

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

**Avaliação temporal da migração de neutrófilos e mediadores
inflamatórios em mandíbulas de camundongos swiss tratados com ácido
zoledrônico**

José Ronildo Lins do Carmo Filho

Fortaleza
2018

JOSÉ RONILDO LINS DO CARMO FILHO

**Avaliação temporal da migração de neutrófilos e mediadores
inflamatórios em mandíbulas de camundongos swiss tratados com ácido
zoledrônico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área temática: Estomatopatologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.

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)

F498a Filho, José Ronildo Lins do Carmo.
Avaliação temporal da migração de neutrófilos e mediadores inflamatórios em mandíbulas de camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico. / José Ronildo Lins do Carmo Filho. – 2018.
51 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

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

CDD 617.6

JOSÉ RONILDO LINS DO CARMO FILHO

**Avaliação temporal da migração de neutrófilos e mediadores
inflamatórios em mandíbulas de camundongos swiss tratados com ácido
zoledrônico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área temática: Estomatopatologia

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Francisco Wagner Vasconcelos Freire Filho
Universidade de Fortaleza Unifor

AGRADECIMENTOS

Os sonhos, quando realizados sozinho, não fazem sentido. Por serem devidos, aqui vão rápidos e não esgotáveis agradecimentos a alguns daqueles que contribuíram, decisivamente, para a realização dessa etapa.

Inicialmente, agradeço a **Deus** por toda a infinita generosidade e misericórdia que tem tocado minha vida. Eu nada seria e nada faria sem Teu Amor e Tua Presença. Todos os demais agradecimentos decorrerão deste primeiro. Que a Ele seja dada toda honra, glória e louvor.

Aos meus pais, **Simony e Ronildo**, por toda a paciência, zelo, amor e cuidado devotados a minha criação. Sei que os passos de hoje decorrem bastante dos primeiros, e foram vocês quem me ensinaram a andar. Eu nunca vou poder agradecer, de todo, o sacrifício de vocês por mim. Terei o exemplo de vocês para sempre na minha memória.

Aos meus irmãos, **Kélvio e Maria Clara**, por acreditarem nas diferenças que nos tornam um. Obrigado por compartilharem comigo o bem mais precioso de ser família.

Ao meu orientador **Prof. Mário Rogério Lima Mota**, pela oportunidade de conviver ao lado de um ser humano impecavelmente inteligente, simples e acessível, não medindo esforços para transmitir toda a sua sabedoria. Sou imensamente grato ao meu orientador que direcionou o meu desejo por aprender cada vez mais.

À minha co-orientadora **Profa. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, exemplo de comprometimento, dedicação e competência em tudo o que se propõe a fazer. Agradeço imensamente pela atenção, cuidado, conselhos e conhecimentos compartilhados durante todo esse período. A senhora é um grande exemplo de ser humano em quem tenho orgulho de me espelhar.

Ao **Prof. Fabricio Bitu** e à **Profa. Karuza Maria Alvez Pereira**, pelos ensinamentos acadêmicos, pela contribuição na minha formação pessoal e profissional e por transmitir tão grandiosamente o valor da docência e da pesquisa.

À todos os meus amigos do Laboratório de Patologia Bucodental, em especial **Paulinho e Elisa**, pela amizade sincera e por toda a ajuda e companheirismo ao longo de todas as fases dessa etapa. Agradeço também a

Sthefane, Ealber, Diego, Gabriela, Erasmo, Pedro Henrique, Thaís, Khalil, Ernando, Camila, Thinali e Isabelly, por termos compartilhado juntos esses anos de rotina intensa e conhecimento, pelas orientações durante todo o período experimental, pela amizade e experiências divididas, por todo o cuidado dispendido durante todos os momentos. Sou muito grato a vocês pelo suporte sempre presente.

Aos alunos de iniciação científica que contribuíram ativamente nas pesquisas e trabalhos no decorrer do mestrado, em especial aos alunos **Imaculada, Guilherme, Mariana Dantas, Francisco Denis, Pedro, Lucas e Lucca**, os quais me ensinaram e me ajudaram imensamente durante todo o curso do mestrado.

Ao amigo **Lucas Nobre**, por ter me ajudado imensamente nos momentos em que parecia que eu não conseguiria.

RESUMO

O ácido zoledrônico (AZ) é um aminobisfotonato de terceira geração que inibe a reabsorção óssea através da indução de apoptose e inibição da via do mevalonato na síntese de colesterol. A indução de citocinas em decorrência de sua toxicidade é importante na migração e ativação de neutrófilos, que possuem uma sobrevivência encurtada na presença de AZ. Esse mecanismo pode induzir dano tecidual e incrementar o potencial de fagocitose e destruição de macrófagos. O objetivo do presente trabalho foi delinear o curso temporal e mediadores envolvidos na migração de neutrófilos em mandíbulas de camundongos tratados com AZ. Camundongos swiss (N=192) machos foram divididos em 2 grupos: um submetido à infusão com solução salina (0,1ml/kg; e.v.) com ou sem exodontia, e outro submetido à infusão de AZ (0,20mg/kg; e.v.) com ou sem exodontia. Foram administradas três doses semanais consecutivas de AZ ou salina (D0, D7, D14). Após 28 dias da última administração foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e direito (D42). Na semana seguinte (D49) foi administrada uma dose adicional de AZ ou salina. Um mês após a exodontia (D70) o protocolo entrou em desfecho. Os animais foram eutanasiados semanalmente (n=6/grupo) e as mandíbulas foram removidas para ensaio de quantificação de mieloperoxidase (MPO) e dosagens de mediadores inflamatórios (IL-1 β , NF-kB e TNF- α) por ensaio de imunoabsorbância enzimática (ELISA). Os testes Anova/Bonferroni e qui-quadrado foram utilizados para análise estatística (p<0,05). Nos grupos tratados com AZ (sem exodontia) pôde-se observar um aumento significativo dos níveis de MPO de D0 (2,20 \pm 0,09) para D7 (5,40 \pm 0,51), mantendo-se num platô que não mostrou variação significativa a partir de D14 (6,50 \pm 0,43) até D70 (8,40 \pm 0,83) (p<0,001). Quando submetido à exodontia, o grupo AZ mostrou um incremento significativo de MPO (D42), decrescendo significativamente na semana seguinte (D49) e mantendo valores significativamente mais altos (até o D70), em relação aos animais que receberam apenas AZ e não passaram por procedimento de exodontia (p<0,001). Os animais tratados com AZ (sem exodontia) também mostraram aumento dos níveis de IL-1 β , NF-kB e TNF- α de D0 para D21, mantendo-se esses valores elevados em D42 e D56 (p<0,001). Após a exodontia, esses grupos tratados com AZ mostraram um incremento significativo destes marcadores em D42 com redução em D56. Ainda assim, os valores de D56 permaneceram mais elevados em relação ao período basal (D0) e após infusão do AZ em D21 (p<0,001). A infusão crônica de AZ em camundongos pode levar a alterações inflamatórias sustentadas com aumento de marcadores pró-inflamatórios no osso mandibular desses animais, bem como alteração do número de neutrófilos. Essas alterações podem se apresentar ainda mais elevadas e também sustentadas quando se associa um fator estimulador (exodontia) às infusões.

Palavras Chave: Ácido zoledrônico, neutrófilos, osteonecrose.

ABSTRACT

Zoledronic acid (ZA) is a third generation aminobisphosphonate that inhibits bone resorption through the induction of apoptosis and inhibition of the mevalonate pathway in cholesterol synthesis. The induction of cytokines due to their toxicity is important in the migration and activation of neutrophils, which have a shortened survival in the presence of ZA. This mechanism can induce tissue damage and increase the potential for phagocytosis and destruction of macrophages. The objective of the present work was to delineate the temporal course and mediators involved in the migration of neutrophils in jaws of mice treated with ZA. Male swiss mice (N=192) were divided into two groups: one undergoing infusion with saline solution (0.1ml/kg, e.v.) with or without exodontia, and another submitted to infusion of ZA (0.20mg/kg; e.v.) with or without exodontia. Three consecutive weekly doses of ZA or saline (D0, D7, D14) were given. After 28 days of the last administration, the left and right lower first molar (D42) was extracted. An additional dose of ZA or saline was given the following week (D49). One month after the exodontia (D70) the protocol came to an end. The animals were euthanized weekly (n=6/group) and the jaws were removed for quantification of myeloperoxidase and dosages of inflammatory mediators (IL-1 β , NF- κ B and TNF- α) by enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa). The Anova/Bonferroni and chi-square tests were used for statistical analysis (p<0.05). A significant increase in MPO levels from D0 (2,20 \pm 0,09) to D7 (5,40 \pm 0,51) was observed in the groups treated with ZA (without exodontia), maintaining a plateau that showed no significant variation from D14 (6,50 \pm ,43) to D70 (8,40 \pm 0,83) (p<0.001). When submitted to the exodontia, the ZA group showed a significant increase of MPO (D42), decreasing significantly in the following week (D49) and maintaining significantly higher values (up to D70), in relation to the animals that only received ZA and did not go through procedure (p<0.001). The animals treated with ZA (without exodontia) also showed increased levels of IL-1 β , NF- κ B and TNF- α from D0 to D21, maintaining these values high in D42 and D56 (p<0.001). After the exodontia, these groups treated with AZ showed a significant increase of these markers in D42 with reduction in D56. Nevertheless, D56 values remained higher in relation to the basal period (D0) and after infusion of ZA in D21 (p<0.001). Chronic infusion of ZA in mice may lead to sustained inflammatory changes with increased proinflammatory markers in the mandibular bone of these animals, as well as alteration in the number of neutrophils. These alterations can be even higher and also sustained when a stimulating factor (exodontia) is associated with the infusions.

Keywords: Zoledronic acid, neutrophils, osteonecrosis.

LISTA DE FIGURAS GERAL

- Figura 1** - Representação esquemática da estrutura química geral dos bisfosfonatos..... 11
- Figura 2** - Perfil celular no periodonto clinicamente normal e sem exodontia de ratos da linhagem Wistar tratados cronicamente com ácido zoledrônico (0,20 mg/kg) exibindo aumento do número de células inflamatórias (hematoxilina-eosina) – Painel A e B, sem elevação do perfil mastocitário (azul de toluidina) – Painel C e D. Observa-se ainda aumento de mononucleares (imunoistoquímica, CD68, método da estreptavidina-biotina-peroxidase) – Painel E e F 17
- Figura 3** - Análise de atividade de MPO em gengiva (A) e osso (B) de animais tratados com ácido zoledrônico não submetidos a exodontia..... 18

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1 - Protocolo experimental para delineamento do curso temporal de infiltração de neutrófilos em camundongos swiss tratados com AZ submetidos ou não à exodontia.....	26
Figura 2 - Dosagem de MPO em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior direito.....	31
Figura 3 - Dosagem de TNF- α em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior direito.....	32
Figura 4 - Dosagem de IL-1 β em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior direito.....	33
Figura 5 - Dosagem de NF-kB em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não à exodontia do primeiro molar inferior direito.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil celular no periodonto clinicamente normal e sem exodontia de ratos da linhagem Wistar tratados cronicamente com ácido zoledrônico (0,20 mg/kg).....	18
--	----

Lista de ABREVIATURAS e SIGLAS

ABC: Avidin Biotin Complex (complexo avidina biotina)

ANOVA: analysis of variance (análise de variância)

AAOMS - American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

ADA - American Dental Association

AZ- Ácido Zoledrônico

BFs - Bisfosfonatos

CEUA- Comissão Ética no Uso de Animais

CD68: receptor scavenger CD68

DAB -3,3 - diamino-benzidina

EPM - Erro padrão da média

HTAB: hexadecyltrimethylammonium (hexadeciltrimetilamonio)

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

IL -1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

MPO - Mieloperoxidase

NF- κ B - Fator Nuclear kappa B

OMB – Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos

PBS: Phosphate buffered saline (solução tampão de fosfato)

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TNFR: Receptor do Fator de Necrose Tumoral

TGF- β - Do inglês Transforming growth fator β

UFC - Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
Bisfosfonatos: ácido zoledrônico	11
Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB).....	13
Desregulação da resposta imunológica mediada por ácido zoledrônico	15
2. PROPOSIÇÃO	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
3. CAPÍTULOS	20
Capítulo 1: Avaliação temporal da migração de neutrófilos e mediadores inflamatórios em mandíbulas de camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico	21
4. CONCLUSÃO GERAL	40
5. REFERÊNCIAS	41
6. ANEXOS	47
Anexo A - Seguimento do Regimento Interno	47
Anexo B - Aprovação do comitê de ética em pesquisa animal	48

1. INTRODUÇÃO

Bisfosfonatos: Ácido Zoledrônico

Os bisfosfonatos (BFs) são fármacos inibidores da reabsorção óssea, constituídos por uma estrutura semelhante ao pirofosfato endógeno. Os BFs foram desenhados com base na molécula de pirofosfato devido sua semelhança à estrutura óssea e interação com esta. Diferente do pirofosfato, no entanto, os BFs contêm dois grupos fosfonatos ligados um a um ao átomo de carbono central (estrutura P-C-P), não oxigênio, o que lhes confere alta resistência à degradação enzimática e maior tempo de meia vida (ROGERS et al., 2000; RUSSELL, CROUCHER, ROGERS, 2007).

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

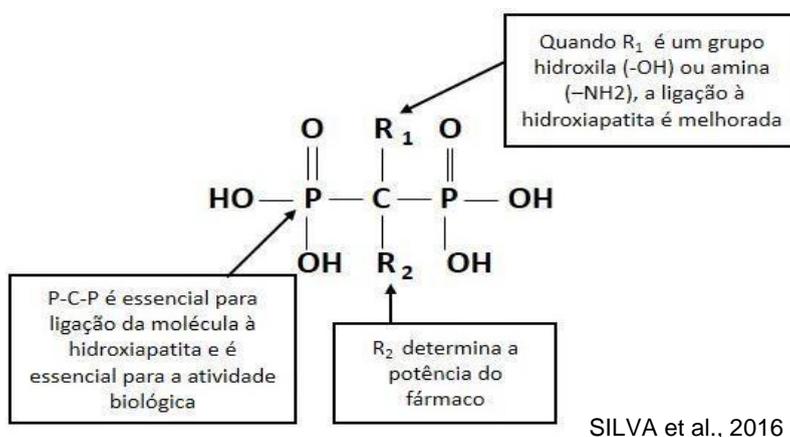


Figura 1: Representação esquemática da estrutura química geral dos bisfosfonatos.

De acordo com sua estrutura química, os BFs podem ser classificados em bisfosfonatos que contêm nitrogênio (aminobisfosfonatos) ou que não contêm nitrogênio em sua composição (não-aminobisfosfonatos) (FLEISCH, 1998; RUSSELL et al., 1999). Assim como o pirofosfato, os BFs

formam uma estrutura tridimensional capaz de se ligar a íons metálicos bivalentes, tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} . Essa ligação é clinicamente importante devido ao grande teor mineral presente no tecido ósseo. A afinidade ao cálcio se dá de forma bidentada através da coordenação de um átomo de oxigênio a partir de cada grupo de fosfonato com o cátion bivalente. Essa afinidade aumenta se uma das cadeias laterais (R1) é um grupo hidroxila (-OH) ou amina primária (-NH₂) (aminobisfosfonatos), porque isto permite uma conformação tridentada, a qual é capaz de se ligar mais efetivamente e com baixa reversibilidade à molécula de Ca^{2+} (JUNG, BISZA, FLEISCH, 1973) (Figura 1).

Dentre os diversos BFs existentes, o ácido zoledrônico (AZ) é o mais potente. Trata-se de um aminobisfosfonato derivado imidazólico heterocíclico de terceira geração. Esse fármaco é administrado por via endovenosa, em uma infusão de 4 mg por cerca de 15 minutos. Ao final da administração, sua concentração plasmática eleva-se rapidamente, seguido de um declínio apresentando, após 24 h, concentração plasmática de 1%. Cerca de 56% do AZ liga-se a proteínas plasmáticas e o mesmo praticamente não é acumulado no organismo, com uma única exceção: o sistema esquelético (RUSSEL et al., 1999; FERNANDES, LEITE, LANÇAS, 2005; LYSENG-WILLIAMSON, 2008).

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

No entanto, esse fármaco possui uma toxicidade considerável, e está associado a diversos eventos pró-inflamatórios os quais também se associam ao principal efeito colateral deste: a Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB).

Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB)

A OMB foi conceituada em 2007 pela American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) como sendo uma área de exposição óssea na maxila ou na mandíbula, que não se repara em oito semanas e acomete pacientes que estejam recebendo ou que receberam BFs sistemicamente e não sofreram irradiação no complexo maxilomandibular.

Até o momento, a etiopatogenia da OMB permanece incerta. Vale ressaltar que os BFs atuam em diversos níveis: físico-químico, tecidual, celular e molecular. Estudos aludem que a OMB é secundária aos mecanismos de ação dos BFs, que resultam em atividade antiosteoclástica e antiangiogênica, o que altera o metabolismo ósseo, inibindo a reabsorção óssea e diminuindo o turnover ósseo. Associam-se a isso as singularidades anatômicas que envolvem os ossos da maxila e da mandíbula, separados da cavidade bucal por uma mucosa fina e delgada, sendo essa uma barreira que pode ser facilmente rompida por atividades fisiológicas como a mastigação (SONIS, 2009).

A boca é colonizada por um grande número de bactérias, e os ossos maxilares frequentemente estão envolvidos em processos sépticos de origem periodontal ou pulpar. Quando ocorre um acúmulo de BFs capaz de diminuir o metabolismo ósseo, a reparação tecidual após um trauma, induzido ou fisiológico, não ocorre adequadamente, levando à exposição de uma área de osso necrótico ao meio bucal. Portanto, a hipótese que melhor explica o desenvolvimento da OMB seria uma alteração do turnover ósseo associada às características particulares dos ossos dos maxilares, como revestimento mucoso, risco frequente de infecção e potencial constante de trauma (TSAO, 2013).

Alguns fatores predisponentes para o desenvolvimento de OMB são citados na literatura, incluindo tipo, via de administração e tempo de uso do BF, administração concomitante de outros fármacos (principalmente corticosteroides, quimioterápicos e estrógeno), bem como a realização de procedimentos cruentos intrabucais. Alguns estudos descrevem que, no uso do ácido zoledrônico para o controle de metástases ósseas, são necessárias aproximadamente seis doses mensais de BF endovenoso para que o paciente

apresente risco de desenvolver OMB. Para os BFs administrados por via oral, como o alendronato, por sua vez, seriam necessários três anos ou 156 doses no total (uma dose por semana). Essa diferença, segundo os autores, ocorre devido à baixa solubilidade lipídica dos BFs administrados por via oral, fazendo com que haja uma absorção intestinal de apenas 0,63% da droga. Assim, pacientes que utilizam a via endovenosa apresentam prevalência de OMB entre 1%–10%, enquanto os que empregam a via oral apresentam prevalência entre 0,00007%–0,04%. (SILVERMAN, 2009).

A American Dental Association (ADA) e a AAOMS corroboram que tal risco é dose/tempo-dependente, porém esse fato é baseado apenas nas observações clínicas dos autores. Algumas teorias tentam explicar que a ausência de reparo epitelial das exposições ósseas intraorais secundárias ao uso dos BFs pode ser atribuída à toxicidade dos BFs sobre o tecido epitelial provocada pelas altas concentrações do fármaco no tecido ósseo (SONIS, 2009).

A variedade de sinais e sintomas clínicos da OMB, as medidas preventivas, os efeitos da interrupção do uso dos BFs, bem como os indicadores de prognóstico e a etiologia dessa doença permanecem indefinidos. Além disso, tratamentos eficazes para a OMB também não têm sido adequadamente caracterizados (TSAO, 2013).

Desregulação da Resposta Imunológica mediada por Ácido Zoledrônico

O AZ proporciona um efeito tóxico direto em muitos grupos celulares, como células epiteliais, fibroblastos (SILVERMAN e LANDESBURG, 2009; SCHEPER et al., 2009), osteoblastos (NAIDU et al., 2008), macrófagos (SCHELLER et al., 2011), neutrófilos (KUIPER et al., 2012), células endoteliais (MISSO et al., 2012), além de impedir a maturação de células de linhagem mielóide (WOLF et al., 2006). Assim como o alendronato de sódio (HIGARA et al., 2010), o AZ possui efeitos de teratogenicidade em dentes, altera a erupção de molares e a formação da matriz dental, estimula a reabsorção odontoclástica e induz a formação de dentículos e de odontomas (MASSA et al., 2006).

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

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

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

Até mesmo em estudos clínicos observou-se aumento de marcadores pró-inflamatórios como a IL-1 β em saliva (BAGAN et al., 2013) e fluido gengival (TSAO et al., 2013) de pacientes sob tratamento crônico com

AZ, além de modificação do perfil celular sanguíneo com aumento de células inflamatórias e citocinas circulantes (ROSSINI et al., 2012; WELTON et al., 2013).

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

Além disso, citocinas pró-inflamatórias também induzem osteoclastogênese (ASSUMA et al., 1998) e elevam a síntese de espécies reativas de oxigênio, que podem aumentar a extensão do dano e estimular ainda mais a migração de células inflamatórias (HALLEEN et al., 1999; WIMALAWANSA, 2010; ALMEIDA e O'BRIEN, 2013).

O AZ é uma molécula que se adere irreversivelmente a hidroxiapatita do tecido ósseo (ENDELE et al., 2005) e sua constante presença nos ossos gnáticos pode ser importante na modificação desse perfil inflamatório local. Além disso, permanece obscuro como se dá o início dessa desregulação imunológica e qual o comportamento desta desregulação ao longo do tempo.

O presente grupo de pesquisadores desenvolveu um modelo experimental de OMB que mimetiza a condição clínica em seres humanos, bem como uma série de eventos idiopáticos pós-infusão de AZ (SILVA et al., 2015). Esse modelo experimental utiliza um protocolo crônico de 70 dias de duração e, em estudos posteriores, essa equipe observou que mesmo após 70 dias da primeira infusão venosa semanal crônica de AZ (0,20mg/kg – total de quatro infusões), o periodonto clinicamente normal dos animais apresentou aumento de vasos dilatados/ectásicos, de células mononucleares CD68+ e de neutrófilos, sem alterar o número de mastócitos (Figura 2 e 3, Tabela 1).

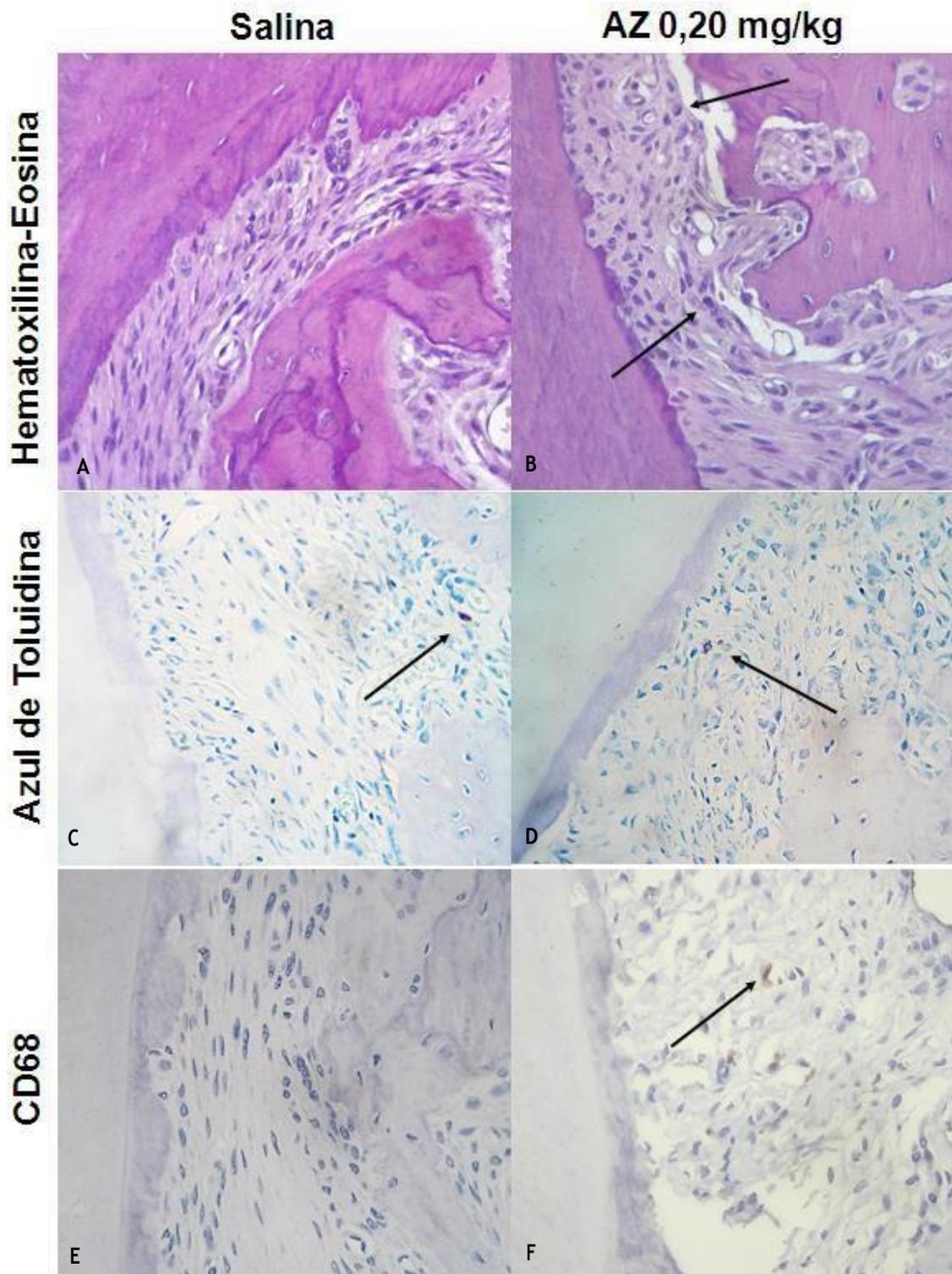


Figura 2: Perfil celular no periodonto clinicamente normal e sem exodontia de ratos da linhagem Wistar tratados cronicamente com ácido zoledrônico (0,20 mg/kg) exibindo aumento do número de células inflamatórias (hematoxilina-eosina) – Painel A e B, sem elevação do perfil mastocitário (azul de toluidina) – Painel C e D. Observa-se ainda aumento de mononucleares (imunoistoquímica, CD68, método da estreptavidina-biotina-peroxidase) – Painel E e F.

Tabela 1: Perfil celular no periodonto clinicamente normal e sem exodontia de ratos da linhagem Wistar tratados cronicamente com ácido zoledrônico (0,20 mg/kg).

	Salina	AZ 0.20 mg/kg	p-Valor
Número de animais			
Vasos dilatados e /ou ectásicos	3 (50.0%)	6 (100.0%)*	0.045
Reabsorção de cimento	3 (50.0%)	2 (33.3%)	0.558
Células inflamatórias	1 (16.7%)	5 (83.3%)*	0.021
Mastócitos	2 (50.0%)	5 (83.7%)	0.079
Mononuclear CD68+	0 (0.0%)	3 (50.0%)*	0.045

* $p < 0.05$ versus Salina, teste do qui-quadrado. Dados expressos em forma de freqüência absoluta e percentual ($n_{\text{grupo}}=6$)

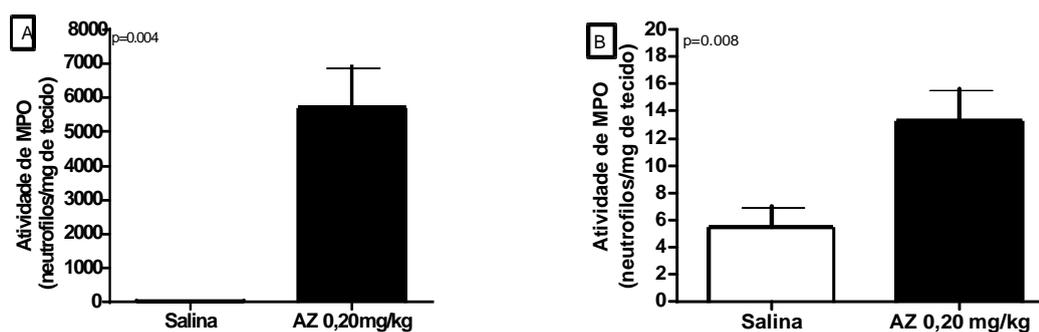


Figura 3: Análise de atividade de MPO em gengiva (A) e osso (B) de animais tratados com ácido zoledrônico, e não submetidos a exodontia ($p < 0.05$, teste t de Student, média \pm erro-padrão da média).

Apesar desses interessantes e inovadores achados, não é possível demonstrar apenas com base em estudos observacionais os mecanismos envolvidos no aumento do número de neutrófilos e macrófagos, nos ossos gnáticos, mediados por AZ. Além disso, devido à cronicidade desse modelo experimental (70 dias), não é possível saber em que momento essas células aparecem ou se sofrem redução em seu número com o passar do tempo.

Tendo em vista a importância da desregulação imune inflamatória que o AZ provoca *in vitro*, *in vivo* e em seres humanos e sua importância no desenvolvimento de OMB, se faz extremamente necessário estudar os mecanismos envolvidos nesse processo. A compreensão destes pode subsidiar estratégias farmacológicas e adjuvantes na prevenção/tratamento dos eventos pró-inflamatórios pós-infusão de AZ e talvez até orientar formas de evitar ou atenuar esse complexo efeito colateral (OMB).

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Avaliar o desenvolvimento temporal da migração de neutrófilos e os mediadores envolvidos neste processo em mandíbulas de camundongos tratados com ácido zoledrônico.

Objetivos Específicos

Realizar um curso temporal de migração de neutrófilos induzida por AZ em mandíbulas de camundongos swiss.

Definir, temporalmente, o pico máximo de migração de neutrófilos em mandíbulas de camundongos swiss tratados com AZ.

Quantificar, em diferentes momentos, mediadores inflamatórios envolvidos na migração de neutrófilos induzida por AZ em mandíbulas de camundongos swiss.

3. CAPÍTULOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato (Anexo A) e exige certificação de línguas. Por se tratar de pesquisas envolvendo animais, ou partes deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo de Nº 125/16 (Anexo B) intitulado “**Temporal evaluation of migration of neutrophils and inflammatory mediators in jaws of swiss mice treated with zoledronic acid**”. Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo contendo: um artigo científico no formato de submissão para o periódico “**Oral Diseases**”, conforme descrito abaixo:

3.1. Capítulo 1:

Avaliação temporal da migração de neutrófilos e mediadores inflamatórios em mandíbulas de camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico.

Title Page**Original Article**

Temporal evaluation of migration of neutrophils and inflammatory mediators in jaws of swiss mice treated with zoledronic acid

Running Head

Zoledronic acid and neutrophil migration

Authors and name affiliations

José Ronildo Lins do Carmo Filho¹, Maria Elisa Quezado Lima Verde¹, Paulo Goberlânio de Barros Silva¹, Mário Rogério Lima Mota¹, Ana Paula Negreiros Nunes Alves¹, Fabrício Bitú Sousa¹.

¹Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil.

*Correspondence author: Ms. José Ronildo Lins do Carmo Filho

Division of Oral Pathology

Department of Clinical Dentistry

School of Dentistry

Federal University of Ceará

Alexandre Barauna Street, 949, Rodolfo Teofilo,
60430-160, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Phone 1/Fax Number: +55 85 3366 8421.

Phone 2: +55 85 9682 9092.

E-mail: ronildofilhol@gmail.com

ABSTRACT

Zoledronic acid (ZA) is a third generation aminobisphosphonate that inhibits bone resorption through the induction of apoptosis and inhibition of the mevalonate pathway in cholesterol synthesis. The induction of cytokines due to their toxicity is important in the migration and activation of neutrophils, which have a shortened survival in the presence of ZA. This mechanism can induce tissue damage and increase the potential for phagocytosis and destruction of macrophages. The objective of the present work was to delineate the temporal course and mediators involved in the migration of neutrophils in jaws of mice treated with AZ. Male and female swiss mice (N=192) were divided into two groups submitted to infusion with saline solution (0.1ml/kg e.v.) with or without exodontia and ZA (0.20mg/kg e.v.) with or without exodontia. The animals were euthanized weekly (0-70 days) and the jaws were sectioned on the right and left sides for quantification of myeloperoxidase and dosing of inflammatory mediators (IL-1 β , NF- κ B and TNF- α) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The Anova / Bonferroni and chi-square tests were used for statistical analysis ($p < 0.05$). In the groups treated with ZA, a significant increase in MPO levels from D0 to D7 could be observed, remaining in a plateau that showed no significant variation from D14 to D70 ($p < 0.001$). When submitted to exodontia, the ZA group showed a significant increase of MPO (D42), decreasing significantly in the following week (D49) and maintaining significantly higher values (up to D70), in relation to the animals that only received AZ and did not undergo procedure of exodontia ($p < 0.001$). ZA-treated animals also showed increased levels of IL-1 β , NF- κ B and TNF- α from D0 to D21, these values being elevated in D42 and D56 ($p < 0.001$). After the exodontia, these groups treated with ZA showed a significant increase of these markers in D42 with reduction in D56. Nevertheless, D56 values remained higher in relation to the basal period (D0) and after infusion of AZ in D21 ($p < 0.001$). Chronic infusion of AZ in mice may lead to sustained inflammatory changes with increased proinflammatory markers in the mandibular bone of these animals, as well as alteration in the number of neutrophils. These alterations can be even higher and also sustained when a stimulating factor (exodontia) is associated with the infusions.

Keywords (MeSh): Zoledronic acid, neutrophils, osteonecrosis.

INTRODUÇÃO

Os Bisfosfonatos (BFs) são agentes antirreabsortivos, com diferentes mecanismos de ação antiosteoclástica, que têm sido amplamente utilizados para tratamento de osteoporose, bem como em tratamentos de metástases ósseas, mieloma múltiplo e doença de Paget, promovendo boa eficácia terapêutica (BI et al., 2010; KAMERERR et al., 2015; KIM et al., 2015; LANG M et al., 2016; PICHARDO S et al., 2016; SENTURK et al., 2016; VALACHIS et al., 2013). Os BFs reduzem a reabsorção óssea de maneira dose-dependente, principalmente ao inibirem o recrutamento e promoverem a apoptose dos osteoclastos (LITTLE et al., 2013).

Dentre os diversos BF existentes, o ácido zoledrônico (AZ) é o mais potente, tratando-se de um aminobisfosfonato derivado imidazólico heterocíclico de terceira geração (WOO et al., 2006). Apesar dos seus excelentes resultados na redução e atraso da morbidade esquelética, esse fármaco possui uma toxicidade considerável, e está associado a diversos eventos pró-inflamatórios, os quais também se associam ao principal efeito colateral deste: a Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB) (TSAO, 2013).

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

O AZ é uma molécula muito tóxica a diversos grupos celulares e a indução de citocinas em decorrência de sua toxicidade são importantes na migração e ativação de neutrófilos e macrófagos (GRAVES e JIANG, 1995). Os neutrófilos possuem uma sobrevivência encurtada na presença de AZ (KUIPER et al., 2011), o que pode induzir dano tecidual e incrementar o potencial de fagocitose e destruição de macrófagos. Além disso, citocinas pró-inflamatórias também induzem osteoclastogênese (ASSUMA et al., 1998) e elevam a síntese de espécies reativas de oxigênio, que podem aumentar a extensão do dano e estimular ainda mais a migração de células inflamatórias (HALLEEN et al., 1999; WIMALAWANSA, 2010; ALMEIDA e O'BRIEN, 2013).

Até o momento, a etiopatogenia da OMB permanece incerta. A compreensão da desregulação da resposta imunológica mediada por aminobisfosfonatos, bem como a cinética e mecanismo de ação envolvidos na migração de neutrófilos que ocorre nesta doença, pode auxiliar e desenvolvimento de estratégias farmacológicas e adjuvantes na prevenção/tratamento dos eventos pró-inflamatórios pós-infusão de AZ e talvez até orientar formas de evitar ou atenuar esse complexo efeito colateral (OMB). Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o curso temporal de migração de neutrófilos e mediadores inflamatórios envolvidos neste processo, em mandíbulas de camundongos tratados com ácido zoledrônico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina – UFC (CEUA), com protocolo de N° 125/2016. Para a realização desta pesquisa foram selecionados 192 camundongos swiss machos (ENDELE et al., 2005), pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais receberam ração comercial balanceada própria e água *ad libitum*, foram mantidos em ciclos de luz-escuro de 12 horas e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante todo o experimento.

Cálculo amostral

Baseado na atividade de mieloperoxidase (MPO) na gengiva de animais tratados (5691.0 ± 3443.0) ou não (8.1 ± 10.7) com AZ observado pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2016), estimou-se necessário avaliar um total de 05 (cinco) animais por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que representasse 90% de poder e 95% de confiança sobre a hipótese nula deste trabalho (teste t de Student). Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra acresceu-se 20% (um animal) por grupo, totalizando 06 (seis) animais por grupo de estudo.

Protocolo experimental

Desenho do curso temporal do modelo experimental

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo experimental, baseado no estudo de SILVA et al. (2015), que através de desenho de curva dose resposta observou que a dose clínica para seres humanos transposta para animais, de 0,6 mg/kg de AZ, dividida em três infusões de 0,2 mg/kg é capaz de induzir OMB em modelo murino. Os animais foram divididos em dois grandes grupos experimentais:

- **Grupo 01:** animais tratados com solução salina (0,1ml/kg).
- **Grupo 02:** animais tratados com AZ (0,20mg/kg).

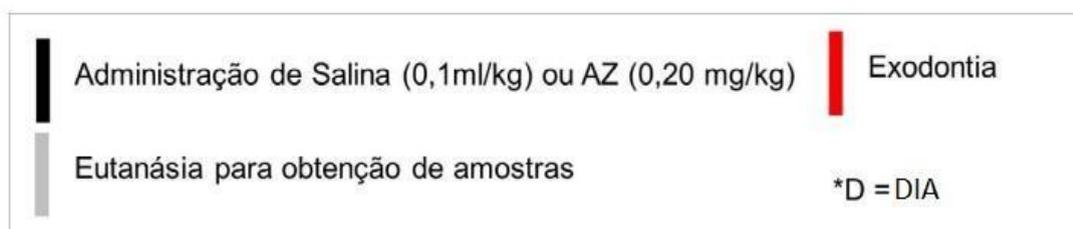
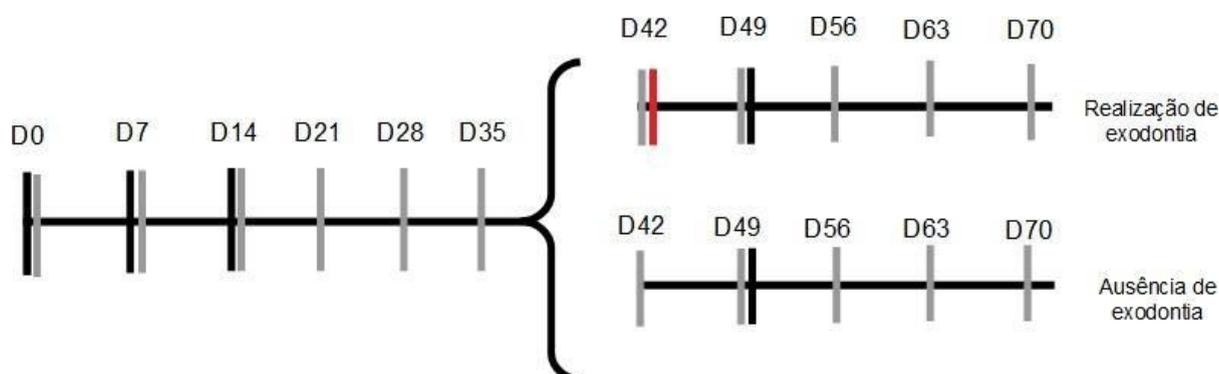


Figura 1: Protocolo experimental para delineamento do curso temporal de infiltração de neutrófilos em camundongos swiss tratados com AZ submetidos ou não à exodontia.

Cada um dos grupos experimentais (1 e 2) foram divididos em subgrupos. Essa divisão se fez necessária por conta do procedimento de exodontia, ao qual alguns animais não foram submetidos (dia 0 ao dia 35) e outros foram submetidos (do dia 42 ao dia 70). A divisão ocorreu da seguinte maneira:

Dia 0 ao dia 35 (6 semanas):

- Grupo 01: animais tratados com solução salina (0,1ml/kg)
 - Sem exodontia
- Grupo 02: animais tratados com AZ (0,20mg/kg)
 - Sem exodontia

Dia 42 ao dia 70 (5 semanas):

- Grupo 01: animais tratados com solução salina (0,1ml/kg)
 - Sem exodontia
 - Com exodontia
- Grupo 02: animais tratados com AZ (0,20mg/kg)
 - Sem exodontia
 - Com exodontia

A figura 1 ilustra o curso temporal do protocolo experimental, no qual os grupos e subgrupos citados acima foram submetidos. Durante o curso temporal, a eutanásia ocorreu nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70. Em cada um destes dias, 6 animais de cada subgrupo foram eutanasiados para realização dos ensaios de MPO e Elisa.

Tratamento com Ácido Zoledrônico e Modelo Experimental

Os animais receberam administração de três doses semanais consecutivas de AZ ou salina (D0, D7, D14) por meio da via caudal. Na semana seguinte à exodontia (D49), foi administrada uma dose adicional de AZ ou salina (via caudal). Um mês após a exodontia (D70), o protocolo entrou em desfecho (Figura 1).

Para a exodontia, os animais foram previamente anestesiados com quetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal. A sindesmotomia do 1º molar inferior esquerdo e direito foi realizada com auxílio de sonda exploradora, a luxação com uso de espátula Hollembach 3S e a extração com espátula Lecron-Zalle em movimento de alavanca (técnica adaptada de MAAHS et al., 2011 e ALVES et al., 2007). Após este procedimento, os animais foram mantidos em ambientes aquecidos para controle de hipotermia pós-anestesia e em observação dentro de caixas individuais. Destaca-se que este procedimento não gerou perda de sangue significativa que justificasse reposição hidroeletrólítica.

A eutanásia, que aconteceu semanalmente em todos os subgrupos avaliados, foi realizada com imobilização manual (dorso-cervical) e

administração de barbitúricos (Pentobarbital sódico, 150 mg/kg, via intravenosa), seguido de exsanguinação. Imediatamente após a eutanásia, as mandíbulas dos animais foram excisadas cirurgicamente. A hemimandíbula esquerda foi fixada em formol tamponado 10% e a hemimandíbula direita foi congelada em nitrogênio líquido para armazenamento em freezer -80 °C.

Todos os procedimentos foram realizados cegamente por um mesmo operador previamente treinado e os animais foram aleatorizados e pesados previamente.

Parâmetros de análise

Ensaio de quantificação de Mieloperoxidase (MPO)

Afim de avaliar o perfil neutrofílico, a hemimandíbula direita foi utilizada para ensaio de MPO. Às amostras foi acrescido 250µL de solução NaPO₄ 0,2M (ph = 4,7) para maceração em nitrogênio líquido. Depois da maceração, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi separado e imediatamente congelado em freezer -80°C. Aos pallets foi adicionado 1 ml de solução lisante (NaCl 0,2%) e mantida no agitador por 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas (3000rpm, 15minutos) e o sobrenadante foi descartado (MORETTI et al., 2015; LIMA JUNIOR et al., 2011).

Adicionou-se 250µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) aos pallets e o homogenato foi macerado por 30 segundo a 4°C. Após a última maceração, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos para o plaqueamento.

Placas de 96 poços foram incubadas em duplicata com 25µL do homogenato e 25µL de diluente (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina, H₂O₂, PBS) e a reação foi interrompida 5 minutos depois com ácido sulfúrico. As placas foram lidas em leitor de ELISA (450nm) e alterações de absorbância foram plotadas em uma curva padrão de neutrófilos e expressas em forma de neutrófilos/mg de tecido (WIMALAWANSA, S. J., 2010).

Dosagem de citocinas do sobrenadante do macerado das mandíbulas – Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA)

Após análise dos dados do ensaio de mieloperoxidase, o sobrenadante obtido da maceração das mandíbulas foi utilizado para dosagem de mediadores inflamatórios e fatores de transcrição associados a migração de neutrófilos em dias previamente selecionados.

As concentrações de NF- κ B, TNF- α e IL-1 β foram determinadas por ELISA. As placas de microtitulação foram revestidas durante a noite a 4 ° C com os seguintes anticorpos de camundongo: anti- NF- κ B, anti-TNF- α e anti-IL-1 β (Dako®, 1: 1000, albumina de soro bovino) BSA 1%). Após lavagem (três vezes) e bloqueio das placas (BSA a 1%, 2h), as amostras (obtidas a partir do sobrenadante do ensaio de MPO) foram incubadas à temperatura ambiente durante 1h. As placas foram lavadas três vezes com tampão, seguida de adição do anticorpo secundário policlonal (Sigma® 1: 1.000, BSA 1%).

Após incubação adicional à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 μ l de avidina-HRP (Abcam®, 1: 5.000) foram adicionados. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD; Biosystems®, 50 μ l) foi adicionado 15 min depois, e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 45 min para o TNF- α e 20 min para IL-1 β . A reação enzimática foi terminada com H₂SO₄ e a absorvância foi medida a 490 nm. Os resultados são expressos em pg/mg de tecido e são relatados como média \pm EP em uma curva padrão de cada citocina avaliada (LIMA JÚNIOR et al., 2011).

Delineamento estatístico

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

Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prism® 5.0 e o índice de significância $p < 0.05$ será adotado em todas as avaliações.

RESULTADOS

Dosagem de mieloperoxidase

O grupo tratado com solução salina não submetido a exodontia não mostrou variação significativa dos níveis de MPO ao longo do curso temporal, iniciando em D0 com uma dosagem média de $1,60 \pm 0,14$ e terminando o curso temporal com $2,4 \pm 0,24$ ($p=0,100$). Quando a exodontia foi realizada, pôde-se observar um aumento significativo dos níveis de MPO no dia 42 ($12,10 \pm 1,15$) em relação aos dias 35 ($2,80 \pm 0,39$) e aos demais dias anteriores ($p < 0,001$). Na semana seguinte (D49) os níveis de MPO retornaram aos valores basais, não apresentando diferença significativa com os demais dias do protocolo experimental.

Nos grupos tratados com AZ pôde-se observar um aumento significativo dos níveis de MPO de D0 ($2,20 \pm 0,09$) para D7 ($5,40 \pm 0,51$), mantendo-se num platô que não mostrou variação significativa a partir de D14 ($6,50 \pm 0,43$) até D70 ($8,40 \pm 0,83$) ($p < 0,001$). Quando submetido à exodontia, o grupo tratado com AZ mostrou um incremento significativo dos níveis de MPO no dia do procedimento (D42 = $15,60$), decrescendo significativamente na semana seguinte (D49 = $11,40 \pm 1,26$) e mantendo valores significativamente mais altos em relação a semana anterior a exodontia (D35 = $7,90 \pm 0,41$) até o D70 ($11,70 \pm 1,27$) ($p < 0,001$).

O grupo tratado com salina submetido à exodontia mostrou um pico significativo de MPO em relação ao grupo não submetido à exodontia no dia da extração dentária (D42 = $12,10 \pm 1,15$ versus $1,90 \pm 0,40$), não mostrando diferença com os demais dias a partir do D49 até o desfecho do protocolo (D70). O grupo tratado com AZ mostrou, a partir do D7, valores significativamente mais altos que os grupos tratados com solução salina em todos os momentos do curso temporal ($p < 0,001$). Quando submetido à exodontia, o grupo tratado com AZ também mostrou pico de neutrofilia em D42 ($15,60 \pm 0,58$), com valores significativamente maiores que todos os demais grupos. Na semana seguinte a exodontia (D49), o grupo tratado com AZ apresentou uma discreta redução dos níveis de MPO, entretanto, ainda mantendo níveis significativamente maiores que os animais tratados com AZ e

não submetidos a exodontia. Destaca-se, ainda, que estes níveis elevados (AZ+exodontia), a partir do D49, estabeleceram um novo platô, mantendo-se superiores a todos os outros grupos experimentais, até o desfecho do protocolo.

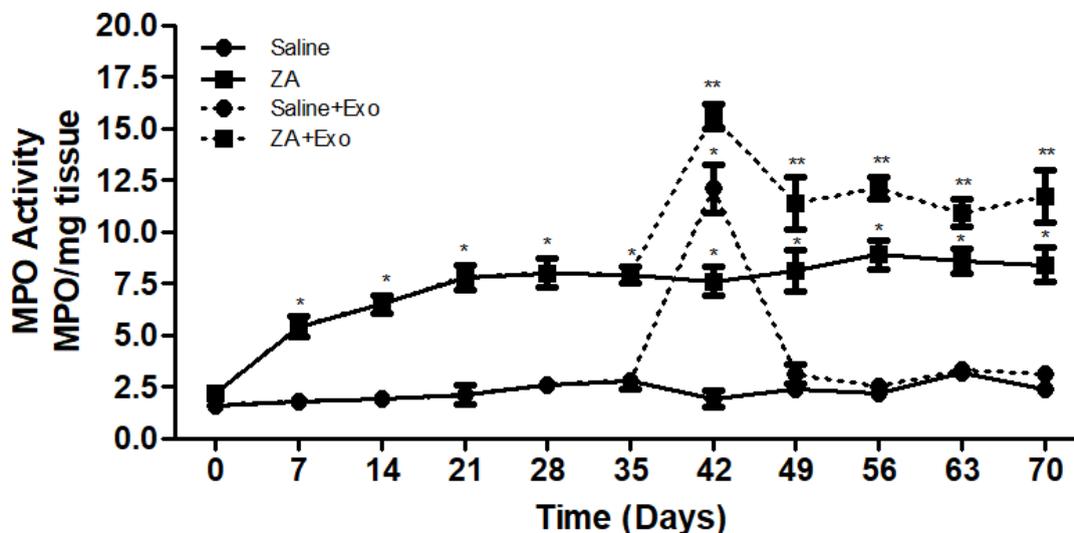


Figura 2: Dosagem de MPO em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não a exodontia do primeiro molar inferior direito.

* $p < 0,05$ versus grupo salina sem exodontia; ** $p < 0,05$ versus demais grupos de estudo (média \pm EPM); Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

Dosagem de TNF- α

Após a avaliação da quantificação de mieloperoxidase, foram selecionados os dias 0, 21, 42 e 56 para dosagem de mediadores inflamatórios, por se tratarem de dias relevantes para o entendimento do curso temporal, já que representam o início do protocolo (D0), a finalização das primeiras infusões (D21), a realização das exodontias (D42), e a semana que sucedeu a última infusão de AZ ou salina (D56).

O grupo tratado com solução salina não apresentou grandes variações nos níveis de TNF- α ao longo do curso temporal nos dias avaliados. Quando submetido à exodontia, os níveis de TNF- α subiram significativamente em D42 (189,00 \pm 7,65), havendo redução significativa destes níveis em D56 (15,20 \pm 0,98), retornando aos valores basais observados no D0 ($p < 0,001$).

O grupo tratado com AZ mostrou aumento significativo dos níveis de TNF- α em D21 (51,30 \pm 2,85) quando comparado ao D0 (12,60 \pm 0,99). Esses

níveis permaneceram significativamente elevados em D42 ($42,10 \pm 3,26$) e D56 ($42,30 \pm 2,19$) ($p < 0,001$). Quando submetido à exodontia, os níveis de TNF- α em D42 subiram significativamente em relação ao D21 ($287,20 \pm 14,39$), reduzindo também significativamente em D56 ($137,10 \pm 4,21$) quando comparados ao D42, porém, ainda, mantendo níveis mais altos quando comparado aos dias iniciais de avaliação (D0 e D21) ($p < 0,001$).

No D0 não houve diferença significativa dos níveis de TNF- α do grupo tratado com salina ou AZ ($p = 0,602$), porém no D21 os animais tratados com AZ apresentaram valores de TNF- α significativamente superiores ao grupo tratado com salina ($p < 0,001$). No D42 o grupo tratado com AZ e submetido à exodontia apresentou níveis maiores de TNF- α do que os grupos tratados com AZ não submetidos à exodontia, e estes mostraram valores significativamente superiores ao grupo tratado com salina submetido ou não à exodontia ($p < 0,001$). No D56 os dois grupos tratados com salina submetidos ou não à exodontia mostraram valores significativamente menores de TNF- α que os grupos tratados com AZ e AZ submetidos à exodontia, apresentando este último os valores mais elevados de TNF- α .

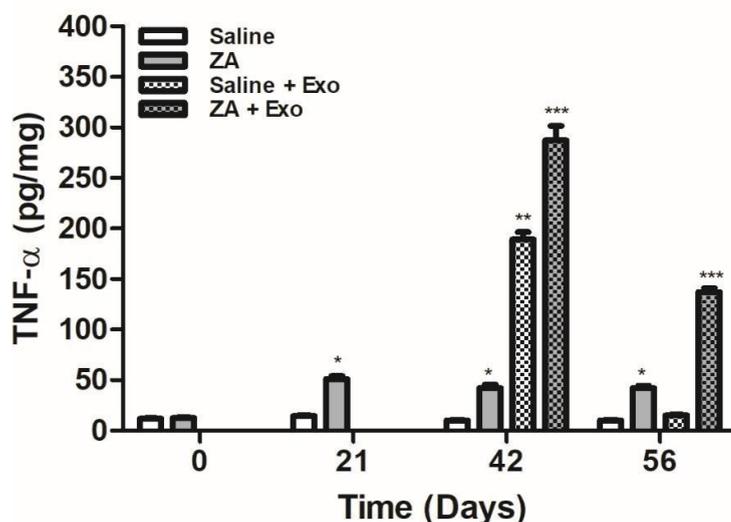


Figura 3: Dosagem de TNF- α em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não a exodontia do primeiro molar inferior direito.

* $p < 0,05$ versus grupo salina sem exodontia; ** $p < 0,05$ versus grupos salina e ZA sem exodontia; *** $p < 0,05$ versus demais grupos de estudo, no mesmo dia de avaliação (média \pm EPM); Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

Dosagem de IL-1 β

O grupo tratado com solução salina e não submetido à exodontia não mostrou variação significativa dos níveis de IL-1 β ao longo do curso temporal: D0 (11,10 \pm 0,70), D21 (15,20 \pm 0,78), D42 (13,20 \pm 0,83) e D56 (13,35 \pm 1,09) ($p=0,212$). Após a exodontia este grupo apresentou aumento significativo dos níveis de IL-1 β em D42 (99,00 \pm 4,36), com redução significativa em D56 (22,40 \pm 2,47).

Os animais tratados com AZ mostraram aumento dos níveis de IL-1 β de D0 (11,60 \pm 0,87) para D21 (35,40 \pm 2,40), mantendo-se esses valores elevados em D42 (34,10 \pm 1,58) e D56 (36,00 \pm 2,30) ($p<0,001$). Após a exodontia, os níveis de IL-1 β no grupo tratado com AZ apresentaram incremento significativo em D42 (115,30 \pm 5,88) com redução em D56 (69,20 \pm 4,12). Ainda assim, os valores de IL-1 β neste grupo permaneceram mais elevados que o período basal (D0) e pós infusão do AZ (D21) ($p<0,001$).

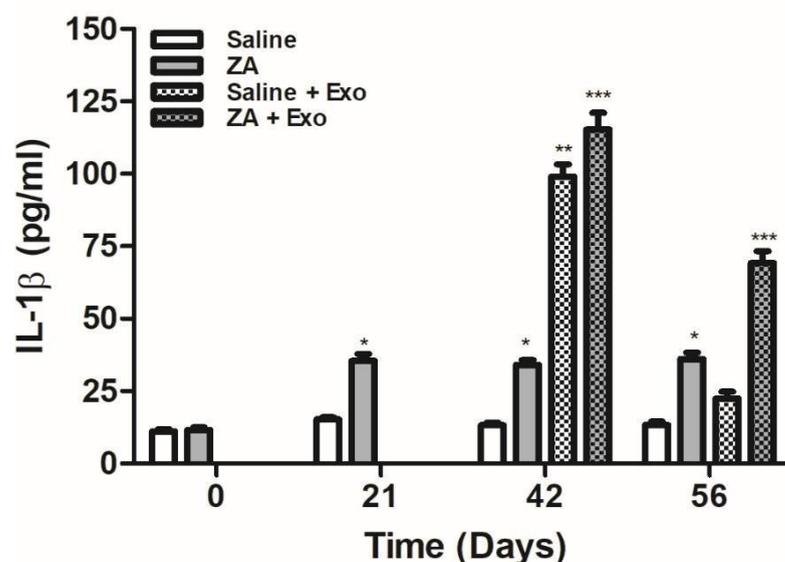


Figura 4: Dosagem de IL-1 β em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não a exodontia do primeiro molar inferior direito.

* $p<0,05$ versus grupo salina sem exodontia; ** $p<0,05$ versus grupos salina e AZ sem exodontia; *** $p<0,05$ versus demais grupos de estudo, no mesmo dia de avaliação (média \pm EPM); Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

Em D0 ($p=0,632$) não houve diferença significativa dos níveis de IL-1 β entre os grupos salina e AZ. Após a infusão do AZ, os níveis de IL-1 β neste grupo foram significativamente superiores ao grupo salina em D21 ($p<0,001$). No D42, o grupo tratado com AZ e submetido à exodontia apresentou níveis de IL-1 β significativamente maiores que os demais grupos experimentais. Seguindo deste, o grupo salina tratado com exodontia apresentou valores maiores que os demais, e o grupo tratado apenas com AZ e sem exodontia apresentou níveis médios de IL-1 β superiores ao grupo tratado com salina e não submetido à exodontia ($p<0,001$). Em D56, os grupos tratados com salina submetidos ou não à exodontia não mostraram diferença nos níveis de IL-1 β , no entanto, os níveis de IL-1 β foram maiores no grupo tratado com AZ e mais elevados ainda no grupo tratado com AZ e submetido à exodontia ($p<0,001$).

Dosagem de NF-kB

O grupo tratado com solução salina e não submetido à exodontia evidenciou variações dos níveis de NF-kB ao longo do curso temporal. O grupo tratado com AZ mostrou aumento dos níveis de NF-kB em relação ao D0 ($8,20\pm0,72$), a partir de D21 ($45,30\pm1,92$), mantendo esses valores significativamente mais elevados em D42 ($46,40\pm4,23$) e D56 ($36,30\pm2,60$) ($p<0,001$).

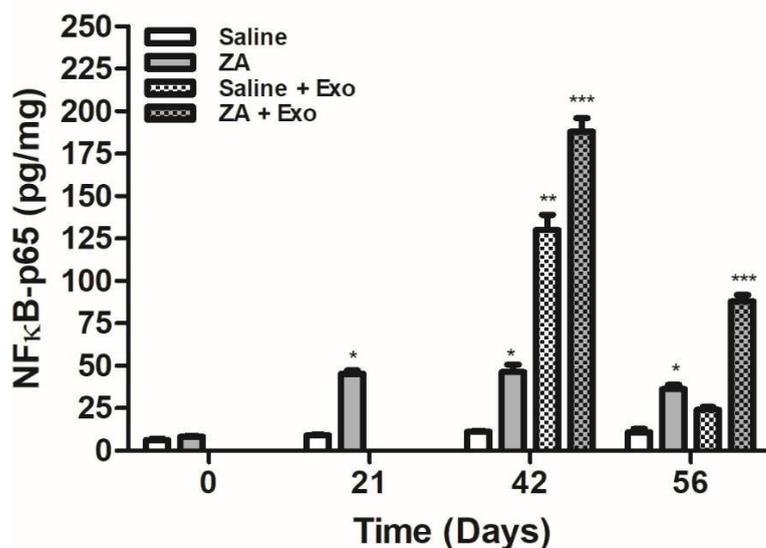


Figura 5: Dosagem de NF-kB em tecido ósseo de camundongos tratados ou não com ácido zoledrônico e submetidos ou não a exodontia do primeiro molar inferior direito.

* $p < 0,05$ versus grupo salina sem exodontia; ** $p < 0,05$ versus grupos salina e ZA sem exodontia; *** $p < 0,05$ versus demais grupos de estudo, no mesmo dia de avaliação (média \pm EPM); Teste ANOVA-2-way/Bonferroni.

Após ser submetido à exodontia, o grupo salina apresentou maiores níveis de NF-kB em D42 (130,10 \pm 8,91) que em D0, com queda significativa em D56 (24,10 \pm 1,73). O grupo AZ submetido à exodontia apresentou maiores níveis de NF-kB em D42 (188,00 \pm 8,03) e apesar de queda significativa em D56 (88,00 \pm 3,67), esses níveis foram significativamente maiores que antes da exodontia (D0 e D21).

Não houve diferença significativa nos níveis de NF-kB entre os grupos salina e AZ em D0 ($p=0,127$), com elevação significativa no grupo AZ ($p < 0,001$) em D21. Em D42, o grupo AZ submetido à exodontia apresentou os maiores valores de NF-kB, seguido do grupo salina submetido à exodontia, seguido do grupo AZ sem exodontia e salina sem exodontia, respectivamente, com diferença estatística entre todos os grupos ($p < 0,001$). Em D56, o grupo AZ submetido à exodontia também apresentou as maiores médias de NF-kB, seguido, desta vez, do grupo tratado apenas com AZ, seguido do grupo salina submetido à exodontia e do grupo salina sem exodontia, respectivamente, com diferença estatística entre todos os grupos ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Os aminobisfosfonatos, em especial o AZ, inibem a reabsorção óssea por indução de apoptose dos osteoclastos (WOO & KALMAR, 2007) e tem sido sugerido que diminuição do turnover ósseo nos maxilares seja o principal mecanismo envolvido no desenvolvimento de OMB (SILVERMAN & LANDESBURG, 2009).

O AZ, quando administrado cronicamente, pode desregular o sistema imunológico e aumentar o número de células inflamatórias e níveis de citocinas pró-inflamatórias (ROSSINI et al., 2012; NORTON et al., 2012; WELTON et al., 2013). SENEL et al. (2010) observaram que a intensidade do infiltrado inflamatório em mandíbulas de ratos tratados com AZ não submetidos à exodontia ocorria proporcionalmente a dose final administrada. Assim, é provável que haja relação entre a leucocitose induzida pelo AZ com a migração leucocitária nos maxilares e, conseqüentemente, este seja um importante fator de desenvolvimento da OMB (SILVA, 2013).

Essas alterações no número de células inflamatórias e níveis de citocinas pró-inflamatórias corroboram com o presente estudo, no qual a infusão de AZ aumentou significativamente os níveis de NF- κ B, TNF- α e IL-1 β no tecido ósseo dos camundongos tratados com AZ, juntamente de um aumento de polimorfonucleares neutrófilos, verificado por meio do ensaio de MPO.

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína lisossomal presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, e possui papel fundamental na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Existem fortes evidências que alguns produtos gerados a partir de reações catalisadas por MPO tenham papel na sinalização celular (CRUZ, 2011).

Neste estudo, a atividade da MPO foi significativamente aumentada no osso mandibular dos grupos tratados com AZ, provavelmente porque o TNF- α e a IL-1 β são importantes na quimiotaxia de neutrófilos (GRAVES E JIANG, 1995), e a ativação de NF- κ B é o principal responsável pelo aumento destas citocinas (BARROS SILVA et al., 2016). Essa afirmação se torna mais

evidente quando se observa que o aumento dos níveis da MPO é concomitante com o aumento dos níveis de NF-kB, TNF- α e IL-1 β no D42; e a redução da MPO no D56 (quando comparada com o dia da exodontia) acompanha a redução de NF-kB, TNF- α e IL-1 β , também no D56. Com isso, sugere-se que a indução de algumas quimiocinas de maneira dependente de TNF- α e IL-1 β contribui para o aumento de neutrófilos e possíveis danos locais causados pela administração sistêmica de AZ (VASCONCELOS et al., 2016).

Os animais tratados com AZ mostraram aumento dos níveis de IL-1 β , NF-kB e TNF- α de D0 para D21. Esses achados se assemelham com os resultados do estudo de SILVA et al. (2017) e de NORTON et al. (2012) que mostraram aumento significativo de IL-1 β e TNF- α em tecido gengival de animais tratados com AZ, e aumento do número de neutrófilos e monócitos, por uma via dependente da liberação de Interleucina 1, respectivamente.

É importante ressaltar que a quantidade de neutrófilos por mg/tecido apresentou aumentos consecutivos com a progressão das três doses semanais de AZ, o que sugere uma expressão inflamatória dose-dependente nas quatro primeiras semanas do protocolo experimental. Este fato se repete no D56, onde o incremento dos níveis de MPO foram precedidos de uma administração adicional de AZ na semana anterior (D49).

A partir do dia 42, após o procedimento de exodontia, os grupos tratados com AZ apresentaram marcante elevação de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias. Sabe-se que o AZ fica aderido irreversivelmente à hidroxiapatita do tecido ósseo (ENDELE et al., 2005), e este processo talvez possa induzir uma hiperexpressão local de TNF- α e IL-1 β , provavelmente mediado ou com participação de NF-kB, o qual culmina em migração de neutrófilos para os ossos gnáticos e estabelece o estado hiperinflamatório local.

Depois que um dente é extraído, observa-se aumento da expressão de TNF- α . O TNF- α se liga ao seu receptor, o TNFR, estimulando uma cascata de fosforilações que culmina com a ativação do NF-kB (KON et al., 2001; BALGA, 2006). A secreção rápida e bem regulada de moléculas pró-inflamatórias, após uma lesão aguda, é fundamental para a reparação do

tecido (HANLEY et al., 2000). Elas estimulam a osteoclastogênese e a reabsorção do tecido lesado e posterior neoformação óssea com uma redução das citocinas pró-inflamatórias para os níveis basais após 10 dias (KIM et al, 2012). Isso explica a diminuição significativa da MPO no grupo tratado com solução salina na semana pós-exodontia.

A administração de AZ parece induzir uma quebra de homeostase e prejuízo no reparo. Quando observado o grupo salina, os animais que sofreram exodontia (D42) apresentaram uma elevação transitória de MPO, NF-kB e citocinas (TNF- α e IL-1 β), retornando aos níveis basais na semana posterior (D49). Diferentemente, os animais do grupo AZ apresentaram elevação de MPO, NF-kB e citocinas (TNF- α e IL-1 β) na semana da exodontia (D42), entretanto, quando comparado aos animais do grupo AZ sem exodontia, observa-se que os níveis de todos esses marcadores inflamatórios não retornaram aos níveis basais no D49. Além disso, estes marcadores inflamatórios permanecem elevados e acima dos níveis basais até o D70. Estes achados sugerem que a exodontia nos animais tratados com AZ produz uma desregulação inflamatória adicional, levando ao desenvolvimento de um novo platô, com incremento de marcadores inflamatórios de forma sustentada.

A expressão desses marcadores em mandíbula de ratos já foi observada na literatura (BARROS SILVA et al., 2016), através de aumento de alguns marcadores inflamatórios agudos, como TNF- α , IL-1 β , iNOS, ativação de NF-kB e número de neutrófilos e macrófagos (células CD68 positivas), sem elevação de mastócitos, todos esses achados detectados ao final do protocolo (D70), semelhante ao utilizado no estudo atual. Esses achados corroboram com o presente trabalho e com outros que evidenciaram aumento na produção de citocinas pelos macrófagos por meio da ativação do NF-kB (MURATSU et al., 2013), elevação de TNF- α (CHEUNG et al., 2011), IL- 1 β (BONEWALD, 2004; BAKKER et al, 2009) e estresse oxidativo, bem como aumento da atividade da iNOS (ALMEIDA e O'BRIEN, 2013). O grande diferencial dessa pesquisa é que as análises foram feitas semanalmente, permitindo a capacidade de um delineamento do comportamento inflamatório ao longo de cada semana do estudo, mostrando o momento onde essas células e citocinas

aparecem, detectando a formação de um platô inflamatório; e quando reduzem, porém sem retornar os níveis basais.

Como já mencionado anteriormente, o procedimento de exodontia por si só promove liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento de células inflamatórias locais. A apoptose de osteoclastos induzida pelo AZ já é conhecida, e talvez possa acrescentar efeitos pró-inflamatórios, auxiliando a perpetuar e suprarregular mediadores pró-inflamatórios, além de promover infiltração e ativação de macrófagos (KOGIANNI et al., 2008; HARRE et al., 2012).

A OMB está diretamente associada à condição pró-inflamatória. Esta é uma alteração dose-dependente, e associada com leucocitose (SILVA et al., 2015). Mais de 81,6% dos casos de OMB estão associados com inflamação. Assim, a imunodesregulação pode desempenhar um papel fundamental na patogênese da OMB.

O presente grupo de pesquisa já evidenciou que o infliximabe, por exemplo, na dose de 5 mg/kg é capaz de reduzir o infiltrado neutrofílico em gengiva de ratos submetidos à exodontia. Tendo em vista que o AZ leva a aumento na síntese de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6 (MURATSU et al., 2013), e que essas vias comuns, juntamente com a via da ciclooxygenase-2, contribuem com a migração de neutrófilos, torna-se imprescindível a realização de estudos com o objetivo de modular essas vias, no intuito de alterar o estado pró-inflamatório local, bem como o influxo de neutrófilos. Estas investigações podem contribuir com futuros protocolos de tratamento ou prevenção desta condição.

4. CONCLUSÃO GERAL

A infusão crônica de AZ elevou a presença de células inflamatórias (neutrófilos) e de mediadores inflamatórios (NF- κ B, TNF- α e IL-1 β) em animais não submetidos à exodontia, e superelevou a presença dessas células e mediadores quando houve associação de AZ com exodontia. Ressalta-se, ainda, que essa expressão aumentada de neutrófilos e mediadores inflamatórios supracitados permaneceu elevada (até o final do protocolo experimental) nos animais tratados com AZ e submetidos à exodontia. Esses dados contribuem para a hipótese de que o AZ pode promover uma alteração inflamatória imunológica local e facilitar a instalação da OMB.

5. REFERÊNCIAS

- AAPRO, M et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumors: recommendations of an international expert panel. *Annals of Oncology*, v. 19, n. 3, p. 420–432, 2008.
- ALI-ERDEM, M. et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, v. 16, n.7, p. 879-883, 2011.
- ALMEIDA, M.; O'BRIEN, C. A. Basic Biology of Skeletal Aging: role of stress response pathways. *Journals of Gerontology. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. v. 68, n.10, p. 1197-1208, 2013.
- ALVES, A. P., PESSOA, C. D. O., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES FILHO, M. O. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. *Acta Cir Bras* 2007; 22(6):457–64.
- ANDREASEN, J. O. Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *Journal of Endodontics*, v.7, n.7, p.294-301, 1981.
- ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *The Journal of Immunology*, v. 160, n.1, p. 403-409, 1998.
- BAGAN, J. et al. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 42, n.5, p. 405-408, 2013.
- BARROS SILVA, P. G., BRIZENO L., et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Disease*. 2016; 22:649-657.
- CLÉZARDIN, P. Anti-tumour activity of zoledronic acid. *Cancer Treatment Reviews*, v. 31, n. 3, p. S1-S8, 2005.
- CONTE NETO, N., SPOLIDORIO, L. C., ANDRADE, C. R. et al. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol*, 94: 65–73, 2013.

- COSTA, K. M. et al. Pharmacological Inhibition of CXCR2 Chemokine Receptors Modulates Paraquat-Induced Intoxication in Rats. *PLoS One*; v.9, n.8, p. e105740, 2014.
- ENDELE, R.; LOEW, H.; BAUSS, F. Analytical methods for the quantification of ibandronate in body fluids and bone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n.1-2, p. 246-256, 2005.
- 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.
- FERREIRA JUNIOR, A. E. C. *Avaliação da influência da terapia por infliximabe na cicatrização óssea de alvéolos dentários pós-exodontia em ratos*. 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, 2016.
- FLEISCH, H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Endocrine Reviews*, v. 19, n. 1, p. 80–100, 1998.
- GONÇALVES, L. N. et al. N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an early biomarker of renal dysfunction due to occupational exposure to inorganic lead. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 44, n. 4, p. 241-247, 2008.
- GRAVES, D. T.; JIANG, Y. Chemokines: a family of chemotactic cytokines. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, v. 6, n.2, p. 109-118, 1995.
- GUPTARAK, J. et al. Inhibition of IL-6 signaling: a novel therapeutic approach to treating spinal cord injury pain. *Pain*, v. 154, n.7, p. 1115-1128, 2013.
- 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.
- HARRE, U., IPSEIZ, N. et al. (2012) Moonlighting osteoclasts as undertakers of apoptotic cells. *Autoimmunity* 45, 612–9. 2012.

- HIRAGA, T et al., Administration of the Bisphosphonate Zoledronic Acid During Tooth Development Inhibits Tooth Eruption and Formation and Induces Dental Abnormalities in Rats. *Calcified Tissue International*, v. 86, n.6, p. 502–510, 2010.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.
- JUNG, A.; BISZA, S.; FLEISCH, H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcified Tissue Research*, v.11, n. 4, p. 269-80, 1973.
- KIM, Y. S., SEO, H. W. Reactive oxygen species promote heat shock protein 90-mediated HBV capsid assembly. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 457:328-333.
- KOGIANNI, G., MANN, V., NOBLE, B. S. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of Bone and Mineral Research* 23, 915–27. 2008.
- KUIPER, J. W. P. et al. Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 165, n.2, p. 532–539, 2012.
- LESCLOUS, P. et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone*, v. 45, n. 5, p. 843-852, 2009.
- LIMA JUNIOR R. C., FREITAS H. C., et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012; 69:931-942.
- LOPEZ-JORNET, P. et al. Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 69, n.10, p. 2488-2493, 2011.
- LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Zoledronic Acid: a review of its use in breast cancer. *Drugs*, v. 68, n. 18, p. 2661-2682, 2008.

- MAAHS, M. P. et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head & Neck*, v. 33, n.2, p. 199-207, 2011.
- MARINO, K. L. et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Journal of Oral Implantology*, v. 38, n. S1, p. 511-518, 2012.
- MASSA, L. F.; BRADASCHIA-CORREA, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 54, n.6, p. 713–725, 2006.
- MISSO, G. et al. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biology & Therapy*, v. 13, n.14, p. 1491–1500, 2012.
- MOGHADAM, S. E. et al. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 38, n. 8, p. 639–643, 2009.
- MORETTI, S. et al. Fine-tuning of Th17 Cytokines in Periodontal Disease by IL-10. *Journal of Dental Research*, v. 4, n.9, p. 1267-1275, 2015.
- MURATSU, D. et al. Zoledronic acid enhances lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory reactions through controlled expression of SOCS1 in macrophages. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, p. e67906, 2013.
- NAIDU, A. et al. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 106, n.1, p. 5–13, 2008.
- NORTON, J. T. et al. Cutting edge: nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. *The Journal of Immunology*, v. 188, n.7, p. 2977-2980, 2012.
- OLIVEIRA, C. C. *Avaliação do efeito da dexametasona e da nimesulida na quimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico em ratos*. 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.

- ROGERS, M. J. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Cancer*, v. 88, n. 12, p. 2961-2978, 2000.
- ROSSINI, M. et al. Long-term effects of amino-bisphosphonates on circulating $\gamma\delta$ T cells. *Calcified Tissue International*, v. 91, n.6, p. 395-399, 2012.
- RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics*, v. 119, n.2, p. S150-S162, 2007.
- RUSSELL, R. G. G.; CROUCHER, P. I.; ROGERS, M. J. Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporosis International*, v. 9, n.2, p. S66–S80, 1999.
- SCHELLER, E. L. et al. Zoledronic acid inhibits macrophage SOCS3 expression and enhances cytokine production. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 112, n.11, p. 3364–3372, 2011.
- SCHEPER, M. et al. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *British Journal of Haematology*, v. 144, n.5, p. 667–676, 2009.
- SCHEPERS, A. et al. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 26, n.9, p. 2063-2069, 2006.
- SENEL, F. C., DUMAN, M., MUCI, E., et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010; 109(3):385–91.
- SERENO, J. et al. Preventive but Not Curative Efficacy of Celecoxib on Bladder Carcinogenesis in a Rat Model. *Mediators of Inflammation*, v.2010, p. 1-11, 2010.
- SILVA, P. G. B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*, v. 60, p. 1237-1245, 2015.
- SILVERMAN, S. L.; LANDESBURG, R. Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. *American Journal of Medicine*, v.122, n.2, p. 33–45, 2009.
- SONIS, S. T. 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 Oncology*, v. 45, n.2, p. 164-172, 2009.
- TSAO, C. et al. Oral Health Risk Factors for Bisphosphonate-Associated Jaw Osteonecrosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v. 71, n.8, p. 1360-1366, 2013.
- VASCONCELOS, A. C., AZAMBUJA, A. A. et al. Comparison of effects of clodronate and zoledronic acid on the repair of maxilla surgical wounds – histomorphometric, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, osteoprotegerin, von Willebrand factor, and caspase-3 evaluation. *J Oral Pathol Med*. 41: 702–712, 2016.
- WEI, T. et al. Acute versus chronic phase mechanisms in a rat model of CRPS. *Journal of Neuroinflammation*, v. 13, n.1, p. 14, 2016.
- WELTON, J. L. et al. Monocytes and $\gamma\delta$ T cells control the acute-phase response to intravenous zoledronate: insights from a phase IV safety trial. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 28, n.3, p. 464-471, 2013.
- WIMALAWANSA, S. J. Nitric oxide and bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1192, p. 391-403. 2010.
- WOLF, A. M.; TILG, H.; GUNSILIUS, E. The effect of zoledronic acid on the function and differentiation of myeloid cells. *Haematologica*, v. 91, n.9, p. 1165–1171, 2006.
- WOO, S. B.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Systematic Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. *Annals of Internal Medicine*, v. 144, n.10, p. 753-761, 2006.
- YU, P. et al. Hydrogen-rich medium protects human skin fibroblasts from high glucose or mannitol induced oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 409, n.2, p. 350-355, 2011.

6. ANEXOS

ANEXO A - SEGMENTO DO REGIMENTO INTERNO ARTIGO 46

As dissertações apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou ainda não submetidos para publicação em periódicos científicos, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação. §1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, devendo assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto *intitulado* "ESTUDO DOS MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM MANDÍBULAS DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO.", protocolo nº 125/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota, 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 nº11.794, de 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 adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 05 de abril de 2017.

Vigência do projeto	05/05/2017 a 05/05/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo swiss
Nº de Animais	192
Peso/Idade	20 a 30g
Sexo	Machos
Origem	Biotério do NPDM

Fortaleza, 05 de abril de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

ALEXANDRE HAVT BINDÁ

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM

ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1668862