIMA, M.R., et al. The Effect of *Calendula officinalis* on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental Periodontitis. **Front. Physiol**, v.8, n.440, p. 1-9, 2017.

LIN, S., et al. The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats. **Calcified Tissue International**, v.96, n.6, p.541-51, 2015.

LISBOA, M. R. et al. Effects of Electroacupuncture on Experimental Periodontitis in Rats. **J Periodontol**, v. 5, p. 1-19, 2015.

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

LU H. et al. Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 2, p. 640-647, 2014.

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

McCREADIE, B.R., et al. Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. **Bone**, v.39, n.01, p.1190–1195, 2006.

MACIEL-OLIVEIRA, N. et al. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 2, p. 170-179, ago. 2011.

MAEDA T. et al. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 681-692, 2003.

MAEDA, T. et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 92, n. 3, p. 458-471, 2004.

MAHMOUNDI M. et al. Atherogenesis: the role of inflammation and infection. **Histopathology**, v. 50, p. 535-546, 2007.

MAJIMA,T., et al. Chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibre scaffold for ligament and tendon tissue engineering. **Journal of Engineering in Medicine**, v. 221, n.5, p. 537 – 546, 2007.

MALDEN, N.; BELTES, C.; LOPES, V. Dental extractions and bisphosphonates: the assessment, consent and management, a proposed algorithm. **Br Dent J**, v.206, n.01, p.93-98, 2009.

MANDAIR, G. S.; MORRIS, M. D. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. **BoneKEy Reports.**, v.4, n.620, p. 1-8, 2015

MARINO, K., et al.. Development of a Rat Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). **Journal of Oral Implantology**, v.38, n.1, p. 511-518, 2012.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. *Circulation*, v. 101, n. 2, pp. 207-213, jan. 2000.

MARQUES, F. B. Fármacos inibidores da redutase da HMGC<sub>o</sub>A. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 17, n. 1, p.142-148, 2001.

MARTIN, A. et al. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. **Faseb J**, v. 25, n. 8, p. 2551-2562, 2011.

MARX, R.E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate(Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J MaxillofacSurg**, v. 61, n.9, p.1115-1117, 2003.

MARX, R.E.; SAWATARI, Y.; FORTIN, M.; BROU-MAND, V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg**, v.63, n.11, p.1567-1575, 2005.

McCREADIE, B.R., et al. Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. **Bone**, v.39, n.01, p.1190–1195, 2006

McLEOD, N. M.; BRENNAN, P.A.; RUGGIERO, S.L. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: a literature review of UK policies. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 49, n. 5, p. 335-42, jul. 2011.

MENS, H. K.; MOCANU, M.M.; YELLON, D.M. Failure to protect the myocardium against ischemia/reperfusion injury after chronic atorvastatin treatment is recaptured by acute atorvastatin treatment: a potential role for phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten? **J Am Coll Cardiol.**, v.45, n.8, p.1287-1291, 2005.

MIGLIORATI, C. A. et al. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an. **J Am Dent Assoc**, v. 136, n. 12, p. 1658-68, dez. 2005.

MONICI, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. **Biotechnol Annu Rev.**, v. 11, p. 227-256, 2005.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picosirius-polarization method for the study of biopathology of collagen. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, n.03, p.1-11, 1991.

MORRIS, M.D.; MANDAIR, G.S. Raman assessment of bone quality. **Clin Orthop Relat Res.**, v.469, n.8, p. 2160-2169, 2011.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin Chim Acta**, v. 61, p. 63-71, 1975.

MOZAFFARIAN, D., et al. The effects of atorvastatin (10mg) on systemic inflammation in heart failure. **J Am Cardiol**, v. 96, n.01, p.1699-1704, 2005.

MOZZATI, M. et al. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and. **Clin Oral Investig**, v. 3, 2012.

MUNDY, G.; GARRET, R.; HARRIS, S.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**; v.286, p.1946-1949, 1999.

NAWAWI, H., et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolemia treated with atorvastatin. **Atherosclerosis**, v.16, n.01, p. 283-291, 2003.

NOBLE, B.S. The osteocyte lineage. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n.01, p.106-111, 2008

NOBRE, D.; FONTES, K.B.F.C.; CARVALHO NETO, L.G.M.C.; NEVES, F.G.; GELLER, M.; CUNHA, K.S.G. Patogênese da osteonecrose dos ossos maxilares induzida por bifosfonatos: o que se sabe atualmente? **RBM**, v.69, p.318-322, 2012.

NORDIN, M.; FRANKEL, V.H. **Biomecânica Básica do Sistema**

**Musculoesquelético**. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

NUNES, V., et al. Uso de bifosfonatos em pacientes com câncer e sua associação com osteonecrose dos ossos maxilares: uma revisão de literatura. **Rev Periodontia**, v.20, n.3, p.20-27, 2010.

OHE, J. Y.; KWON, Y. D.; LEE, H. W. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived. **Clin Oral Investig**, v. 16, n. 4, p. 1153-9, ago. 2012.

OLCZYK P, MENCNER L, KOMOSINSKA-VASSEV K. 2014. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **BioMed Res Int**. v.74, p.75-84, 2014.

OLIVEIRA, N. J. F., et al. Hemogram, serum biochemistry and hepatic histologic features in cattle after administration of citrus pulp. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.3, p. 418-422, 2005.

OLIVEIRA, C. C. Avaliação do efeito da dexametasona e da nimesulida na quimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico em ratos. 118 f. 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.

ORIÁ, R. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 425-434, 2003.

PAIC, F.; IGWE, J.C.; NORI, R.; KRONENBERG, M.S.; FRANCESCHETTI, T.; HARRINGTON, P. Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. **Bone**, v.45, n.4, p.682–692, 2009.

PAN, H. Y.; DEVAULT, A. R.; WANG-IVERSON, D.; IVASHKIV, E.; SWANSON, B. N.; SUGERMAN, A. A. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin and lovastatins. **J Clin Pharmacol**, v. 30, n. 12, pp. 1128-1135, dec. 1990.

PARFITT, J. R.; DRIMAN, D. K. Pathological effects of drugs on the gastrointestinal tract: a review. **Hum. Pathol.**, v. 38, p. 527-536, 2007.

PAUSCHINGER M, DOERNER A, REMPPIS A, TANNHAUSER R, KÜHL U, SCHULTHEISS HP. Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. **Cardiovasc Res**. v.37, n1, p.123–129, 1998.

PAUTKE, C., et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large

animal model. *Bone*, v. 51, p. 3, p. 592- 599, 2012.

PAZIANAS, M. et al. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with. **Clin Ther**, v. 29, n. 8, p. 1548-58, ago. 2007.

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.

PENEL, G.; LEROY, G.; REY, C.; BRES, E. MicroRaman spectral study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> vibrational modes in synthetic and biological apatites. **Calcif Tissue Int.**, v.63, n.01, p.475–481,1998

PENG, S.; MIAO, C.; LI, J.; FAN, X.; CAO, Y.; DUAN, E. Dickkopf-1 induced apoptosis in human placental choriocarcinoma is independent of canonical Wnt signaling. **Biochem Biophys Res Commun**, v.350, p.641–647, 2016.

PIETRZYK, B.; SMERTKA, M.; CHUDEK, J. Sclerostin: Intracellular mechanisms of action and its role in the pathogenesis of skeletal and vascular disorders. **Adv Clin Exp Med**, v.26, n.8, p.1283–1291, 2017.

PLOSKER G. L; LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Atorvastatin: a pharmacoeconomic review of its use in the primary and secondary prevention of cardiovascular events. **Pharmacoeconomics**, v. 25, n. 12, p. 1031-1053, 2007.

PLOTKIN, L. I. et al. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 7317-7325, 2005.

PRAJAPATI, S.K.; GARABADU, D.; KRISHNAMURTHY, S. COENZYME Q10 Prevents Mitochondrial Dysfunction and Facilitates Pharmacological Activity of Atorvastatin in 6-OHDA Induced Dopaminergic Toxicity in Rats. **Neurotox Res.**, v.31, n.4, p.478-492, 2017.

QUARLES, L. D. Science in medicine Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 12, p. 23-27, 2008.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, v. 285, n. 33, pp. 103-107, aug. 2010.

RAUNER, M., et al. RANKL and OPG gene expression bone marrow stromal cells and calvarial osteoblasts in mouse and rat. **Osteologie**, v.16, p.19–28, 2008.

RAUNER, M.; SIPOS, W.; PIETSCHMANN, P. Age-dependent Wnt gene expression

in bone and during the course of osteoblast differentiation. **Age**, v.30, n.4, p. 273–282, 2014.

REDDI, A. H.; Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. **American volume**. Boston, v.83-A, p.S1-S6, 2001.

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.

RIAD, A., et al. Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes melitus. **Eur J Pharmacol.**, v.569, n.3, p.204-11, 2007.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 455–498, 2006.

RODAN, G., et al. Bone safety of long-term bisphosphonate treatment. **Curr Med Res Opin**, v. 20, n. 8, pp. 1291-1300, aug. 2004.

ROELOFS, A. J. et al. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 3, p. 606-616, 2010.

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

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia** – Texto e Atlas. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

ROSSINI, M.; GATTI, D.; ADAMI, S. Involvement of WNT/b- catenin signaling in the treatment of osteoporosis. **Calcif Tissue Int.**, v.93, p.121–132, 2013.

RUGGIERO, S. L. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 5, p. 527-34, maio 2004.

RUGGIERO, S., et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. **Aust Endod J**. v. 35, p.119-130.

RUGGIERO, S.L., et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.72, n.10, p.1938-1956, 2014.

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

RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology bisphosphonates on breast cancer cell lines. *Pediatrics*, v.119, p. S150-162, 2007.

SANTIN, S.P. Avaliação Morfológica e Biomecânica dos Efeitos da Radiação Gama em Osso Humano Liofilizado ou Congelado. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2014.

SANTINI, D. et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 8, p. 2893-7, Aug 1 2003.

SAPIR-KOREN, R.; LIVSHITS, G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption–formation cycles? **Osteoporosis International**, v. 25, n.12, p. 2685-2700, 2014

SARIN, J.; DeROSSI, S.S. Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. **Oral Dis** 2008, v.4, n.01, p.277-85, 2008.

SARKARAT, F.; KALANTAR MOTAMEDI, M.H.; JAHANBANI, J.; SEPEHRI, D.; KAHALI, R.; NEMATOLLAHI, Z. Platelet-rich plasma in treatment of zoledronic acid-Induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Trauma Mon**, v.19, n.2, p.171-196, 2014.

SCARPA, L.C.; LEITE, L.C.M.; LACERDA, J.C.T.; ARANTES, D.C.B. Osteonecrose nos ossos da maxila e mandíbula associada ao uso do bifosfonato de sódio. **Rev Bras Pesqui Saude** 2010, v.12, n.1, p.86-92.

SCHULZ, I. Tratamento das Dislipidemias – Como e Quando Indicar a Combinação de Medicamentos Hipolipemiantes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**. V. 50 (2) pp: 344-359, 2006.

SCHWARTZ, K.A.; LANCILOTI, N.J.; MOORE, M.K.; CAMPIONE, A.L.; CHANDAR, N. p53 transactivity during in vitro osteoblast differentiation in a rat osteosarcoma cell line. **Mol. Carcinog.**,v.25,n.01; p. 132–138, 2008

SEIBEL, M.J. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. **Osteoporosis Internacional**, v.11, n.01,p.18-29, 2000.

SENEL, F.C., et al., Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.109, n.3, p. 385-91, 2011.

SHAO, S., et al. Atorvastatin Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Hippocampal Neurons Injury Via Akt-nNOS-JNK Signaling Pathway. **Cell Mol Neurobiol.**, v.37, n.4, p.753-762, 2017.

SHARMA, S. et al. Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. **Nucleic Acids Res**, v.41, n.19, p.9062-9076, 2013.

SHI, C., et al. Carbonic anhydrase III protects osteocytes from oxidative stress. **FASEB J.**, v.32, n.1, p.440-452, 2018.

SIGUA-RODRIGUEZ, E.A., et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a review of the literature. **Int J Dent** 2014, v.1, p.1-5, 2014.

SILVA, G.P., et al. Classificação e tratamento de lesões de furca. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.16 n.2, p. 112-118, jul-dez, 2014.

SILVA, P. G. B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v. 6, p. 1237-1245, 2015.

SILVA, P. G. B. et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Diseases**, v. 22, n. 7, p. 649-657, 2016.

SILVERMAN, S.L.; LANDESBURG, R. Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. **Am J Med** 2009, v.122, n.2, p.33-45.

SONIS, S.T., et al., Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncol**, v.45, n.2, p. 164-172,2009.

SOUNDIA, A., et al. Zoledronate Impairs Socket Healing after Extraction of Teeth with Experimental Periodontitis. **J Dent Res**. v.27, p. 1-9, 2017.

SOUSA, L. H., et al. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. **J. Periodontol.**, v. 87,n.01, p. 1206–1216, 2016.

STEVENS, A.; LOWE,J. **Histologia Humana**. 2ed. São Paulo: Mamole, 2001.

STEVENS, J. R., et al. Wnt10b Deficiency Results in Age-Dependent Loss of Bone

Mass and Progressive Reduction of Mesenchymal Progenitor Cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.25, n.10, p. 2138–2147, 2010.

TAN, J., et al. Single-Dose Local Simvastatin Injection Improves Implant Fixation via Increased Angiogenesis and Bone Formation in an Ovariectomized Rat Model. **Med Sci Monit.**, v.21, n.5, p. 1428-1439, 2015.

TAKENO, A.; KANAZAWA, I.; TANAKA, K.; NOTSU, M.; YOKOMOTO, M. Activation of AMP-activated protein kinase protects against homocysteine-induced apoptosis of osteocytic MLO-Y4 cells by regulating the expressions of NADPH oxidase 1 (Nox1) and Nox2. **Bone**, v.77, p.135-141, 2015.

TANG, X. et al. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via. **Int J Cancer**, v. 126, n. 1, p. 90-103, 1 jan. 2010.

TARNOWSKI, C.P.; IGNELZI, M.A.; MORRIS, M.D. Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by Raman microspectroscopy. **J Bone Miner Res.**, v.17, n.01, p.1118–1126, 2002

TEITELBAUM, S. L. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 427–435, 2007.

TIMLIN, J. A.; Carden, A.; MORRIS, M.D. Chemical Microstructure of Cortical Bone Probed by Raman Transects. **Applied Spectroscopy**, v.53, n.11, p.1429-1435, 1999.

TRACY LE, MINASIAN RA, CATERSON EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Adv Wound Care (New Rochelle)**. v.5, n.3, p.119–136, 2016.

TSE, F. L.; JAFFE, J. M.; TROENDLE, A. Pharmacokinetics of fluvastatin after single and multiple doses in normal volunteers. *J Clin Pharmacol*, v. 32, n. 7, pp. 630-638, jul. 1992.

THUMBIGERE-MATH, V. et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: Clinical Features, Risk Factors, Management, and Treatment Outcomes of 26 Patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** , v. 67, n. 9, p. 1904 – 1913, 2009 .

TWISS, I. M. et al. The sugar absorption test in the evaluation of the gastrointestinal intolerance to bisphosphonates: studies with oral pamidronate. **Clin. Pharmacol.**, v. 69, n.01, p. 431-437, 2001.

UDA, Y.; AZAB, E.; SUN, N.; SHI, C.; PAJEVIC, P. Osteocyte Mechanobiology. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 04,p. 318–325, 2017.

UEDA S, ICHISEKI T, YOSHITOMI Y, YONEKURA H, UEDA Y, KANEUJI A, MATSUMOTO T. Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia. **Med Mol Morphol.**, v.48, n.2, p.69-75, 2015.

VASCONCELLOS, D.V.; DUARTE, M.E.L.; MAIA, R.C. Efeito anti-tumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.1; p.45-54, 2004

VIEILLARD, M.H., et al: Thirteen cases of jaw osteonecrosis in patients on bisphosphonate therapy. **Joint Bone Spine**, v. 75, n.01, p.34-40, 2008.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P.D. The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*.v. 17, n.3, p. 319-336, 2006.

WANG, J.; KALHOR, A.; LU, S.; CRAWFORD, R.; NI, J.; XIAO, Y. iNOS expression and osteocyte apoptosis in idiopathic, non-traumatic osteonecrosis. **Acta orthopaedica**, v. 86, n.1, p. 134-41, 2015

WANG, J.Y.; CHEN, H.; SU, X.; ZHOU, Y.; LI, L. Atorvastatin Pretreatment Inhibits Myocardial Inflammation and Apoptosis in Swine After Coronary Microembolization. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.**, v.39, p.207-219, 2016

WAEHER, T., et al. Increased expression of Interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects on HMG-CoA Reductase Inhibitors. **Circulation**, v.109, n.01, p. 1966-1972, 2004.

WATTS, N.B.; MARCIANI, R.D. Osteonecrosis of the jaw. **South Med J**, v.101, n.01, p.160-165, 2008.

WILLERT, K., NUSSE, R. Wnt proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 4, n. 9, p. a007864, 2012.

WITTKOWSKE, C., et al. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.4,n.01, p. 87, 2016

YAMAGUCHI, K. et al. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 7, p. 1646-1654, ago. 2000.

YANIK, S. et al. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. **Archives of Oral Biology**, v.65, n.01, p. 59–65, 2016.

YANG, et al. Atorvastatin attenuates cognitive deficits through Akt1/caspase-3 signaling pathway in ischemic stroke. **Brain Research**, v. 1629, p.231–239, 2015.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; MOCHIZUKI, S.; SUDA, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.7, p. 3597–3602, 1998.

YERRAMSHETTY, J.S.; LIND, C.; AKKUS, O. The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. **Bone**, v.39, n.01, p.1236–1243, 2006;.

YIN, H.; SHI, Z.G.; YU, Y.S.; HU, J.; WANG, R. Protection against osteoporosis by statins is linked to a reduction of oxidative stress and restoration of nitric oxide formation in aged and ovariectomized rats. **Eur J Pharmacol**, v. 674, p.200-206, 2012.

YU, Y.Y., et al. Site specific effects of zoledronic acid during tibial and mandibular fracture repair. **PLoS One**; v.7, p.e31771, 2012

XIA X, et al. Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. **Mol Cell Biol.**, v.30, p.206–219, 2010.

XU, Y. et al. Pamidronate Disodium Leads to Bone Necrosis via Suppression of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Vitro. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.75, n.10, 2017.

ZHANG, W.; DRAKE, M.T. Potential role for therapies targeting DKK1, LRP5, and serotonin in the treatment of osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**, v.10, p.93–100, 2012.

ZHANG, S.; MATSUSHITA, T.; KURODA, R.; NISHIDA, K.; MATSUZAKI, T.; MATSUMOTO, T.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, K.; OKA, S.; TABATA, Y.; NAGAMUNE, K.; KUROSAKA, M. Local Administration of Simvastatin Stimulates Healing of an Avascular Meniscus in a Rabbit Model of a Meniscal Defect. **Am J Sports Med.** v.44, n.7, p.1735-1743, 2014.

ZHENG, T.S.; SCHLOSSER, S.F.; DAO, T.; HINGORANI, R.; CRISPE, I.N.; BOYER, J.L.; FLAVELL, R.A. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v.95, p. 13618-13623, 1998.

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



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

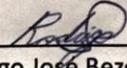
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO DOS ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DO EFEITO DA ATORVASTATINA NA OSTEONECROSE DE MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS”, protocolo 19/16, sob responsabilidade da Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016, ficando a apresentação do relatório final para até o dia 31 de março de 2018.

Vigência do projeto	02/04/2016 – 02/07/2017
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de Animais	72
Peso	180 – 200 g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 15 de abril de 2016.

  
 Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira  
 Coordenador da CEUA UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA**  
**COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM**  
**ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siage: 1520730**

## ANEXO B – FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS

### Fármacos

Fármacos	Fabricante	Código do produto
Ácido Zoledrônico	Cristália	ATC: M05 BA08
Atorvastatina Cálcica	EMS	ATC: C10AA05
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin <sup>®</sup> )	Syntec	ATC vet: N01AX03
Xilazina 2% (Calmin <sup>®</sup> )	Agener União	ATC vet: QA04AD90

### Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
2-Mercaptoetanol	Biorad	1610710
30% de Bis-acrilamida	Biorad	1610154
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
<i>Clarity Western ECL Substrate</i>	Biorad	1705060
DAB	Dako	K3468
Dako Pen	Dako	52002
Diluyente do anticorpo	Spring Bioscience	ADS-125
DTNB	Sigma-Aldrich	D8130-5
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	Dako	S3023
Glicina	Biorad	1610718
High Capacity cDNA (Kit de transcriptase reversa)	Applied biosystems	4368814
Inibidor de protease	Sigma-Aldrich	P8340
Kit de citocinas para TNF- $\alpha$	R&D Systems	DY410
Kit de citocinas para IL-1 $\beta$	R&D Systems	DY406
Kit de dosagem bioquímica para Cálcio	Labtest	
Kit de dosagem bioquímica para Fósforo	Labtest	

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
Kit de dosagem bioquímica para Fosfatase Alcalina Óssea	Labtest	
Peróxido de hidrogênio	Abcam	Ab64218
Persulfato de amônia	Biorad	1610700
Reagente A e B (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY999
Reagente diluente (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY995
SDS	Biorad	1610301
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Soro de cavalo	Sigma-Aldrich	H0146-10
Tampão de lavagem 25x concentrado (dosagem de citocinas)	R&D Systems	895126
Tris Base	Promega	H5135
Triton-X-100	Sigma-Aldrich	T8787
TWEEN 20	Biorad	1706531

### Soluções

Soluções	Preparo
Formol tamponado a 10%	6,5g de fosfato de sódio dibásico 4g de fosfato de sódio monobásico 800 mL de água destilada Após dissolver as substâncias, adicionar 100 mL de formaldeído 37%. Completar para 1000 mL.
Soluções	Preparo

PBS (concentrado 10x)	80g de Cloreto de sódio 2g de KCl 11,4g de fosfato de sódio monobásico 4,5 g de fosfato de sódio dibásico 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 7,4. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 1x)	100 mL de PBS 10x 900 mL de água destilada
Tampão citrato (concentrado 10x)	29,4g de Citrato de sódio 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 6,0 Completar para 1000 mL.
Tampão citrato (concentrado 1x)	20 mL de tampão citrato 10x 180 mL de água destilada
PBS/0,2% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 50µL de triton-X-100
PBS/1% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 250µL de triton-X-100
Tampão TRIS	4,84g de tris 10 mL de 0,2 M EDTA Ajustar o pH para 8,9