



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

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA COELHO

O PAPEL DE BIOFILMES MICROBIANOS NA OSTEOQUIMIONECROSE DO
OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

FORTALEZA

2019

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA COELHO

**O PAPEL DO MICRO-ORGANISMO NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO
MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

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

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

FORTALEZA

2019

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

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

C615p Coelho, Camila Carvalho de Oliveira.
O papel de biofilmes microbianos na osteoquimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico / Camila Carvalho de Oliveira Coelho. – 2019.
116 f. : il. color.

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

1. Osteonecrose Associada a Bisfosfonatos. 2. Bactérias. 3. Gnobióticos. I. Título.

CDD 617.6

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA COELHO

**O PAPEL DO MICRO-ORGANISMO NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO
MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando André Campos Viana

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof.^a Dr.^a Márcia Maria de Negreiros Pinto Rocha

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

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

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

AGRADECIMENTO

A **Deus**, por ser fonte inesgotável de força e inspiração para seguir sonhos e ter coragem para realizá-los. Por ser guia, luz e esperança; por ser motivação em seguir o caminho da bondade e da fé.

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

A **Anderson Chagas**, meu marido, que, de forma especial e carinhosa, foi compreensivo e paciente. Obrigada por ser meu porto seguro, por toda a tranquilidade, força e persistência que me traz.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo, alegrias e aprendizados compartilhados. Principalmente, à gêmea, **Milena**, por me ensinar, nas semelhanças e diferenças.

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

À minha orientadora, **Professora Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, pela dedicação, pela disponibilidade, pelo incentivo e pelos ensinamentos de profissional e de vida. Obrigada por nos ser guia e inspiração para crescermos como profissionais, éticos e humanos, e como pessoas de bem. Serei sempre grata por toda a convivência e pelo crescimento científico e pessoal, ficando sempre na memória o carinho, os sorrisos e os bons momentos de descontração.

Ao **Professor Mário Rogério Lima Mota**, por transmitir inúmeros conhecimentos de maneira generosa, animada e disponível. Por estar sempre disposto a ajudar e dirimir as dúvidas mais inusitadas, por nos orientar e inspirar com tanto amor pela ciência.

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

Ao **Professor Ronaldo de Albuquerque (In Memoriam)**, idealizador do início desse projeto, por investir com confiança nessa linha de pesquisa experimental, pela disponibilidade em nos direcionar e pelo vínculo formado com o Laboratório de Patologia Bucodental.

Ao **Professor Roberto César Pereira Lima Júnior**, pela contribuição científica na construção do projeto de pesquisa, por ser grande incentivador e parceiro dessa linha de pesquisa.

Ao Professor **Fernando André Campos Viana**, em nome da **Universidade de Fortaleza (UNIFOR)**, pela dedicação, apoio e incansável ajuda na idealização e realização deste trabalho junto à instituição parceira. À **UNIFOR**, pela parceria científica e por fornecer condições para realização de parte dessa pesquisa.

Ao **Professor Frederico Barbosa de Sousa**, do Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica Histologia Humana, **da Universidade Federal da Paraíba**, e ao seu aluno de pós-graduação, **Basílio Rodrigues Vieira**, pela disponibilidade na realização das microtomografias para este trabalho.

À Professora **Rita de Cássia Carvalho Barbosa**, pela enorme contribuição na interpretação de dados microbiológicos deste estudo.

Ao **Professor Paulo Goberlânio Barros Silva**, pela disponibilidade em ajudar, pelo apoio estatístico do presente estudo e por me incentivar durante essa caminhada. Obrigada pelo ser humano forte, inteligente e humilde, que nos faz aprendizes sempre.

Aos colegas de doutorado **Nadine, Sarah, Jacqueline, Rebecca, Daniela, Thompson, Ealber**, por partilhar aprendizados, disciplinas e pela boa convivência em meio à vida corrida.

À pós-graduanda **Wanessa Régis**, pelo auxílio em etapas microbiológicas deste trabalho, sempre com disponibilidade e resolutividade.

Aos técnicos de laboratório **Alceu e Débora**, pela disponibilidade e pelo auxílio nas etapas laboratoriais desse estudo.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação e da Faculdade de Odontologia **Rui, Lúcia, David, Soninha (In Memoriam), Joana, Rafael**, pelos serviços prestados.

Aos **colegas** do Laboratório de Patologia Bucodental **Isabelly, Thinali, Karine, Pedro Henrique, Ronildo, Diego, João Eudes, Erasmo, Khalil, Thaís, Ealber, Thâmara, Stephanie**, pela amizade, companhia e troca de experiências.

Aos amigos **Mariana, Carol, Ana Laryssa, Malena e Thales**, pelo vínculo iniciado na convivência do laboratório, mas que perdurou pela vida. Obrigada pelo incentivo e toda a parceria, no aspecto profissional e pessoal.

Aos meus amigos de todas as horas **Ernando e Elisa**, por partilharem todos os momentos de execução dessa pesquisa, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação, pela doação, pela amizade forte, pela força e pelos momentos de descontração.

Ao querido amigo **Mario Lisboa**, pela amizade e parceria inabaláveis, profissional e pessoalmente, pelo companheirismo, por dividir, acalmar e nunca medir esforços para me estender a mão.

Aos alunos de iniciação científica **Imaculada, Manuela, Mariana, Dennis, Pedro, Beatriz**, pelo esforço e auxílio em todas as vezes que precisamos.

Aos monitores de Patologia Bucal **Lucas e Guilherme**, pelas experiências e aprendizados compartilhados.

Aos **Professores Fábio Wildson, Thyciana Ribeiro, Ricardo Martins, Mônica Studart, Juliano Sartori, Lidiany Karla**, pela admiração e pela inspiração na docência com amor.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFC, Clínica de Estomatologia, Laboratório de Patologia Bucodental, Laboratório Multidisciplinar em Pesquisas Odontológicas, Laboratório de Ensaio em Microbiologia e Laboratório de Histopatologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos**, por serem fundamentais para meu crescimento científico e profissional.

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

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas, Graças a Deus, não sou
o que eu era antes”*

Marthin Luther King

RESUMO

A Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB) não possui fisiopatologia definida, mas se acredita que a infecção local possa participar do seu desenvolvimento. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do micro-organismo na osteoquimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico (AZ). Para isso, camundongos C57BL/6 selvagens (SELV), *Specific-Pathogen-Free* (SPF) e Convencionalizados (CONV), isto é, SPF inoculados com microbiota de animais SELV (n=6), foram submetidos às administrações de AZ (1 mg/kg, via intraperitoneal) por três semanas. Quatro semanas depois, realizou-se exodontia do segundo molar inferior esquerdo, seguida de nova administração de AZ, 7 dias após o procedimento cirúrgico. Outros animais, SELV, SPF e CONV (n=6), receberam solução salina via intraperitoneal (controles). Foram realizadas análises do ganho de massa corpórea semanalmente e hematológica no dia 0 e 70. Biofilmes orais foram colhidos dos animais nos dias 0 e 70 para análise citológica qualitativa. Após eutanásia (dia 70), mandíbulas e órgãos foram excisados. Com as mandíbulas, realizaram-se microtomografias para mensuração da área hipodensa sugestiva de necrose e, após descalcificação, lâminas histológicas (hematoxilina-eosina) para análise histomorfométrica do alvéolo pós-exodontia. Rim, fígado, baço e estômago foram analisados histopatologicamente para parâmetros de toxicidade. Análise citológica qualitativa revelou sucesso na convencionalização, com permanência de microbiota semelhante aos animais SELV do dia 0 ao 70. O grupo SPF-AZ, que exibiu cocos no dia 0, passou a evidenciar bactérias filamentosas ao final do experimento. Maior área hipodensa foi vista nos alvéolos pós-exodontia de animais tratados com AZ em relação aos grupos tratados com salina. Histomorfometricamente, grupos SELV-AZ e CONV-AZ exibiram maior número de células inflamatórias e osteoclastos totais nos sítios pós-exodontia, comparados aos tratados com salina, além de colônias bacterianas e sequestros ósseos mais frequentes. O número de osteoclastos apoptóticos foi maior nos animais tratados com AZ, independente do grupo. A administração de AZ esteve associada à provável ocorrência de eventos anêmicos, tendência à redução no número de plaquetas e à vacuolização de epitélio tubular no rim. Animais livres de patógenos específicos exibiram retardo no ganho de massa corpórea. Assim, a presença de uma microbiota oral patogênica esteve relacionada à ocorrência de lesões de OMB em camundongos SELV e CONV, enquanto sua ausência revelou, somente, atraso cicatricial temporal sem sinais clássicos de lesão necrótica.

Palavras-chave: Osteonecrose Associada a Bisfosfonatos. Bactéria. Gnotobióticos.

ABSTRACT

Bisphosphonates-Related Osteonecrosis of Jaw (BRONJ) has no defined pathophysiology, but it is believed that local infection may participate in its development. The aim of this study was to evaluate the role of microorganism in osteochemonecrosis of jaw induced by zoledronic acid (ZA). For this purpose, C57BL/6 wild type mice (WT), specific-pathogen-free (SPF) and conventionalized (CONV), that are SPF animals inoculated with microbiota from WT animals (n = 6) were subjected to ZA administrations (1 mg/kg, intraperitoneally) for three weeks. Four weeks later, second lower left molar was extracted, followed by a new administration of ZA realized seven days after surgery. Other animals, WT, SPF and CONV (n = 6) received saline solution intraperitoneally (controls). Body weight gain was performed weekly and haematological analyzes on day 0 and 70. Oral biofilms were collected from animals on days 0 and 70 for qualitative cytological analysis. After euthanasia (day 70), jaws and organs were excised. With the jaws, microtomographies were made to measure suggestive hypodense areas of necrosis and, after decalcification, histologic slides (hematoxylin-eosin) for histomorphometric analysis of the post-exodontia alveolus. Kidney, liver, spleen and stomach were analyzed histopathologically for toxicity parameters. Qualitative cytological analysis revealed success in the conventionalization, with permanence of the similar microbiota to the WT animals from day 0 to 70. The SPF-ZA group, which exhibited cocci on day 0, showed filamentous bacteria at the end of the experiment. Greater hypodense areas were seen in the post-exodontia alveoli of ZA-treated animals compared to saline groups. Histomorphometrically, WT-ZA and CONV-ZA groups exhibited a greater number of inflammatory cells and total osteoclasts in the post-extraction sites, compared to those treated with saline, in addition to more frequent bacterial colonies and bone sequestra. The administration of ZA was associated with the probable occurrence of anemic events, a tendency of reduction in the number of platelets and the vacuolization of tubular epithelium in the kidney. SPF animals exhibited delay in body weight gain. Thus, the presence of a pathogenic oral microbiota was related to the occurrence of BRONJ lesions in WT and CONV mice, while their absence revealed, only, temporal cicatricial delay, without classic signs of necrotic lesion.

Keywords: Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw; Bacteria; Specific Pathogen-Free Organisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura química geral dos bisfosfonatos.	20
Figura 2 –	Inibição da via do mevalonato por aminobisfosfonatos	22
Figura 3 –	Protocolo experimental simplificado. O esquema representa o protocolo experimental geral de indução de OMB associado ao regime de convencionalização de animais SPF.....	39
Figura 4 –	Protocolo de convencionalização de inoculação de bactérias da microbiota oral de camundongos selvagens em camundongos SPF.....	39
Figura 5 –	Caracterização qualitativa da microbiota oral observada em camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina, nos dias 0 e 70.....	48
Figura 6 –	Área hipodensa, em pixels, presente no sítio de exodontia dos grupos selvagem, SPF e convencionalizados, tratados com salina ou ácido zoledrônico no dia 70.....	51
Figura 7 –	Aspectos histológicos do sítio de exodontia de animais selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.....	55
Figura 8 –	Análise histomorfométrica da presença de células inflamatórias do sítio de exodontia de animais selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com salina e AZ.....	56
Figura 9 –	Análise histomorfométrica de parâmetros ósseos do sítio de exodontia de animais selvagens, SPF e convencionalizados tratados com salina e AZ.....	57
Figura 10 –	Fotomicrografias do estômago de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.....	68
Figura 11 –	Fotomicrografias do fígado de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.....	70
Figura 12 –	Fotomicrografias do rim de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.....	72
Figura 13 –	Fotomicrografias do baço de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escores microbiológicos para caracterização do biofilme oral de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com salina e AZ nos dias 0 e 70.....	49
Tabela 2-	Análise comparativa entre os dados histomorfométricos de camundongos SPF e convencionalizados tratados com AZ em relação aos animais selvagens tratados com AZ.....	58
Tabela 3 –	Análise hematológica do eritrograma de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.....	60
Tabela 4 –	Análise da variação do eritrograma, entre os dias 0 e 70, dos camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.....	60
Tabela 5 –	Análise hematológica do leucograma de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.....	62
Tabela 6 -	Análise da variação do leucograma, entre os dias 0 e 70, dos camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.....	62
Tabela 7 -	Análise hematológica da plaquetometria de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.....	64
Tabela 8 -	Análise da variação do leucograma, entre os dias 0 e 70, dos camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.....	64
Tabela 9 -	Análise do ganho de massa corpórea dos animais selvagens, SPF e convencionalizados tratados com salina ou AZ.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHR	Receptores Hidrocarbonetos Aryl
ANT	Adenina Nucleotídeo Translocase
ATP	Adenosina Trifosfato
AZ	Ácido Zoledrônico
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico básico
BFs	Bisfosfonatos
BHI	Do inglês, <i>Brain Heart Infusion</i>
C57 BL/6	C57 Black/6
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONV	Convencionalizado
COX	Ciclo-oxigenase
CTGF	Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM	Erro Padrão Médio
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FPP	Farnesil Pirofosfatase
GGPP	Geranil Difosfatase
GMCSF	Fator Estimulador de Crescimento de Macrófagos e Granulócitos
GTP	Guanosina Trifosfato
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzida
IP	Intraperitoneal

IPP	Isopentenilpirofosfato
LPS	Lipopolissacarídeo
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MSCRAMM	Componentes microbianos superficiais que reconhecem moléculas adesivas da matriz
NFκB	Fator Nuclear κB
NLR	Domínio de Oligomerização de Ligação de Nucleotídeos
OMB	Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos
OMM	Osteonecrose dos Maxilares induzida por Medicamentos
OPG	Osteoprotegerina
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PTPs	Proteínas Tirosina Fosfatases
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κB
SELV	Selvagem
SPF	Livres de Patógenos Específicos, do inglês <i>Specific-Pathogen-Free</i>
TLR	Receptor <i>Toll-Like</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Bisfosfonatos.....	20
2.2	Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB)	25
2.3	Osteonecrose dos maxilares e a presença de micro-organismos	29
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS.....	36
4.1	Geral.....	36
4.2	Específicos.....	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1	Cálculo Amostral	37
5.2	Animais	37
5.3	Modelo experimental de Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB)	38
5.4	Grupos Experimentais.....	39
5.4.1	<i>Grupos Selvagens</i>	39
5.4.2	<i>Grupos SPF</i>	39
5.4.3	<i>Grupos Convencionalizados</i>	40
5.5	Análise Citológica Qualitativa	42
5.6	Análise Imaginológica (mandíbulas).....	43
5.7	Confeção de lâminas histológicas e estudo histomorfométrico das mandíbulas ...	44
5.8	Coleta de sangue e análise de parâmetros hematológicos	45
5.9	Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais	45
5.9.1	<i>Análise do ganho de massa corpórea</i>	45
5.9.2	<i>Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço</i>	46
5.9.3.1	Estômago	46
5.9.3.2	Fígado	46
5.9.3.3	Rim	47
5.9.3.4	Baço.....	47
5.10	Análise estatística	47
6	RESULTADOS.....	49
6.1	Análise Citológica Qualitativa	49

6.2	Análise Imaginológica (mandíbulas)	53
6.3	Estudo histomorfométrico das mandíbulas	55
6.4	Análise de Parâmetros Hematológicos	62
	6.4.1 Eritrograma (Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito)	62
	6.4.2 Leucograma (Leucócitos, Linfócitos e Neutrófilos)	64
	6.4.3 Plaquetometria	66
6.5	Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais	68
	6.5.1 Análise do ganho de massa corpórea	68
	6.5.2 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço	70
	6.5.2.1 Estômago	70
	6.5.2.2 Fígado	72
	6.5.2.3 Rim	74
	6.5.2.4 Baço	76
7	DISCUSSÃO	78
8	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

A Osteonecrose dos Maxilares induzida por Medicamentos (OMM) é definida como uma exposição de osso necrótico na região maxilofacial, por mais de oito semanas, em pacientes com uso de fármacos antirreabsortivos ou antiangiogênicos, sem história prévia de radioterapia ou doença metastática nos maxilares. Diversos fármacos são relacionados ao desenvolvimento da OMM, dentre os quais se incluem os Bisfosfonatos (BF), cuja lesão necrótica associada denomina-se de Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB) (RUGGIERO et al., 2014).

A OMB é uma condição que pode ser dolorosa, muitas vezes é debilitante, e sua prevalência oscila entre 1 e 10% dos pacientes que utilizam esses fármacos (FASSIO et al., 2017; PELAZ et al., 2015; RUGGIERO; DODSON; ASSAEL, 2009). Embora seja bastante estudada sob diversos aspectos, até hoje não se conseguiu estabelecer adequadamente sua etiopatogênese (WALTER et al., 2010). Sendo assim, o tratamento dessa condição continua sendo realizado através do debridamento cirúrgico associado à terapêutica farmacológica com antibióticos, sistêmicos e locais, e analgésicos para controle da dor (RUGGIERO et al., 2014). Essa proposta terapêutica se baseia na hipótese de que bactérias possam provocar danos diretos ou indiretos através da colonização do osso impregnado por bisfosfonatos e, por meio da estimulação imune exacerbada, culminar em necrose óssea (HINSON et al., 2014; KATSARELIS et al., 2015; KOS, 2011; SEDGHIZADEB et al., 2008). Entretanto, clinicamente, é possível observar que cerca de 50% dos pacientes com OMB tratados com antibioticoterapia local e/ou sistêmica, debridamento cirúrgico ou outras terapias, como a oxigenoterapia hiperbárica, mantêm quadro clínico inalterado, alguns necessitam de reintervenção cirúrgica extensa e apenas 3% dos casos tratados com uma dessas modalidades evoluem para cura (DEL CONTE et al., 2010; DIEGO et al., 2007; POZZI et al., 2007).

Alguns autores defendem que esse tipo de resistência terapêutica possa ocorrer devido à formação de biofilmes bacterianos. Os biofilmes são estruturas complexas e organizadas, que reduzem a penetração de antibióticos, protegendo as bactérias da ação antimicrobiana (KATSARELIS et al., 2015). Biofilmes bacterianos na cavidade oral constituem o principal fator etiológico para diversas condições patológicas. Dentre essas, incluem-se cáries, que podem evoluir para lesões pulpares, gerando necessidade de exodontias, e condições inflamatórias crônicas, como a doença periodontal. Sabe-se que sítios orais anteriormente acometidos por essas doenças infecto-inflamatórias, como doença periodontal (HOFF et al.,

2008; MARX et al., 2005) e periapical (AGHALOO et al., 2011), são considerados fatores de risco locais ao desenvolvimento de OMB (RUGGIERO et al., 2014). Por conta disso, estudos têm observado redução da incidência de OMB em pacientes com câncer após sua melhoria na higiene dental (BONACINA et al., 2011; NICOLATOU-GALITIS et al., 2011; RIPAMONTI et al 2009), fator indispensável para a remoção do biofilme e manutenção de boa saúde oral.

Por outro lado, outras pesquisas demonstram que a infecção parece não ser decisiva para a etiopatogênese da OMB. Sabe-se que a terapia com bisfosfonatos é capaz de causar modificações no perfil hematológico dos pacientes tratados, principalmente, a linfocitose (ROSSINI et al., 2012). Mudanças no perfil de citocinas pró-inflamatórias liberadas também na saliva e no plasma de pacientes que utilizam BFs foram observadas e, nota-se que, há exacerbação dos níveis quando a OMB se desenvolve. Assim, pacientes oncológicos que utilizam BFs continuamente apresentam níveis mais elevados de Interleucina(IL)-1 α , IL-1 β e IL-1RA na saliva e IL-6 na saliva e no plasma em relação a pacientes que não estão em terapia com esses fármacos (BAGAN et al., 2013; BAGAN et al., 2014). Esses achados indicam a instalação de um estado inflamatório no organismo a partir da administração crônica do fármaco. A partir desses resultados, acredita-se que a OMB possa ser desenvolvida através de um processo asséptico, de patogênese unicamente associada às mudanças imunológicas provocadas pela infusão de bisfosfonatos. A OMB, então, se instala seguindo um período de vários meses. Com o alastramento da lise óssea, ocorre a necrose da mucosa, expondo o osso subjacente ao ambiente bucal e favorecendo a infecção secundária desse sítio. Em geral, a partir dessa etapa, comumente sintomática, o diagnóstico é realizado (LESCLOUS et al., 2009). Entretanto, já foi visto por este grupo de pesquisa que, embora a inflamação pareça atuar no agravamento da OMB, a inibição da migração de polimorfonucleares neutrófilos para o sítio de exodontia, através do tratamento com nimesulida, não foi capaz de prevenir a OMB em relação aos animais tratados com salina. Em ambos os grupos, a OMB esteve associada à presença de colônias bacterianas no sítio de exodontia (OLIVEIRA et al., 2017).

A partir do exposto, permanece a questão, se a presença do biofilme seria um fator desencadeador, essencial para o desenvolvimento de lesões necróticas, ou se funcionaria apenas como um adjuvante sobreposto a uma carga de desregulação imune induzida pelos bisfosfonatos. Portanto, a investigação acerca do papel de micro-organismos patogênicos na etiopatogênese da OMB é pertinente e necessária para a elaboração de condutas preventivas e terapêuticas eficazes no controle do desenvolvimento dessa condição.

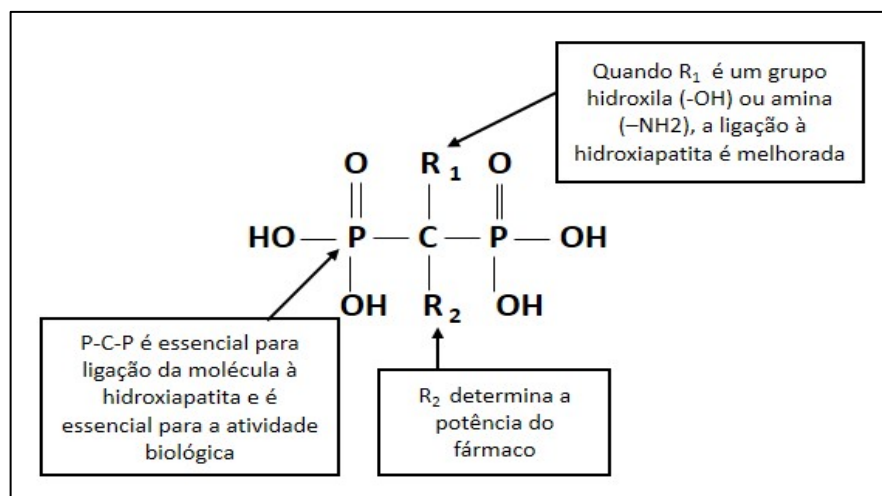
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bisfosfonatos

Bisfosfonatos (BFs) são potentes agentes antirreabsortivos constituídos por duas ligações entre carbono e fósforo (estrutura P-C-P) (FLEISCH, 1998; ROGERS et al., 1999). Essa constituição se assemelha ao pirofosfato inorgânico endógeno, um polifosfato de ocorrência natural presente no soro e na urina, capaz de prevenir a calcificação do mineral ósseo pela ligação a cristais de hidroxiapatita recém-formados (FLEISCH, RUSSELL, STRAUMMAN, 1966; ROGERS et al., 1999). Entretanto, o pirofosfato, que possui na estrutura química dois átomos de fósforo ligados a um de oxigênio, quando administrado por via oral, não é capaz de ser absorvido, uma vez que rapidamente poderia ser hidrolisado pelo conteúdo do ácido gástrico. A partir da incorporação do átomo de carbono, promovendo a ligação central às moléculas de fósforo, obteve-se estabilidade na molécula para ser absorvida pelo trato gastrintestinal, com manutenção das propriedades antimineralizantes observadas no composto original (ROGERS et al., 1999) (Figura 1).

Associados ao carbono geminal, pode-se associar diversos grupamentos químicos a dois radicais: o radical R1, responsável pelo aumento da afinidade aos compostos mineralizados; e o radical R2, ao qual é atribuída à potência do fármaco (ROGERS et al., 1999; RUSSELL; CROUCHER; ROGERS, 1999). Assim, sabe-se que a ligação de um grupo hidroxila ligado ao grupamento R1 aumenta a afinidade dos bisfosfonatos a materiais calcificados, devido à capacidade desse composto quelar o cálcio por ligação tridentada, em vez de bidentada (JUNG, BISZA, FLEISCH, 1973). A ligação de cadeias nitrogenadas ao átomo de carbono central na posição R2 determina uma maior atividade biológica, pela ligação a alvos moleculares específicos (RUSSELL; CROUCHER; ROGERS, 1999). De acordo com a presença ou não da ligação de grupos aminados ao carbono R2, os bisfosfonatos são classificados em aminobisfosfonatos ou não-aminobisfosfonatos, respectivamente, sendo os primeiros fármacos de maior efetividade (FLEISCH, 1998; RUSSELL; CROUCHER; ROGERS, 1999) (Figura 1).

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



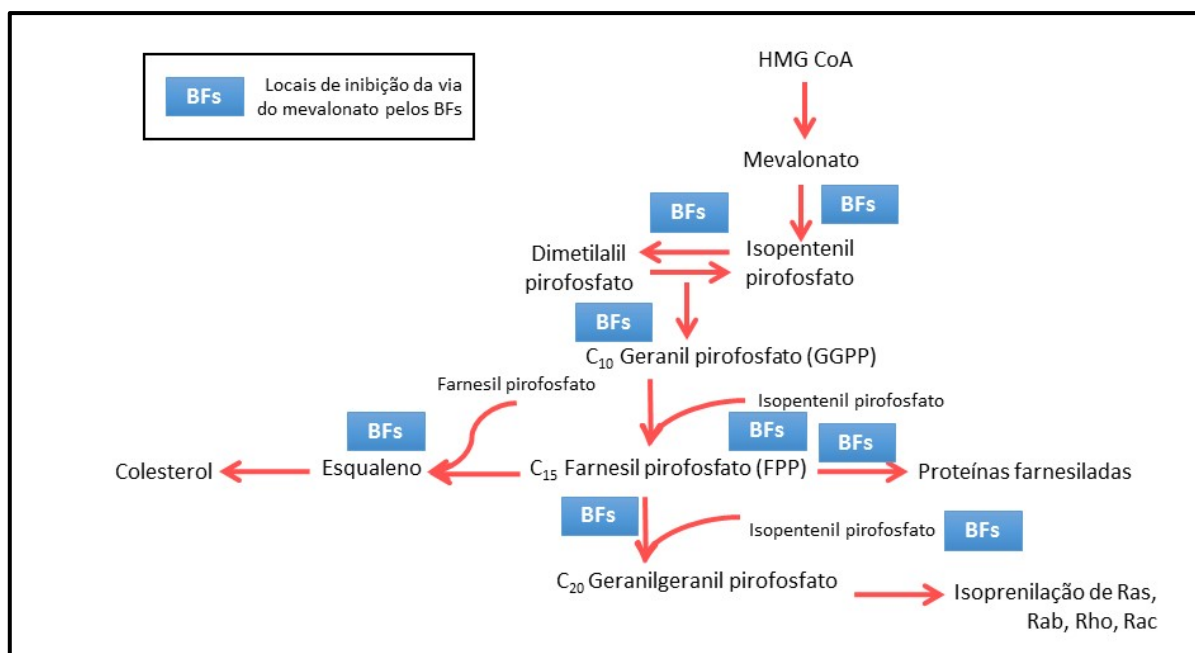
Fonte: Adaptado de Russell et al., 1999.

O mecanismo de ação dos bisfosfonatos está relacionado a sua estrutura química e à interação com células ósseas. Sendo esses compostos altamente afins de tecidos mineralizados, após absorção, são rapidamente eliminados da circulação sistêmica, se instalando sobre superfícies minerais ósseas, particularmente nos sítios de atividade dos osteoclastos (SATO et al., 1991). Quando osteoclastos estão em atividade reabsortiva, forma-se um microambiente ácido, o que pode facilitar a liberação do BF da superfície do osso, dando origem a altas concentrações de bisfosfonato locais (ROGERS et al., 1999). O BF pode então ser internalizado por osteoclastos, principais células envolvidas no seu mecanismo de ação. Os bisfosfonatos não-aminados, como o clodronato e o etidronato, são endocitados, junto ao osso, e metabolizados no interior de osteoclastos em análogos de adenosina trifosfato (ATP) contendo metileno (AppCp). Esses análogos acumulam-se dentro das células, pois são incapazes de serem hidrolisados, o que inibe numerosas enzimas metabólicas intracelulares, acarretando em citotoxicidade e posterior apoptose dessas células (SELANDER et al., 1996; RUSSELL; CROUCHER; ROGERS, 1999). Os bisfosfonatos que contêm nitrogênio em sua composição química, como pamidronato, alendronato e ácido zoledrônico (AZ), uma vez no interior dos osteoclastos, não são metabolizados e exercem seu efeito através de outros mecanismos. Esses agentes são capazes de inibir a via do mevalonato, suprimindo a farnesil difosfatase (FPP) e a geranyl difosfatase (GGPP), prejudicando a produção de colesterol e lipídios isoprenóides, além de impedir a prenilação de pequenas GTPases (Ras, Rho, Rac) (ROGERS et al., 2000), o que causa a desregulação de processos celulares importantes para os osteoclastos, como manutenção da morfologia celular, movimentação da membrana, tráfego de endossomos e prevenção da apoptose celular (RIDLEY et al., 1992; ZERIAL, STENMARK,

1993; ZHANG et al., 1995). A partir da inibição desses efeitos, os osteoclastos podem ter sua função perdida, decorrente da ausência da borda enrugada, necessária para a reabsorção óssea, e da destruição do citoesqueleto de actina (SELANDER, LEHENKARI, VAANANEN, 1994), desregulando o transporte intracelular e a organização da arquitetura da célula ou culminando na sua apoptose (HUGHES et al., 1995; GREEN, 2004). A inibição da FPP gera o acúmulo de isopentenilpifosfato (IPP), o metabólito imediatamente acima do FPP na via do mevalonato. Esse acúmulo causa produção de ApppI (análogo de ATP não-hidrolisável), que inibe a enzima mitocondrial adenina nucleotídeo translocase (ANT) e pode resultar em apoptose, além de clinicamente resultar em uma resposta inflamatória persistente, comumente vista após a administração intravenosa do medicamento (MÖNKKÖNEN et al., 2006) (Figura 2).

Outras enzimas que podem ser inibidas pelos BFs são a esqualeno sintase, afetando a biossíntese do colesterol, que pode atuar na formação da borda enrugada, e as proteínas tirosina fosfatases (PTPs), que equilibram a atividade de tirosina-quinases em vias de transdução de sinal iniciadas pelos fatores de crescimento, insulina e outros estímulos (RODAN; FLEISCH, 1996). Acredita-se que os BFs possam ainda apresentar efeitos adicionais em células precursoras de osteoclastos, evitando o recrutamento, diferenciação e fusão dessas células (BOONEKAMP et al., 1986). Sabe-se que ocorre ainda efeito sobre a proliferação de osteoblastos e inibição das enzimas que ativam a atividade osteoclástica (VITTE, FLEISCH, GUENTHER, 1996; ENDO et al., 1996), embora não se conheça exatamente por quais vias isso ocorra (RUSSELL et al., 1999). Por todos esses mecanismos, os aminobisfosfonatos são reconhecidamente mais potentes em sua ação antirreabsortiva em relação aos não-aminobisfosfonatos (RUSSELL, CROUCHER, ROGERS, 2007; AAPRO et al., 2008) (Figura 2).

Figura 2 – Inibição da via do mevalonato por aminobisfosfonatos.



Fonte: Adaptado de Russell et al., 1999.

Através de seu efeito antirreabsortivo, os bisfosfonatos têm sido largamente utilizados em doenças metabólicas onde existe alto potencial osteolítico, como osteoporose e doença de Paget, mas têm crescido ainda mais seu uso na prevenção de metástases ósseas, em tumores de órgãos sólidos, como mama, próstata, rim, fígado, reduzindo a morbidade e/ou retardando complicações esqueléticas oriundas dessas doenças (ALLEGRA et al., 2007; AAPRO et al., 2008; WALTER et al., 2010; COLEMAN et al., 2011). Os BFs são indicados para prevenir ou retardar a progressão de metástases ósseas, devido à interrupção da reabsorção de osso, necessária para associação de células tumorais a esse tecido. Além disso, sabe-se que esses fármacos têm ação citostática, induzindo a apoptose e inibindo a adesão e a invasividade de células tumorais. Acredita-se que isso seja mediado de maneira similar ao que ocorre em osteoclastos. Deste modo, o acúmulo de intermediários da via do mevalonato, por conta da inibição enzimática promovida pelos bisfosfonatos, pode culminar em apoptose celular tumoral (SHIPMAN et al., 1998; FROMIGUE; LAGNEAUX; BODY, 2000). Adicionalmente, a inibição da prenilação de pequenas GTPases, por conta da interrupção dessa via, está associada à redução da invasão e adesividade de células tumorais *in vitro* (TASSONE et al., 2000). Os BFs podem ainda ter efeitos sobre a secreção de citocinas e fatores de crescimento, essenciais ao desenvolvimento e progressão do tumor (GREEN, 2004). Mostrou-se, também, que esses fármacos, *in vitro*, inibem a proliferação de células endoteliais estimuladas por soro fetal bovino, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF) e, portanto, têm efeitos na angiogênese tumoral (WOOD et al., 2002). *In vivo*, observou-se redução de níveis séricos de VEGF com a administração de pamidronato em pacientes com metástases (SANTINI et al., 2002).

Nesse contexto, o ácido zoledrônico, que é um aminobisfosfonato derivado imidazólico heterocíclico de terceira geração, tem se destacado, sendo bastante empregado na terapia oncológica. Isso se deve à sua elevada eficácia clínica, já que é considerado o mais potente dos bisfosfonatos, com potência cerca de 10.000 vezes maior que a do etidronato (FERNANDES, LEITE, LANÇAS, 2005) e demonstra benefícios no tratamento da doença metastática superior em 41% ao placebo (KOHNO et al., 2005) e em 20% a outros fármacos da mesma classe, como o pamidronato (ROSEN et al., 2004). Esse fármaco é clinicamente administrado por via endovenosa, através de uma infusão de 4 mg do fármaco em 15 minutos. Ao final da administração, sua concentração plasmática eleva-se rapidamente, seguido de um declínio, apresentando, após 24 h, concentração plasmática de 1%. Cerca de 56% do AZ liga-se a proteínas plasmáticas e o mesmo praticamente não é acumulado no organismo. O fármaco não sofre metabolização e é eliminado em sua forma inalterada pelos rins, através de um processo trifásico, que resulta de duas fases de eliminação rápidas e uma fase longa, com tempo de meia-vida estimado em 146 horas (RUSSELL; CROUCHER; ROGERS, 1999; LYSENG-WILLIAMSON, 2008).

Estima-se que o uso de bisfosfonatos possa diminuir em até 30-50% o número de fraturas ósseas oriundas das doenças osteolíticas (COLEMAN, 2004). Observa-se a redução da ocorrência de eventos esqueléticos, tais como fraturas, e a necessidade de radiação ou operações de estabilização, prevenção de episódios de hipercalemia, redução da dor, o que impacta diretamente na melhoria da qualidade de vida dos pacientes que fazem uso dessa terapia e da preservação da função dos órgãos acometidos pela doença-base. (COLEMAN, 2004; WALTER et al., 2010).

Embora seja bastante evidente o benefício do uso desses agentes para o tratamento das doenças ósseas e prevenção das metástases no osso, existem inúmeros riscos envolvidos com a utilização crônica desses agentes. Assim, os pacientes tratados com BFs podem apresentar sinais inflamatórios agudos pós-infusão, como febre, mal-estar, dores musculares e articulares, decorrente da estimulação de células T e da elevação de citocinas pró-inflamatórias (COLEMAN, 2008; NORTON et al., 2012), eventos gastrintestinais, como dispepsia, náuseas e vômitos (KELLY, TAGGART, 1997), complicações renais e a osteonecrose dos ossos maxilares (COLEMAN, 2008).

2.2 Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB)

Em 2003, começou a ser descrita uma condição dolorosa caracterizada por exposição de osso maxilar ou mandibular, comumente irresponsiva ao tratamento médico e cirúrgico, em pacientes sob terapia antineoplásica com o uso de aminobisfosfonatos (MARX, 2003; WANG; GOODGER; POGREL, 2003), que, mais tardiamente, foi chamada de “Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos” (OMB) (HELLSTEIN; MAREK, 2005).

Sabe-se que a necrose óssea pode ser induzida por uma gama de fármacos. Portanto, atualmente, a condição caracterizada pela exposição de osso necrótico na região maxilofacial, por mais de oito semanas, em pacientes em uso de antirreabsortivos ou antiangiogênicos, sem história prévia de radioterapia ou doença metastática, é conhecida por Osteonecrose dos Maxilares induzida por Medicamentos (RUGGIERO et al., 2014). Alguns fatores parecem influenciar na probabilidade do desenvolvimento da OMM relacionada aos bisfosfonatos (OMB), como a potência do fármaco utilizado, a duração do tratamento, assumindo esta uma condição tempo-dependente, a via de administração, estando os BFs administrados por via endovenosa associados a um maior risco que os dados por via oral, as condições orais que predisponham a reação infectoinflamatória local, como infecção, a trauma ou cirurgias, a higiene oral deficiente, a idade do paciente e a localização (mandíbula ou maxila) (WOO; HELLSTEIN; KALMAR, 2006; COLEMAN, 2008; RUGGIERO et al., 2014).

Clinicamente, a OMM apresenta-se de diversas maneiras, e, por isso, a Associação Americana de Cirurgias Orais e Maxilofaciais (AAOMS) organizou uma classificação para essas lesões, a fim de orientar as diretrizes de tratamento (RUGGIERO et al., 2014). Assim, a OMM pode variar de sintomas não-específicos, como dores ósseas ou odontalgias não atribuídas a causas odontogênicas, associada a anormalidades radiográficas, como o aumento do espaço do ligamento periodontal e alterações no padrão trabecular ósseo, que não são específicas para sugerir a presença da lesão (estágio 0), a osso exposto assintomático sem evidências de infecção (estágio 1), ou exposição óssea sintomática com evidências de infecção, com ou sem drenagem purulenta (estágio 2), até a presença de fistulas extra-orais ou acometimento de borda de mandíbula ou seio maxilar, criando comunicação oroantral ou oronasal (estágio 3) (RUGGIERO et al., 2014). Mesmo podendo haver evidências que sugerem a existência de lesões de OMM em estágios precoces, essa condição geralmente só é diagnosticada quando há sinais clínicos de exposição óssea, em estágios avançados. Nesse

momento, o osso exposto frequentemente está associado à sintomatologia dolorosa, à infecção e à supuração (POZZI et al., 2007; DINIZ-FREITAS et al., 2012).

Sabe-se que o desenvolvimento desta condição está associado à morbidade e à redução da qualidade de vida dos pacientes acometidos (POZZI et al., 2007; RUGGIERO et al., 2014). Na prática, isso ainda se torna mais complicador, pois, embora existam regimes terapêuticos recomendados em cada estágio de OMM e diversas tentativas de novos tratamentos adjuvantes propostos, como uso do laser de baixa potência (DE GUARDA et al., 2012) e de fibrina rica em plaquetas (GÖNEN; YILMAZ ASAN, 2017), não há modalidade terapêutica realmente efetiva para ser aplicada com segurança nessa condição, sendo considerado um tratamento extremamente difícil por alguns autores (DIEGO et al., 2007; JANOVSKA; MOTTTL; SLEZAK, 2015). Na maioria dos casos, sugere-se a utilização de antibióticos tópicos e sistêmicos e, em estágios mais avançados, a associação da medicação ao debridamento cirúrgico (RUGGIERO et al., 2014). Entretanto, essa terapia tem sido associada ao alto índice de insucesso, alcançado em apenas 3% deles (DIEGO et al., 2007). Foi reportado, ainda, que a recorrência de lesões de OMB em pacientes sob uso de bisfosfonatos ocorreu em 28,7% dos casos, quando se utilizou as modalidades clássicas de tratamento. Outro estudo confirma que a abordagem conservadora utilizada no tratamento de lesões de OMM levou à regressão dos sintomas, mas não foi curativa (JANOVSKA; MOTTTL; SLEZAK, 2015). Além disso, ratifica que os casos onde a intervenção cirúrgica é indicada devem ser cuidadosamente planejados com relação ao estado geral de saúde e à expectativa de vida do paciente, uma vez que o procedimento por si carrega o risco de progressão adicional da lesão necrótica (MÜCKE et al., 2010; JANOVSKA; MOTTTL; SLEZAK, 2015). Assim, é desafiador para o cirurgião-dentista conduzir o tratamento da OMM na ausência de terapêuticas curativas que garantam remissão da lesão.

A falta de tratamentos eficazes para a OMM é reflexo da falta de compreensão exata dos mecanismos fisiopatológicos que iniciam seu desenvolvimento, que permanece sem consenso na literatura (WALTER et al., 2010). Por isso, inúmeros modelos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de elucidar a etiopatogênese dessa condição. A maioria desses estudos utiliza a infusão de aminobisfosfonatos, associada em alguns à administração de dexametasona, provocando um dano aos tecidos orais através de exodontia, mimetizando a osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB) (HIKITA et al., 2009; SONIS et al., 2009; BI et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2010; LÓPEZ-JORNET et al., 2011; ABTAHI et al., 2012; CONTE-NETO et al., 2012; MARINO et al., 2012; ALLEN, CHU, RUGGIERO, 2013; CONTE-NETO et al., 2013; BARBA-RECREO et al., 2014; JABBOUR et al., 2014;

HOWIE et al., 2015; YANG et al., 2015; KOLPAKOVA et al., 2017; VILARINHO et al., 2017). Alguns estudos demonstram, ainda, o desenvolvimento de OMB através de modelos experimentais de periodontite (AGHALOO et al., 2011; AGUIRRE et al., 2012; LI et al., 2015). Enquanto outros observam a capacidade de indução de OMB mesmo em ratos que não foram submetidos a injúrias nos tecidos orais (SENEL et al., 2010; MOLON et al., 2014). Esses estudos demonstram, histologicamente, presença de infecção, inflamação e osso desvitalizado, com lacunas de osteócitos vazias nos sítios de indução da OMB (HIKITA et al., 2009; SONIS et al., 2009; SENEL et al., 2010; AGUIRRE et al., 2012; MARINO et al., 2012; CONTE-NETO et al., 2013; BARBA-RECREO et al., 2014; HOWIE et al., 2015; SILVA et al., 2015; TANAKA et al., 2015; YANG et al., 2015; KOLPAKOVA et al., 2017). Mesmo com a realização de todas essas investigações experimentais, nenhum dos modelos de OMB foi capaz de desvendar, de maneira concreta, a etiopatogênese dessa condição. Ainda, alguns desses modelos não foram capazes de evidenciar a formação de uma condição semelhante à OMB, mas descreveram atraso cicatricial em alvéolos pós-exodontia (KOBAYASHI et al., 2010). A utilização de doses pontuais de bisfosfonatos, por vezes aleatórias, em diferentes vias de administração, tempos distintos de eutanásia e curso temporal e falta de um protocolo experimental baseado no regime terapêutico clínico de BFs utilizados clinicamente no tratamento das malignidades, não permite investigar de forma segura os mecanismos envolvidos com o desenvolvimento dessa condição. Assim, estudo anterior desenvolvido por esse grupo de pesquisa evidenciou a indução de OMB através de uma curva dose-resposta de ácido zoledrônico, com a dose inicial desse fármaco e regime terapêuticos empregados semelhantes ao uso clínico, revelando alterações radiográficas e histopatológicas compatíveis com OMB (SILVA et al., 2015).

A partir desses estudos clínicos e experimentais, diversas hipóteses têm tentado explicar o desenvolvimento de OMM induzida pelo uso de BFs (OMB). Essas lesões são basicamente relacionadas a três mecanismos: a inibição da remodelação óssea, a inibição da angiogênese e a infecção. A primeira hipótese sugere que OMB é causada pela cessação da remodelação óssea e *turnover* ósseo, consequência da inibição osteoclástica provocada pelos BFs (MASHIBA et al., 2005), especialmente na crista alveolar, onde a remodelação óssea é superior quando comparada com outras partes do esqueleto (HUJA et al., 2006), resultando em um maior acúmulo de fármaco nesta região. Esse aumento da concentração local de bisfosfonatos poderia influenciar as células no microambiente local, tais como osteoblastos, células endoteliais e fibroblastos, o que contribuiria para alterações da cicatrização de feridas após uma lesão, culminando clinicamente em OMB (WALTER et al., 2010). A segunda

hipótese é sustentada pela ação antiangiogênica dos BFs. O pamidronato e o ácido zoledrônico têm demonstrado efeito inibitório da neoangiogênese capilar (SANTINI et al., 2002), o que pode resultar em uma necrose avascular (WALTER et al., 2010), além de os BFs possuírem a capacidade de reduzir o número de células progenitoras endoteliais circulantes (ALLEGRA et al., 2007). Além disso, o ácido zoledrônico tem demonstrado capacidade de diminuir a proliferação de células endoteliais induzida por soro, do FGFb e VEGF em modelo de angiogênese em tecido mole (WOOD et al., 2002), o que pode contribuir para o desenvolvimento da OMB. Outros estudos hipotetizam que haja uma junção desses fatores, onde o acúmulo de BFs produziria dano ósseo, interferindo na remodelação óssea pela inibição de osteoclastos, osteoclastos e osteócitos, o que provoca o aumento da densidade mineral óssea, além de inibir a angiogênese. A hipóxia tecidual no local da lesão poderia ser amplificada por outros cofatores de risco presentes nesses pacientes, como a anemia. Todos esses eventos poderiam deixar o osso com pouco potencial de recuperação frente ao trauma da mucosa por mastigação ou por prótese ou por procedimentos odontológicos, levando o osso a necrosar (POZZI et al., 2007).

Embora essas hipóteses sejam bem estabelecidas, tem ganhado destaque na literatura a ação de micro-organismos como iniciadores da OMB (KOS, 2011; WEI et al., 2012; HINSON et al., 2014; KATSARELIS et al., 2015).

2.3 Osteonecrose dos maxilares e a presença de micro-organismos

O tratamento da OMB, embora ainda dotado de certo empirismo, tem sido indicado através do debridamento cirúrgico associado à terapêutica farmacológica com antibióticos, sistêmicos e locais, e analgésicos para controle da dor (RUGGIERO et al., 2014). Essa proposta terapêutica se baseia na hipótese de que bactérias possam provocar danos diretos ou indiretos através da colonização do osso impregnado por bisfosfonatos e, por meio da estimulação imune exacerbada, culminar em necrose óssea (SEDGHIZADEB et al., 2008; KOS, 2011; HINSON et al., 2014; KATSARELIS et al., 2015).

Espécimes ósseos obtidos a partir de lesões de OMB foram analisados no microscópio eletrônico, onde se observou clara formação de biofilme. O biofilme era formado principalmente por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, facultativas ou estritas. Dentre as bactérias identificadas, estavam *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Selenomonas* e três variantes morfológicas de espiroquetas. Além disso, visualizou-se a presença de fungos, compatível com *Candida* sp. em todos os casos. Os micro-organismos identificados eram compatíveis com a microbiota oral, particularmente envolvidos na doença periodontal, infecção pulpar, periapical (bacteriana) e doenças nas mucosas (fúngicas). Ressalta-se ainda que o biofilme foi encontrado em todas as superfícies internas, indicando a presença de micro-organismos na porção profunda do osso e não somente na superfície exposta à contaminação da cavidade oral (SEDGHIZADEB et al., 2008).

Outro estudo, com espécimes ósseos removidos para biópsia de lesões de OMB, verificou a presença de sete filos bacterianos nos grupos OMB e controle, o qual foi representado por fragmentos de osso comprometidos por doenças orais, como cárie e doença periodontal. Dentre esses, estavam *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e um filo denominado TM7, sem culturas representativas conhecidas, o qual predominou nas lesões de OMB (WEI et al., 2012). Estudos com amostras de ossos necróticos em pacientes usuários de BFs confirmaram e enfatizaram a presença de *Actinomyces* spp. nessas lesões (PELAZ et al., 2015; RUSSMUELLER et al., 2016). Outros artigos enfatizam que a OMB está relacionada à infecção e à proliferação fúngica (AFTIMOS et al., 2014).

Foi visto em espécimes de osso necrótico removido de lesões ocasionadas por BFs que, próximo às lacunas de reabsorção óssea, não havia qualquer evidência de células eucariotas

presentes. Esse achado confirma a hipótese de que pode haver um estímulo direto oriundo do biofilme microbiano oral sobre a reabsorção óssea, que atua de modo adicional à reabsorção induzida pela resposta imune do hospedeiro frente à injúria óssea (SEDGHIZADEB et al., 2008). Alguns autores atribuem esse resultado ao fato de que lipopolissacarídeos, oriundos de bactérias Gram-negativas, possam atuar incitando a osteoclastogênese, através do estímulo de mediadores inflamatórios locais, como IL-1 e TNF- α (JIANG et al., 2002). Sugere-se ainda que o alendronato, bisfosfonato aminado utilizado no tratamento da osteoporose e administrado por via oral, aumente a produção de IL-1 β induzida por *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria periodontopatogênica, via ativação da caspase-1, o que pode contribuir para o desenvolvimento de osteomielite dos maxilares associada a BFs (DENG et al., 2009). Adicionalmente, essa desregulação inflamatória gerada pela administração de BFs, junto ao estímulo bacteriano, parece provocar o aumento dos níveis de óxido nítrico, mediador que está envolvido na ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B), que culminou, em elevadas concentrações, em apoptose de osteócitos (ALMEIDA et al., 2010). Estudo recente confirmou esse achado, demonstrando que, em ratos tratados com ácido zoledrônico, observou-se maior número de células imunopositivas para Receptores *Toll-Like* (TLR) 4, assim como para Cicloxigenase-2, o que também esteve relacionado à maior imunexpressão para caspase-3 (BARROS-SILVA et al., 2019), indicando que a regulação imunoinflamatória, frente ao estímulo bacteriano, pode ter relevância na patogênese da OMB.

Estudos clínicos confirmam essa relação entre o estímulo imunológico e inflamatório nas lesões necróticas oriundas da terapia com bisfosfonatos. Postula-se que, em pacientes com OMB, ocorra disbiose, além de alterações na resposta imune à infecção, o que pode culminar em necrose e inflamação local (PULSHALKAR et al., 2014). Outros genes ligados à resistência imune e à função de barreiras naturais, que compõem a imunidade inata, têm-se mostrado reduzidos quando o paciente desenvolve OMB. Kalyan et al. (2015) demonstraram que genes como Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK) e Receptores Hidrocarbonetos Aryl (AHR) apresentaram-se pouco expressos nos pacientes doentes, além da diminuição de mediadores importantes na cicatrização tecidual, como Fator 9 de Crescimento de Fibroblastos (FGF9), Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF), Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (CTGF) e Metaloproteinase de Matriz 7 (MMP7). Por outro lado, os pacientes tratados com bisfosfonatos e que não desenvolveram OMB exibiram regulação positiva destes mesmos genes em resposta ao estresse inflamatório nos pacientes com função imune normal. Esses achados sugerem que a ocorrência de OMB possa estar ligada à capacidade reduzida de alguns indivíduos em responder aos desafios

microbianos orais, sobretudo os pacientes com disfunção imunológica, a qual pode ser induzida pela terapia farmacológica crônica com imunossuppressores ou por meio de doenças (KALYAN et al., 2015).

A imunossupressão também parece aumentar a predisposição à ocorrência de OMB. Regimes antineoplásicos contendo dexametasona foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento dessa condição em pacientes com mieloma múltiplo (TALAMO et al., 2005). Adicionalmente, a dexametasona administrada sistemicamente parece aumentar a susceptibilidade de ocorrência de osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos em diversos modelos animais (KERACHIAN et al., 2011; LÓPEZ-JORNET et al., 2010; SONIS et al., 2009) e em seres humanos (CHIU et al., 2010; BARASCH et al., 2011). Dessa forma, a imunossupressão pode atuar facilitando a disseminação da infecção no tecido ósseo e a ocorrência de OMB. O estímulo bacteriano pode induzir a reabsorção óssea, processo que está inibido pela ação de BFs, podendo, então, resultar em dano tecidual e necrose, uma vez que o osso não tem como reagir à injúria.

Estudos em animais têm comprovado a importância da presença de infecção para o desenvolvimento de OMB. López-Journet et al. (2011) observaram prevenção do desenvolvimento desse evento em ratos Sprague-Dawley tratados com antibióticos. Abtahi, Agholme, Aspenberg (2013) evidenciaram ausência de características clínicas e histológicas sugestivas de OMB em ratos Sprague-Dawley submetidos à infusão de AZ e à exodontia do primeiro molar superior esquerdo, mas que tiveram suas feridas cirúrgicas fechadas através de coaptação dos bordos de mucosa, o que provavelmente evitou a colonização de microorganismos no local. Outros estudos relataram ainda a associação entre a inoculação de bactérias e a ocorrência de osteonecrose em fêmur e mandíbulas em modelos experimentais (TSURUSHIMA et al., 2013; LI et al., 2015; SAKAGUCHI et al., 2015).

Corroborando essa teoria, sabe-se que a maior incidência de OMB tem sido associada a diversos fatores de riscos locais, sobretudo de dentes que representam focos infecciosos. A presença de condições patológicas comuns, como, por exemplo, doença periodontal ou cárie atingindo a polpa dentária, ou procedimentos cruentos comumente realizados, como, por exemplo, a exodontia, têm sido fortemente relacionados ao desenvolvimento de OMB (FICARRA et al., 2005; KATZ, 2005; SARATHY et al., 2005; HOFF et al., 2008; YAMAZAKI et al., 2012; TSAO et al., 2013del). Esses fatores locais representam uma maneira fácil para os agentes patogênicos atingirem a superfície do osso e causar infecção (KATSARELIS et al., 2015). Kaplan et al. (2009) confirmam essa hipótese em estudo experimental, em que observaram, sob aspecto histológico, a presença de *Actinomyces*

em 14 pacientes com OMB, dos quais 12 tinham realizado exodontia prévia ao desenvolvimento da necrose óssea.

Tem-se hipotetizado ainda que BFs são capazes de facilitar a colonização bacteriana. Estudos *in vitro* demonstraram que bisfosfonatos aminados, como o pamidronato e ácido zoledrônico, estão relacionados à maior adesão de bactérias em biofilmes uniespécies na superfície de discos de hidroxiapatita em relação a discos não impregnados com esses fármacos (GANGULI et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2010; KOS et al., 2013, 2015). A concentração de bisfosfonato presente na matéria inorgânica, que clinicamente é diretamente associada à dose e ao tempo de uso do fármaco, mostra relação à maior adesão de bactérias. Kobayashi et al. (2010) compararam a adesão de *Streptococcus mutans* em diferentes concentrações de ácido zoledrônico e demonstraram que as maiores concentrações testadas (1 mM e 10 mM) estavam associadas a um aumento significativo no número de colônias de bactérias. Por outro lado, bisfosfonatos não-aminados, como o clodronato, apresentam comportamento controverso e pouco conhecido (GANGULI et al., 2005). Assim, os estudos *in vitro* indicam que o uso de aminobisfosfonatos aumenta a possibilidade de adesão de bactérias Gram-positivas, o que cria um ambiente favorável à infecção polimicrobiana crônica mais resistente à terapia.

Acredita-se que a adesão de micro-organismos ao osso incorporado com BF ocorra por meio de uma ligação eletrostática direta com o grupo amino catiônico presente nos BFs aminados. Assim, a exposição óssea durante cirurgias ou exodontias funcionaria como um fator de entrada para a invasão bacteriana (KOS; LUCZAK, 2009). Essa adesão parece ser mediada por proteínas denominadas “componentes microbianos superficiais que reconhecem moléculas adesiva da matriz” (MSCRAMM), encontradas em micro-organismos Gram-positivos (GANGULI et al., 2005). No osso incorporado com bisfosfonatos aminados, o componente MSCRAMM interage por meio de uma ligação eletrostática direta, através de uma proteína de superfície e o grupo amino catiônico dos bisfosfonatos, ou proporcionando a mimetização de um aminoácido na superfície da hidroxiapatita óssea (KOS, LUCZAK, 2009). Adicionalmente, sendo os BFs capazes de interferir na cicatrização tecidual de feridas orais, devido aos seus efeitos tóxicos diretos no epitélio oral, a exposição óssea fica favorecida e, assim, facilita a maior adesão microbiana, posteriormente associada a lesões de OMB (LANDESBERG et al., 2008).

A facilitação da adesão de algumas bactérias, através da ligação de MSCRAMMs, à matriz inorgânica impregnada com bisfosfonatos parece ocasionar modificações no perfil microbiano oral. Observou-se que pacientes normossistêmicos apresentaram maior contingente de bactérias gram-negativas quando comparados aos pacientes que fazem uso de bisfosfonatos.

Nesses pacientes, visualizam-se espécies Gram-positivas do filo TM7 e Actinobacteria, as quais também têm sido relacionadas à presença de OMB. As amostras clínicas de ossos necróticos apresentaram-se colonizadas por bactérias gram-positivas, como as do filo Firmicutes, predominando *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Staphylococcus*, do filo Actinobacteria e TM7. Sugere-se que uma elevada abundância de *Streptococcus* e outras bactérias sacarolíticas exerçam papel significativo no desenvolvimento da necrose óssea. Essas espécies criam um ambiente ácido, também encontrado em situações de cicatrização tecidual e infecções, o que predispõe a maior crescimento do contingente de outras bactérias acidúricas, favorecendo a amplificação do estímulo infectoinflamatório (WEI et al., 2012). Além do *Streptococcus*, outras bactérias que estão frequentemente relacionadas à ocorrência de OMB podem auxiliar nesse processo. *Actinomyces*, por exemplo, são bactérias que possuem característica principal de coagregação, o que facilita a colonização polimicrobiana (HINSON et al., 2014).

De modo controverso, outros estudos sugerem que a OMB se desenvolva primariamente como um processo asséptico, gerado a partir da inflamação no osso. A OMB, então, se instala seguindo um período de vários meses. A progressão da necrose óssea acarreta em dano à mucosa de recobrimento, gerando a exposição óssea. Após exposto no meio oral, o osso é colonizado por bactérias presentes no meio, favorecendo a infecção secundária desse sítio. A partir da infecção é que comumente ocorrem os sintomas, o que facilita a busca pelo diagnóstico (LESCLOUS et al., 2009). Entretanto, em estudo anterior deste grupo de pesquisa, evidenciou que, embora a inflamação pareça atuar no agravamento da OMB, a inibição da migração de polimorfonucleares neutrófilos para o sítio de exodontia, obtida através do tratamento continuado com nimesulida, não foi capaz de prevenir a OMB em relação aos animais tratados com salina. Em ambos os grupos, observou-se a presença de colônias bacterianas na lesão de OMB (OLIVEIRA et al., 2017).

Há apenas um estudo clínico avaliando a influência da terapia antibiótica na microbiota de pacientes com OMB já instalada no ambiente oral. Com esse trabalho, demonstrou-se não haver mudanças no perfil microbiológico no biofilme encontrado nas mandíbulas de pacientes com OMB tratados ou não com antibióticos (JI et al., 2012). Mesmo com o uso prévio de antibioticoterapia, foi reportado alto índice de recidiva das lesões necróticas, o que esteve associado, em grande parte dos pacientes, à presença de infecção bacteriana local (MÜCKE et al., 2010). Acredita-se que essa resistência bacteriana à ação dos antibióticos ocorra pela organização das bactérias em biofilmes, que levam à expressão de genes de resistência bacteriana, requerendo cerca de quantidade 1000 vezes maior do que concentração inibitória mínima capaz de debelar bactérias planctônicas (DEL POZO, PATEL,

2007; REID; CORNISH, 2012). Além disso, sabe-se que os bisfosfonatos potentes, como o AZ, possuem propriedades antiangiogênicas (SANTINI et al., 2002), o que poderia comprometer a distribuição do fármaco, sobretudo em osso mandibular. Entretanto, com esses achados, não seria possível assegurar a real influência da presença de infecção no desenvolvimento de OMB e estabelecer seguramente que a antibioticoterapia representa uma manobra terapêutica confiável.

A partir do exposto, hipotetiza-se que a presença do biofilme oral possa atuar como um fator desencadeador da quimionecrose do osso mandibular induzida pelo tratamento com bisfosfonatos. O entendimento da etiopatogênese da OMB, com base na interação entre imunidade e infecção, facilitaria a proposição e implantação de medidas preventivas e terapêuticas realmente eficazes para essa condição.

3 JUSTIFICATIVA

A OMB é um efeito adverso do uso dos bisfosfonatos que pode trazer consequências graves para o bem-estar dos pacientes que necessitam dessa terapia. Sua etiopatogênese ainda se encontra indefinida e diversas hipóteses têm sido elaboradas para tentar elucidar essa desordem. Estudos desenvolvidos pelo presente grupo de pesquisa têm demonstrado aumento de marcadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e NF κ B, em ratos submetidos à indução da osteonecrose dos maxilares, além do aumento de células polimorfonucleares (BARROS-SILVA et al., 2016). Por outro lado, a inibição de NF κ B, através da administração de diferentes doses de glicocorticoides, além da redução do infiltrado inflamatório polimorfonuclear, decorrente da administração de nimesulida, não demonstrou efeitos na redução desse evento (OLIVEIRA et al., 2017), o que indica que a inflamação pode assumir um papel coadjuvante no desenvolvimento dessa condição, mediada por outros mecanismos.

Sabe-se que a presença de biofilme bacteriano pode estar associada ao osso necrótico e tem-se hipotetizado que o próprio BF contribua para adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies mineralizadas, como dente e osso alveolar. Corroborando com esse fato, sinalizadores de infecção bacteriana mostraram-se elevados, assim como marcadores de necrose óssea, na polpa de ratos tratados com ácido zoledrônico (BARROS-SILVA et al., 2019). Além disso, a imunossupressão, sobretudo ocasionada por doses crônicas de corticoides, é um fator fortemente relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento de lesões de OMB, o que provavelmente se deve à facilitação da disseminação da infecção.

Dessa forma, sugere-se que haja um componente infeccioso importante para o desenvolvimento da OMB, e a utilização de animais *Specific-Pathogen-Free* (SPF) em modelos experimentais que simulam essa condição poderia representar avanços na compreensão da sua etiopatogênese. Além disso, é desconhecido na literatura o efeito de terapia com bisfosfonatos em animais SPF e convencionalizados, inclusive em modelos experimentais de OMB previamente estabelecidos.

A presente proposta visa, de maneira inédita, contribuir para a compreensão do papel da infecção no desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos, trazendo avanços no entendimento da fisiopatologia desta enfermidade. A partir de estudos como esse, novas propostas terapêuticas preventivas e curativas podem ser direcionadas, além de guiar a conduta clínica odontológica em pacientes que fazem uso de drogas antirreabsortivas.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o papel de biofilmes microbianos na osteoquimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico.

4.2 Específicos

- Avaliar as alterações microtomográficas associadas ao tratamento com ácido zoledrônico em animais selvagens, SPF e convencionalizados, submetidos à exodontia;
- Avaliar o padrão histopatológico de osteoquimionecrose associado ao tratamento com ácido zoledrônico no sítio de exodontia mandibular, em animais selvagens, SPF e convencionalizados;
- Analisar a composição microbiológica e as características morfológicas, tintoriais e de agrupamento em arranjos bacterianos presentes na cavidade bucal de animais selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com ácido zoledrônico;
- Analisar a toxicidade sistêmica (alterações em peso, hematológicas e histopatológicas em órgãos-alvo) do tratamento crônico com ácido zoledrônico em animais selvagens, SPF e convencionalizados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cálculo Amostral

No estudo de Kos et al. (2013), observou-se aumento do número de colônias bacterianas em discos de hidroxiapatita incubadas ($32,208 \pm 5,368$) com pamidronato em relação aos discos não incubados ($24,156 \pm 1,420$). Baseado na diferença de médias encontradas nesse estudo (teste t de Student), estimou-se necessário avaliar um total de 5 (cinco) animais, considerando um poder de 90% e uma confiança de 95%. Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra, acresceu-se 20% a cada grupo de estudo, totalizando 6 (seis) animais por grupo, a fim de obter uma amostra que rejeita a hipótese de nulidade deste estudo.

O estudo de Kos et al. (2013) demonstrou excelente resultado do BF como determinante para a adesão bacteriana em discos mineralizados *in vitro*, o que permitiu que o número de animais obtidos no cálculo amostral para o presente trabalho chegasse a resultados aceitáveis do ponto de vista ético. A utilização de médias obtidas em estudos *in vivo* para o mesmo cálculo amostral resultou em número de animais inferior a 3 ou superior a 12 animais por grupo, o que inviabilizaria o uso dos dados para análise estatística e estaria em desacordo com o princípio ético de redução do número de animais.

5.2 Animais

Após aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (protocolo 85/16) e da Universidade de Fortaleza (protocolo 6466171017), selecionaram-se 36 camundongos C57 BL/6 fêmeas, com massa corpórea entre 19 e 23 g. Desses, 12 animais eram selvagens (isto é, provindos de um biotério convencional) e 24 animais eram *Specific-Pathogen-Free* (SPF).

Os camundongos selvagens foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e transferidos para o Biotério Setorial do Núcleo de Desenvolvimento em Pesquisa com Medicamentos (NPDM) da referida universidade. Esses foram mantidos no Biotério Subsetorial do Laboratório de Oncologia Experimental e acondicionados em gaiolas apropriadas de polipropileno, medindo 369 x 156 x 132 mm, em número de seis animais por caixa, e numerados individualmente através de marcação no rabo, refeitas quando necessário. Os animais receberam ração comercial balanceada própria (Biotec®, Águas Frias, Santa Catarina, Brasil) e água *ad libitum* filtrada, mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas e

temperatura entre 22°C-23°C em estante apropriada e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante todo o experimento. Os camundongos foram manipulados sempre em estação de troca laminar, desinfectada previamente com álcool 70%.

Os animais SPF procederam do Biotério da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), onde foram mantidos. As matrizes de camundongos SPF foram provenientes da FIOCRUZ - Manguinhos/RJ. São considerados SPF por seguirem rigorosas medidas de barreira sanitária, como a manipulação por um funcionário devidamente treinado, que, para ter acesso às matrizes, deve passar por uma câmara de higienização com banho e higiene obrigatória, esterilização em todos os equipamentos e materiais que entram em contato com as matrizes são esterilizados e o ambiente possui sistema de ventilação com fluxo único e com ventilação forçada. A condição SPF é avaliada e confirmada a partir de análises microbiológicas do ambiente e controle sanitário dos animais, semestralmente.

Os camundongos SPF foram acomodados em gaiolas apropriadas, medindo 369 x 156 x 132 mm, contendo cada uma seis animais. Essas gaiolas possuem Sistema Smart-flu, sendo mantidas em estante *sealsafe* com isolador (Tecniplast®, Buguggiate, Itália). Os animais receberam ração comercial (Presence®, Paulínia, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*, estéreis em autoclave (Ortosintese®, São Paulo, São Paulo, Brasil) com 121° por 30 min. Esses foram mantidos em ciclos de claro/escuro a cada 12 horas e temperatura de 22°C-23°C. A identificação dos roedores foi feita através de numeração individual com marcação com tinta no rabo, sendo refeitas quando necessário. Os camundongos foram manipulados sempre em estação de troca laminar, desinfectada previamente com álcool 70%. Os pesquisadores utilizaram luvas cirúrgicas e aventais descartáveis e todos os insumos que entraram em contato direto com o animal foram previamente desinfectados ou esterilizados.

Todos os animais foram pesados no dia 0 e a massa corpórea serviu como parâmetro para composição dos grupos experimentais (selvagens, SPF).

5.3 Modelo experimental de Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos (OMB)

O protocolo foi baseado em modelo experimental adaptado de Sonis et al. (2009) e Maahs et al. (2011) e desenvolvido, por esse grupo de pesquisa com sucesso anteriormente (SILVA et al., 2015), com adaptações para o modelo em camundongos C57 BL/6, também executadas anteriormente e descritas na literatura (MAWARDI et al., 2011).

A osteonecrose dos maxilares foi induzida através da administração intraperitoneal (IP) de três doses semanais consecutivas de ácido zoledrônico na concentração de 1 mg/kg, nos dias 0, 7 e 14. Após quatro semanas (28 dias) da última administração do ácido zoledrônico (42º dia experimental), realizou-se a exodontia do segundo molar inferior esquerdo dos animais. Uma semana depois do procedimento cirúrgico (dia 49), uma nova dose (1 mg/kg) do bisfosfonato foi administrada por via IP. Animais utilizados como controles daqueles que receberam indução de OMB foram submetidos à infusão de solução salina 0,9% via IP (1 ml/kg) e também tiveram exodontias realizadas no 42º dia experimental (Figura 1).

Antes de iniciar as exodontias, os animais foram anestesiados com quetamina HCl (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Iniciou-se o procedimento de exodontia, a partir da sindesmotomia, utilizando sonda exploradora odontológica nº5 (GOLGRAN[®]) e, em seguida, foi feita a luxação do 2º molar inferior esquerdo com movimentos de alavanca, utilizando uma cureta Mc Call 17-18 (GOLGRAN[®]) (Técnica adaptada de ALVES et al., 2007; MAAHS et al., 2011; SILVA et al., 2015).

Dois operadores previamente capacitados e treinados realizaram as exodontias e os animais foram randomizados quanto à ordem que se submeteram ao procedimento cirúrgico (comando aleatorização, Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation[®]), no intuito de dissipar o erro de força do operador.

A eutanásia dos animais ocorreu quatro semanas após a extração dentária (dia 70) (SILVA et al., 2015), através de sobredose anestésica (Figura 3).

5.4 Grupos Experimentais

5.4.1 Grupos Selvagens

Os animais selvagens, tratados em condições convencionais, constituíram dois subgrupos de seis camundongos cada: um subgrupo selvagem-AZ, submetido à indução de osteonecrose dos maxilares (SELV-AZ), e um subgrupo selvagem-salina (SELV-SAL), submetido à injeção IP de solução salina 0,9% (1 ml/kg). Em ambos os subgrupos, foi realizado o procedimento cirúrgico de exodontia do 2º molar inferior esquerdo.

5.4.2 Grupos SPF

Os animais SPF também constituíram dois subgrupos de seis camundongos cada: um subgrupo AZ, submetido à indução de osteonecrose dos maxilares (SPF-AZ), e um subgrupo salina (SPF-SAL), submetido à IP de solução salina 0,9% (1 ml/kg). Em ambos os subgrupos, foi realizado o procedimento cirúrgico de exodontia do 2º molar inferior esquerdo.

Para garantir que os animais SPF permaneceram totalmente livres de contaminação, foi realizado *swab* da cavidade oral dos animais nos dias 0 e 70 (eutanásia) e foram mantidas condições totalmente assépticas para sua manipulação.

5.4.3 Grupos Convencionalizados

Doze animais SPF foram convencionalizados, a fim de colonizar o ambiente oral desses animais com a microbiota de um camundongo selvagem. As amostras de biofilme oral foram obtidas de 12 camundongos C57 BL/6 selvagens e que não estavam submetidos a qualquer manipulação experimental.

Foi realizado, no dia -16, *swabs* nas cavidades orais dos camundongos selvagens, com a ajuda de um *microbrush* estéril (ANBINDER et al., 2016). Para isso, o *microbrush* foi introduzido na cavidade oral e friccionado sob a superfície dos dentes superiores, palato, mucosa jugal esquerda, dentes inferiores, língua, assoalho bucal e mucosa jugal direita, em movimento circular em sentido horário, o qual foi repetido cinco vezes sequencialmente. O *microbrush* repleto de biofilme dental de animais selvagens foi inserido em 3 ml de meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion, (B37) Difco-reidratado: 37 gramas para 1.000 ml de água), KASVI®, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), os quais seguiram para incubação em estufa microbiológica calibrada para 37°C (Thermo Fischer Scientific, Model 311, OH 45750, Marietta, Ohio, USA), mantidos por 48 h sob atmosfera de 5% de CO₂. Após os tubos de ensaio serem removidos da estufa, o conteúdo foi friccionado nos dentes superiores, palato, mucosa jugal esquerda, dentes inferiores, língua, assoalho e mucosa jugal direita de camundongos SPF (Adaptado de CZUPRYNSKI; BALISH, 1981), em movimento circular em sentido horário, o qual foi repetido cinco vezes sequencialmente (dia -14). O procedimento foi repetido nos dias -12 e -10 (Figura 3; Figura 4). Após a contaminação da boca com micro-organismos orais de camundongos selvagens, os animais convencionalizados (ex-SPF) permaneceram recebendo água e ração estéreis, no intuito de evitar contaminação por outros micro-organismos.

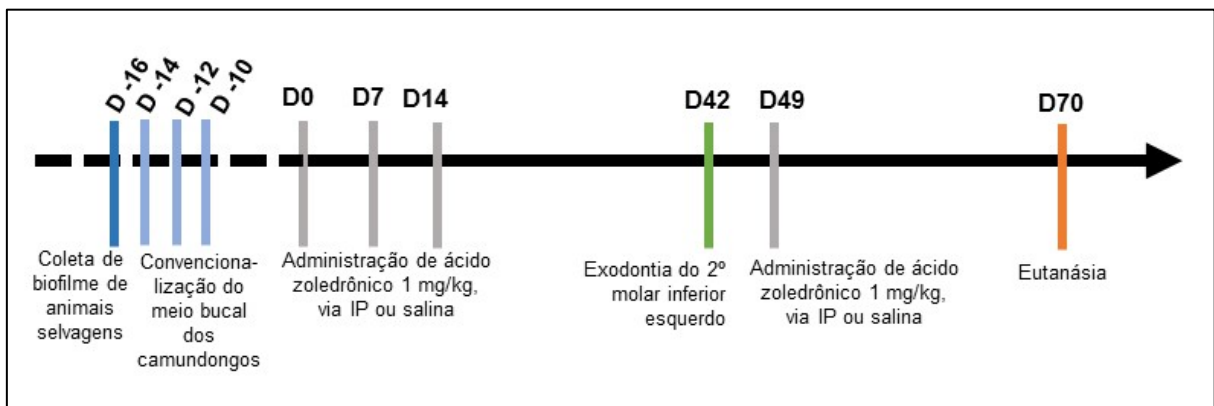
Para verificar se foi obtida adequada convencionalização dos animais, foram recolhidas amostras de biofilme dos camundongos ex-SPF, com a ajuda de *swabs* estéreis no dia 0. Imediatamente após a coleta, os *swabs* foram imersos em meio de cultura líquido BHI,

os quais foram mantidos por 48 h em incubação, sob atmosfera de 5% de CO₂ em estufa microbiológica calibrada para 37°C (Thermo Fischer Scientific, Model 311, OH 45750, Marietta, Ohio, USA). Para confirmação de crescimento bacteriano, foi observada a turvação do meio e, em todos os casos, foi utilizado um tubo de ensaio controle negativo (sem amostras) para comparação. Caso não houvesse crescimento bacteriano algum, o animal seria retirado do grupo (Figura 4).

Os animais convencionalizados que demonstraram cultura positiva (100% dos casos) foram divididos em dois subgrupos, contendo, cada um, seis camundongos ex-SPF. Um desses subgrupos, convencionalizado-AZ (CONV-AZ), foi submetido à indução de osteonecrose dos maxilares como descrito anteriormente e o outro, convencionalizado-salina (CONV-SAL), foi submetido à injeção intraperitoneal (IP) de solução salina 0,9% (1 ml/kg) e à exodontia do 2º molar inferior.

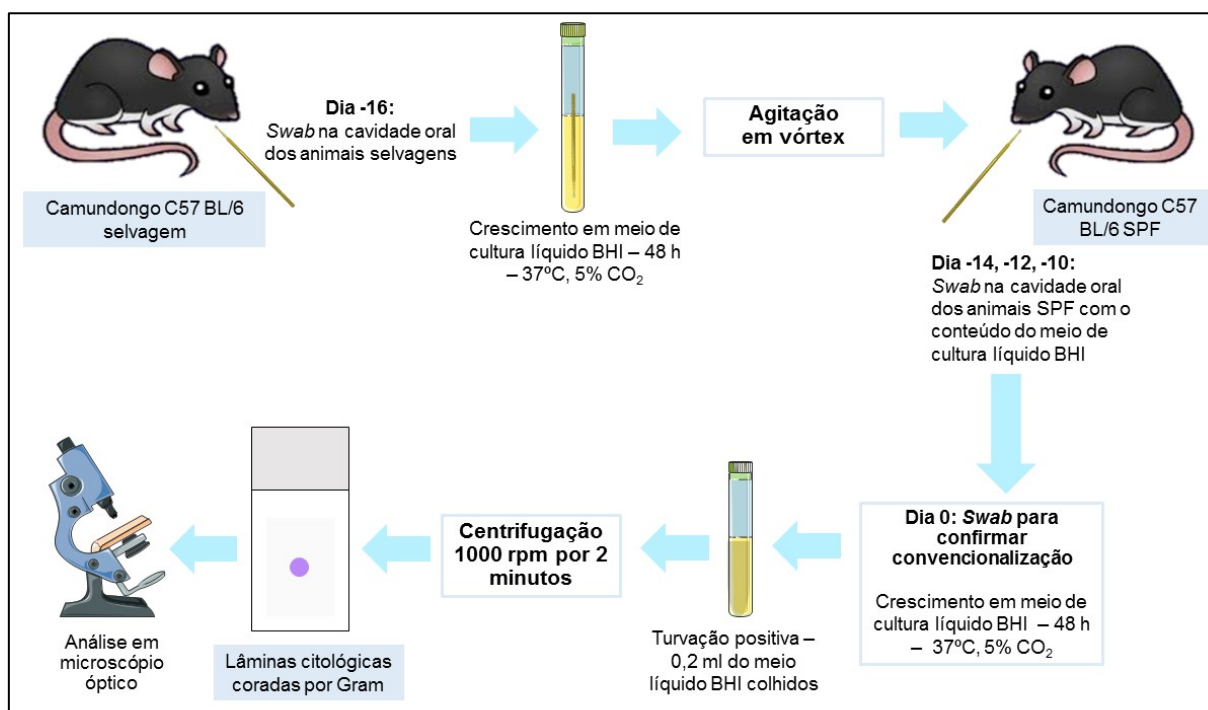
No dia 70, foram obtidos novos *swabs* dos camundongos convencionalizados, a fim de realizar incubação em meio de cultura líquido BHI, para verificar a permanência da convencionalização dos animais ex-SPF até o último dia experimental.

Figura 3 - Protocolo experimental simplificado. O esquema representa o protocolo experimental geral de indução de OMB associado ao regime de convencionalização de animais SPF.



Fonte: Próprio autor.

Figura 4 - Protocolo de convencionalização de inoculação de bactérias da microbiota oral de camundongos selvagens em camundongos SPF.



Fonte: Próprio Autor

5.5 Análise Citológica Qualitativa

O biofilme oral dos animais selvagens, SPF e convencionalizados, dos subgrupos salina e OMB, foi recolhido nos dias 0 e 70 e, em seguida, imerso em 3 ml de caldo de cultura BHI (Brain Heart Infusion, (B37) Difco-reidratado: 37 gramas para 1.000 ml de água), KASVI[®], São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), em tubos de vidro de falcon estéreis (10 ml). A transferência dos biofilmes para os tubos Falcon foi feita com os cuidados e técnicas de rotina bacteriológica em capelas de fluxo laminar. Todos os tubos foram identificados de acordo com o animal a que o biofilme corresponde e transferidos para estufa de cultura microbiológica calibrada em 37° C (Thermo Fischer Scientific, Model 311, OH 45750, Marietta, Ohio, USA), por 48 horas, sob atmosfera de 5% de CO₂, no Laboratório de Ensaio em Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (FFOE-UFC).

Após 48 h, positividade ou negatividade de turvação do meio BHI foi afirmada por meio de exame visual contra a luz, momento em que se realizou a retirada destes da estufa. Nos casos positivos à turvação, recolheu-se 0,2 ml de cada meio turvado, utilizando-se para cada

recolhimento uma seringa hipodérmica de 1 ml, seguido da centrifugação destes a 1.000 rpm por 2 minutos. A partir dos sobrenadantes resultantes, foram confeccionados esfregaços, os quais foram secos e, em seguida, fixados por calor, através da chama de bico de Bunsen, corados pelo Gram, seguindo as instruções do fabricante (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil), e analisados através de microscopia ótica, sendo considerada a presença ou a ausência de microorganismos, seu formato e organização (MOTA, 2013). Para análise e avaliação entre os grupos, organizou-se uma escala, tendo como escores a presença e diversidade dos tipos de bactérias encontrados em cada lâmina, adaptando-se a partir da análise de biofilme realizada em estudo prévio de Løe; Theilade; Jensen (1965).

Quadro 1 – Escores categóricos microbiológicos para caracterização da microbiota oral de camundongos selvagens, SPF e convencionizados.

ESCORE	BACTÉRIAS PRESENTES NA COLORAÇÃO GRAM
0	Meio de cultura sem bactérias; lâmina sem coloração.
1	Predominância de bactérias Gram-positivas (cocos e/ou bacilos), com presença de organização em cordões (<i>Streptococcus</i>), em aglomerados (<i>Staphylococcus</i>) ou diplococos.
2	Predominância de bactérias Gram-negativas (cocos e/ou bacilos).
3	Padrão observado em escores 1 ou 2 associado à presença de bactérias filamentosas
4	Padrão observado em escores 1, 2 ou 3 associado a estruturas sugestivas de hifas de <i>Candida</i> sp.

Fonte: Próprio Autor.

5.6 Análise Imaginológica (mandíbulas)

Após a eutanásia, as mandíbulas foram excisadas cirurgicamente e hemisseccionadas por um único operador e, em seguida, armazenadas em formol neutro 10%. Após fixadas, as hemimandíbulas esquerdas foram enviadas para o Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica Histologia Humana, do Departamento de Morfologia da UFPB, onde foram analisadas por um sistema de microtomografia computadorizada (micro-TC) por cone-beam (SkyScan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raios X foi operado em um potencial de aceleração de 80 kV, com uma corrente de feixe de 124 mA, utilizando filtro de alumínio de 0.5 mm e um tempo de exposição de 270 ms/projeção. Utilizou-se *rotation step* 0,3, *avareng* 3, pixel 7,85 e rotação de 180 graus. O voxel utilizado foi de 948 x 948 pixels.

Através de software apropriado (Data Viewer 1.5.0.0, Bruker), os modelos tridimensionais gerados foram girados em uma posição padrão, de acordo com os seguintes critérios: 1) no plano transaxial, o primeiro molar inferior teria seu eixo posicionado verticalmente; 2) no plano coronal, o osso mandibular foi orientado verticalmente, com a raiz mesial do primeiro molar inferior na parte superior parte da imagem. A partir dessa padronização, obtiveram-se cortes sagitais. Escolheu-se o corte onde o primeiro molar evidenciasse coroa e raiz inteiras de maneira mais nítida e transferiu-se ao software de análise de imagem Image J[®] (Wayne Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Services Research Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.). Após aleatorização (comando aleatorização, Microsoft Excel, 2007, Microsoft Corporation[®]), um operador, que desconhecia a que animal pertencia cada corte sagital, mensurou em triplicata a área hipodensa sugestiva de OMB nos sítios pós-exodontias através do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*). Foi considerada como unidade amostral a média aritmética das três mensurações, quantificada em pixels (SILVA et al., 2015). Aos animais que apresentaram restos radiculares e/ou osso preenchendo todo o alvéolo foram atribuídas mensurações iguais a zero.

5.7 Confeção de lâminas histológicas e estudo histomorfométrico das mandíbulas

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

Após análise descritiva, as lâminas histológicas foram fotografadas (Microscópio Leica DM 2000 com câmera acoplada Leica DFC295 3.0M Pixel e programa Leica Application Suite 4.3.0) em cinco campos microscópicos de grande aumento (400x) no sítio referente à exodontia do segundo molar inferior esquerdo, e um operador, que desconhecia a que grupo pertencia cada animal, contaria as mesmas. Os campos selecionados correspondem à borda anterior do alvéolo pós-extração e as áreas a serem fotografadas sempre avançavam no sentido para posterior, de modo a não repetir as áreas fotografadas. As imagens foram lançadas no software Image J[®] (Wayne Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Services Research Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.) e, através do comando *cell*

counter, foram mensurados o número de osteoclastos com vitalidade e com sinais histológicos de apoptose (hipo ou hiperchromatismo nuclear e presença de múltiplos vacúolos intracitoplasmáticos) (PAZIANAS, 2011; HANSEN et al., 2006; HALLEEN et al., 1999), número de polimorfonucleares neutrófilos e monócitos. Considerar-se o somatório dos campos de cada lâmina como unidade amostral, utilizando o percentual osteoclastos em apoptose, bem como o número total de células inflamatórias (soma entre número de polimorfonucleares neutrófilos e de monócitos), para avaliação quantitativa. Aferiu-se, ainda, o percentual de animais com presença de colônias bacterianas (SILVA et al., 2015) e de sequestros ósseos no osso mandibular (Adaptado de CÓRDOVA et al., 2016).

5.8 Coleta de sangue e análise de parâmetros hematológicos

Cada camundongo teve 0,2 ml de sangue coletados através do plexo retro-orbital, com a ajuda de capilares de vidro, para realização de seu hemograma completo. A técnica foi escolhida, uma vez que é capaz de conferir a quantidade de sangue necessária para análise de hemograma. Outros métodos, como a coleta da veia safena e caudal, conferem pouco sangue e não são indicadas para camundongos C57/BL6, respectivamente (NC3Rs).

Para esse procedimento, os animais estavam previamente anestesiados, com quetamina HCl (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrado por via intraperitoneal. Foram realizadas duas coletas de sangue: a primeira no dia 0, antes da administração de AZ ou salina, e outra no dia 70, dia da eutanásia. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos próprios para coleta com EDTA dissódico e levadas imediatamente para serem submetidas à análise hematológica de hemograma completo por analisador hematológico automatizado (Abc-Vet, Horiba ABX Diagnostics®, Irvine, California, Estados Unidos). Mensuração quantitativa do eritrograma (número total de células da série vermelha, dosagens de hemoglobina, hematócrito), a plaquetometria e o número total e diferencial de leucócitos foram mensurados.

5.9 Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais

5.9.1 Análise do ganho de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas no dia 0 e, após este, semanalmente, durante todo o período experimental, até o dia 70.

5.9.2 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço

Os órgãos retirados dos animais, no dia do sacrifício, foram armazenados em solução de formol 10% tamponado. Quarenta e oito horas depois, os mesmos foram lavados em água corrente e analisados macroscopicamente, sendo examinadas alterações na forma, coloração e consistência. Em seguida, as peças foram seccionadas, colocadas em cassetes e seguidas para processamento histotécnico automatizado (PT05 LupTec[®], São Carlos, São Paulo, Brasil). Cortes de 4 µm de espessura foram feitos para confecção de lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina e montadas em bálsamo de Canadá (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983; TIMM, 2005) para análise em microscópio de luz convencional quanto à presença de alterações específicas de cada órgão, realizada por um único examinador.

5.9.3.1 Estômago

Para analisar a toxicidade morfológica do tratamento com ácido zoledrônico em animais selvagens, SPF e convencionalizados, duas regiões de mucosa gástrica foram observadas: cárdia e fúndica/corpo.

Na região de cárdia, analisou-se os seguintes parâmetros (GREAVES, 2007):

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

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

- a) Integridade do revestimento de mucosa;
- b) Presença de células parietais e principais;
- c) Presença de vasos congestos na submucosa e mucosa;
- d) Presença de hemorragia na submucosa e mucosa.

5.9.3.2 Fígado

As lâminas referentes às amostras de fígado foram avaliadas quanto à presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010):

- a) Congestão vascular portal e da veia centrolobular;

- b) Tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos;
- c) Hiperplasia de células de Kupffer;
- d) Degeneração hidrópica;
- e) Infiltração de células inflamatórias;
- f) Hemorragia sinusoidal;
- g) Necrose de hepatócitos;
- h) Esteatose microvesicular (>5%);
- i) Esteatose macrovesicular (>5%).

5.9.3.3 Rim

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

- a) Tumefação do epitélio tubular;
- b) Presença da estrutura glomerular;
- c) Vacuolização isomérica do epitélio tubular;
- d) Presença de necrose nefrotóxica;
- e) Presença de células inflamatórias no interstício;
- f) Presença de cilindro hialino.

5.9.3.4 Baço

Para análise de toxicidade morfológica do baço, foi verificada a presença e/ou ausência dos seguintes parâmetros:

- a) Presença e preservação dos folículos;
- b) Congestão, hemorragia e/ou hiperplasia da polpa vermelha;
- c) Hiperplasia de polpa branca;
- d) Presença de megacariócitos
- e) Presença de hemossiderófagos e de pigmentos de hemossiderina;
- f) Presença de fibrose.

5.10 Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20,0 para Windows, no qual as análises foram realizadas, adotando uma confiança de 95%. Após avaliação da normalidade (teste de Shapiro-Wilk), os dados quantitativos foram expressos em forma de média e erro-padrão da média e comparados por meio dos testes t de Student, teste t pareado, ANOVA-1-way ou ANOVA-2-way, para medidas independentes ou repetidas, a depender da indicação. Dados semiquantitativos foram expressos em forma de mediana (mínimo-máximo) e submetidos ao teste t de Student e Mann-Whitney. Os dados dicotômicos (ausência ou presença) foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste exato de Fisher.

6 RESULTADOS

6.1 Análise Citológica Qualitativa

A análise citológica qualitativa objetivou visualizar o *status* bacteriano que compunham a microbiota de cada grupo experimental.

No dia 0, lâminas confeccionadas a partir do *swab* da cavidade oral dos animais e coradas pelo Gram revelaram a presença de uma grande diversidade bacteriana nos animais selvagens (SELV-SAL e SELV-AZ). Observaram-se cocos e bacilos, em sua maioria, Gram-positivos, com organização em cordões (sugerindo-se a presença de bactérias do gênero *Streptococcus*); diplococos, tétrades e aglomerados “semelhantes a cachos de uva” (sugerindo a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus*). Foi possível visualizar, ainda, a presença marcante de cocos Gram-negativos em relação aos Gram-positivos e bactérias filamentosas Gram-positivas e Gram-negativas (escore 3) (p-valor=0,845; Teste t de Student) (Figura 5; Tabela 1).

Em animais SPF, o conteúdo bacteriano oral, no início do experimento, diferiu dos animais do grupo selvagem. Os mesmos apresentaram cocos Gram-positivos e Gram-negativos dispostos de forma homogênea. As bactérias Gram-positivas estavam, por vezes, organizadas em cordões (sugerindo-se a presença de bactérias do gênero *Streptococcus*). Em todos os casos, exibiam disposição organizada (escore 2) (p-valor=0,147; Teste t de Student) (Figura 5; Tabela 1).

Os camundongos convencionalizados, no dia 0, já tinham passado por três sessões prévias de inoculação bacteriana e apresentaram presença de cocos Gram-positivos, em sua maioria, como nos animais SPF, além de micro-organismos em organização de diplocos, em cadeias (sugerindo-se a presença de bactérias do gênero *Streptococcus*), tétrades e colônias aglomeradas “semelhantes a cachos de uva” (sugerindo a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus*). Foi possível observar, também, bacilos Gram-positivos, cocos Gram-negativos, embora em proporção menor do que o anteriormente visto em camundongos selvagens, e eventuais bactérias filamentosas Gram-negativas, o que se assemelha ao aspecto observado nos animais selvagem e confirma a convencionalização desses animais (Escore 3) (p=0,923; Teste t de Student) (Figura 5; Tabela 1).

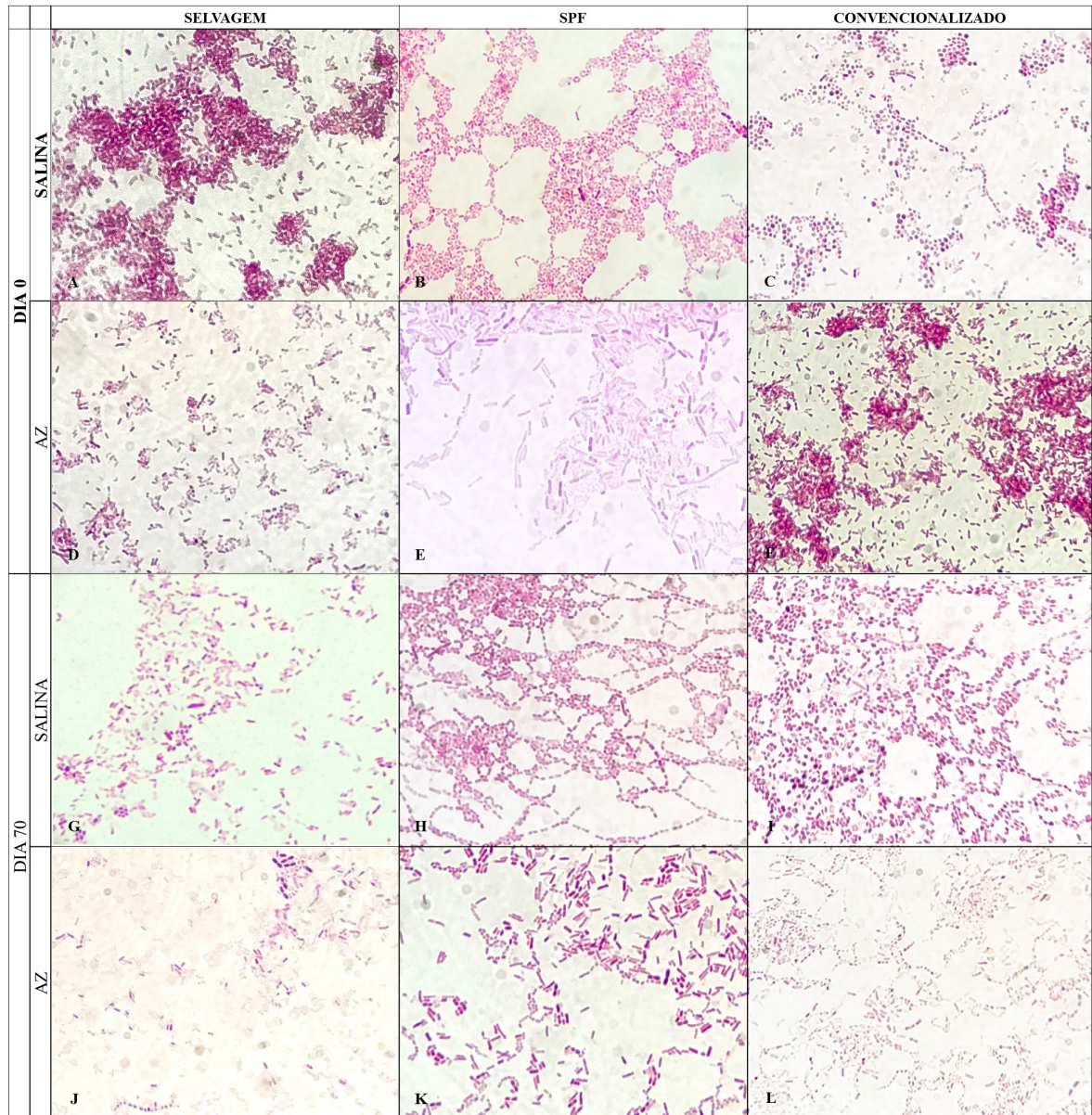
Ao final do experimento (dia 70), os animais selvagens tratados com solução salina (grupo SELV-SAL), embora tivessem mantido *status* bacteriano semelhante ao que foi visto no dia 0 (p-valor=0,560, Teste Mann-Whitney), apresentaram uma maior

proporção de bacilos Gram-negativos do que o que havia sido observado anteriormente (Tabela 1). Já no grupo selvagem tratado com ácido zoledrônico (SELV-AZ), além de evidenciar também maior proporção de bacilos Gram-negativos em relação ao dia 0, observou-se também grande quantidade de cocos Gram-negativos, com permanência de cocos e bacilos Gram-positivos, organizados de maneiras variadas (diplococos, tétrades, cordões e colônias em forma de “cachos de uva”), além de bactérias filamentosas (p-valor=0,137; Teste Mann-Whitney) (Tabela 1). Em alguns animais, tanto tratados com salina como com AZ, foi possível observar presença de formações semelhantes a *Candida* sp (Escore mediano 3,5 (3-4)) (Figura 5; Tabela 1).

No dia 70, nos animais SPF tratados com salina (grupo SPF-SAL), predominou a ocorrência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Escore 1 (1-2)) (p-valor=0,461; Teste Mann-Whitney) (Tabela 1). As bactérias Gram-positivas apareciam como cocos e bacilos, que pouco tinham sido observados no início do experimento. Os cocos Gram-positivos esatavam organizados em cordões, tétrades ou em colônias semelhantes a “cachos de uva”. Nesse dia, também foi possível observar, em diversos animais do grupo tratado com AZ, bactérias filamentosas Gram-positivas, diferentemente dos grupos tratados com salina (p-valor=0,026; Teste t de Student) (Tabela 1).

Camundongos convencionalizados tratados com salina (grupo CONV-SAL) mantiveram, no 70º dia experimental, o perfil semelhante ao observado no início do experimento (p-valor=0,923; Teste Mann-Whitney) (Tabela 1). Assim, percebeu-se predominância de cocos e bacilos Gram-positivos, apresentando, os primeiros, organizações diversas, em diplococos, tétrades, cordões e aglomerados em forma de “cachos de uva”, porém, com coleções significativas de bactérias Gram-negativas, tanto cocos quanto bacilos. Bactérias filamentosas também foram visualizadas nesses animais (Escore 3 (1-3)). Naqueles tratados com AZ (grupo CONV-AZ), observou-se um predomínio de bactérias Gram-negativas, tanto cocos quanto bacilos, chegando à totalidade em alguns animais. Acrescenta-se, ainda, que, em poucos casos, foram evidenciadas imagens sugestivas de *Candida* sp (Escore 2,5 (2-4)) (p-valor=1,000; Teste Mann-Whitney) (Figura 5; Tabela 1).

Figura 5 – Caracterização qualitativa da microbiota oral observada em camundongos selvagens, SPF e convencionais, tratados com AZ ou salina, nos dias 0 e 70 (Coloração de Gram-1000x).



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 1- Escores microbiológicos para caracterização do biofilme oral de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com salina e AZ nos dias 0 e 70.

	Selvagem			SPF			Convencionalizados		
	Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a
Escore microbiológico									
D0	3 (1-3)	3 (1-4)	0,845	2 (1-2)	2 (1-3)	0,147	3 (1-3)	3 (1-3)	0,923
D70	3 (2-4)	3,5 (3-4)	0,338	1 (1-2)	3 (1-3)	*0,026	3 (1-3)	2,5 (2-4)	1,000
p-Valor^b	0,560	0,137		0,461	0,601		0,923	1,000	

Fonte: Dados da pesquisa.

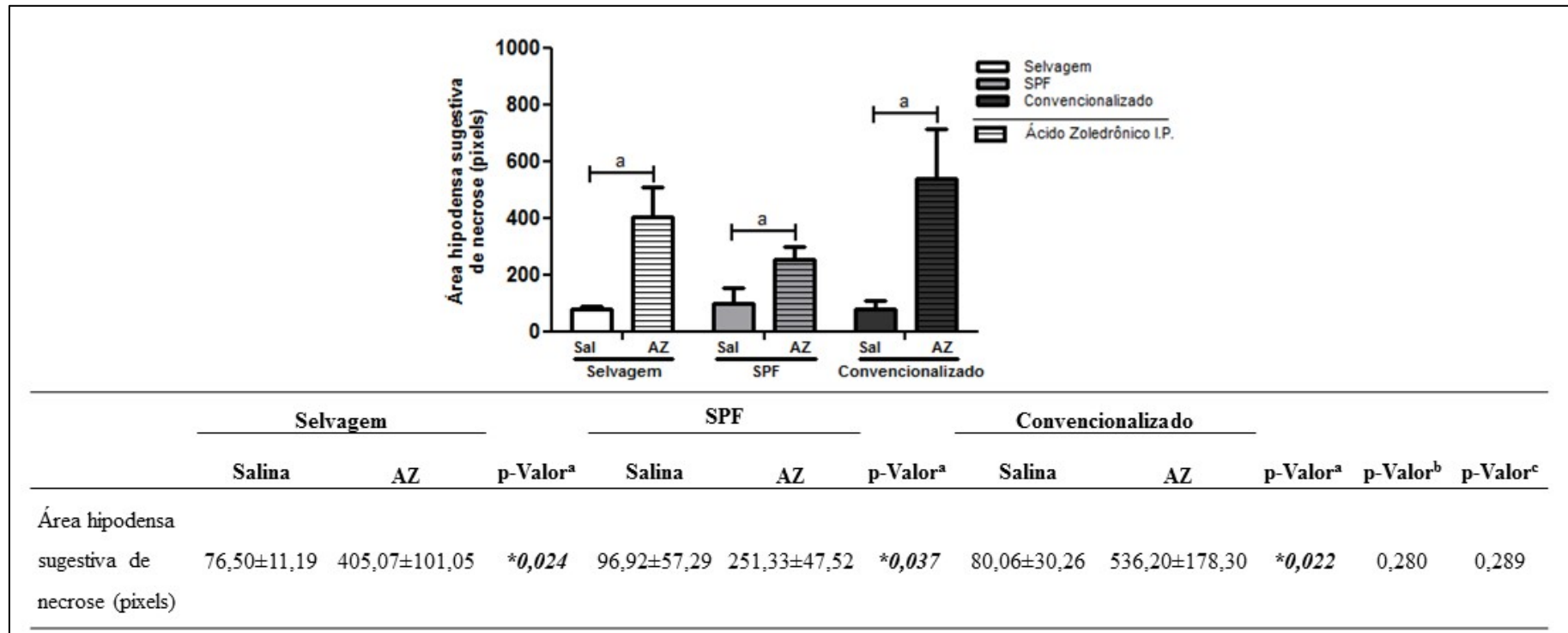
AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

* $p < 0,05$, ^aComparação entre grupos tratados com Salina ou AZ no mesmo dia experimental (0 ou 70) (Teste t de Student); ^bComparação entre dias 0 e 70 dos animais que receberam tratamento com salina ou AZ de cada grupo experimental (Teste Mann-Whitney) (mediana (mínimo - máximo)).

6.2 Análise Imaginológica (mandíbulas)

A área hipodensa sugestiva de necrose aferida a partir dos cortes tomográficos digitais das hemimandíbulas foi significativamente maior nos camundongos selvagens que receberam administração de ácido zoledrônico (grupo SELV-AZ: $405,05 \pm 101,05$ pixels) em relação àqueles tratados com salina (grupo SELV-SAL: $76,50 \pm 11,19$ pixels) (p -valor= $0,024$; Teste t de Student) (Figura 6). Os grupos SPF (p -valor= $0,037$; Teste t de Student) e convencionalizado (p -valor= $0,022$; Teste t de Student) apresentaram comportamento semelhante ao que foi visto nos animais selvagens ($p=0,280$; ANOVA 2-way/Bonferroni; $p=0,289$; ANOVA 1-way/Bonferroni), evidenciando maior área hipodensa na região do alvéolo do 2º molar inferior (SPF-AZ: $251,33 \pm 47,52$ pixels; CONV-AZ: $536,20 \pm 178,30$ pixels) quando comparados aos seus respectivos animais salina (SPF-SAL: $96,92 \pm 57,29$ pixels; CONV-SAL: $80,06 \pm 30,26$ pixels) (Figura 6).

Figura 6 - Área hipodensa, em pixels, presente no sítio de exodontia dos grupos selvagem, SPF e convencionalizados, tratados com salina ou ácido zoledrônico no dia 70.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os grupos submetidos a administrações de ácido zoledrônico (IP) evidenciaram área hipodensa sugestiva de necrose óssea estatisticamente superior aos respectivos grupos controle (*p-valor<0,05, ^aComparação entre salina e AZ no mesmo grupo (Teste t de Student); ^bComparação entre comportamento dos grupos Selvagem, SPF e Convencionalizado entre si (Teste ANOVA 2-way/Bonferroni); ^cComparação entre Selvagem-AZ, SPF-AZ e Convencionalizado-AZ (Teste ANOVA 1-way/Bonferroni); Média±EPM).

6.3 Estudo histomorfométrico das mandíbulas

A análise histopatológica dos sítios de exodontia revelou que os camundongos dos grupos dos animais selvagens tratados com salina (SELV-SAL) apresentavam osso organizado e celularizado, com atividade osteoblástica e raros osteoclastos típicos, além de focos inflamatórios residuais ao redor do sítio de exodontia. Havia tecido conjuntivo fibroso denso, com vasos sanguíneos de calibres variados, além de revestimento íntegro de epitélio pavimentoso estratificado. Por outro lado, os animais selvagens submetidos à OMB (SELV-AZ) exibiam o osso mandibular, ora vital e celularizado, ora contendo inúmeras lacunas de osteócitos vazias, osteoclastos com sinais de apoptose (núcleos picnóticos e vacuolização citoplasmática), eventuais sequestros ósseos e áreas de moderada a intensa inflamação, constituída por polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares (Figura 7).

Animais SPF (SPF-SAL) e convencionalizados tratados com salina (CONV-SAL) apresentaram semelhança ao grupo selvagem que recebeu o mesmo tratamento no aspecto histológico do osso mandibular submetido à exodontia, com integridade de revestimento epitelial pavimentoso estratificado, osso mandibular celularizado e presença de osteoblastos e, mais escassamente, osteoclastos, os quais mantinham sinais de vitalidade. Nesses grupos, pôde ser visualizada algumas áreas adjacentes ao sítio de exodontia contendo células inflamatórias dispersas. Nos camundongos SPF submetidos ao tratamento com AZ (SPF-AZ), evidenciou-se aspecto histológico distinto do que foi observado nos animais selvagens, com osso, em sua grande maioria, vitalizado e celularizado, porém, com presença de áreas focais de lacunas de osteócitos vazias, presença de osteoclastos com sinais de apoptose, além de menor conteúdo de células inflamatórias dispersas pelo espécime. Já naqueles animais convencionalizados e tratados com ácido zoledrônico (CONV-AZ), visualizou-se um aspecto histológico semelhante ao dos grupos selvagem, composto por extensas áreas de lacunas de osteócitos vazias e de sequestros ósseos, além de osteoclastos com sinais de apoptose e moderado a intenso infiltrado inflamatório misto, constituído, em sua maioria, por polimorfonucleares neutrófilos (Figura 7).

Para o estudo histomorfométrico das hemimandíbulas, avaliaram-se os seguintes parâmetros: número total de células inflamatórias, número de polimorfonucleares neutrófilos, número de mononucleares, número de osteoclastos total,

percentual de osteoclastos apoptóticos, percentual de animais com colônias bacterianas presentes e percentual de animais com sequestro ósseo presente.

A contagem do número de células inflamatórias foi estatisticamente maior nos camundongos selvagens (p-valor=0,023; Teste t de Student) e convencionalizados (p-valor=0,044; Teste t de Student) submetidos à OMB (SELV-AZ: 858,75±152,95; CONV-AZ: 577,50±149,60) em relação aos seus respectivos grupos salina (SELV-SAL: 341,75±74,29; CONV-AZ: 305,50±153,77). Este comportamento não foi observado nos SPF tratados com AZ (p-valor<0,001; ANOVA 2-way/Bonferroni; p-valor=0,032; ANOVA 1-way/Bonferroni), nos quais a quantidade de células inflamatórias foi estatisticamente semelhante ao SPF-salina (SPF-SAL: 515,20±67,70; SPF-AZ: 442,17±66,80; p-valor=0,465; Teste t de Student) (Figura 7; Tabela 2). No grupo selvagem-AZ, esse aumento das células inflamatórias parece ter sido mais relacionado à maior infiltração de polimorfonucleares neutrófilos (369,60±115,31), que demonstrou acréscimo significativo em relação aos animais selvagem tratados com salina (54,75±11,70) (p-valor=0,047; ANOVA 2-way-Bonferroni), comportamento este distinto do que foi observado nos animais convencionalizados (p-valor<0,001; ANOVA 2-way/Bonferroni) (Figura 7). No grupo convencionalizado, provavelmente, esse aumento se deveu às custas da combinação dos dois tipos celulares, uma vez que não se observou acréscimo significativo de polimorfonucleares neutrófilos (p-valor=0,989; Teste t de Student) e mononucleares (p-valor=0,125; Teste t de Student) em relação aos camundongos do grupo convencionalizado-salina (Figura 8).

O número de osteoclastos mostrou-se mais elevado nas hemimandíbulas esquerdas dos camundongos submetidos à OMB pertencentes aos grupos selvagem (SELV-AZ: 43,8±6,23) e convencionalizado (CONV-AZ: 29,60±5,91) quando comparados aos seus respectivos grupos salina (SELV-SAL: 23,5±3,93; SELV-AZ: 10,00±5,14) (p-valor SELV=0,025; p-valor CONV=0,036; Teste t de Student) (Figura 9). Os animais do grupo SPF tratados com AZ (31,17±5,23) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes nesse parâmetro em relação aos SPF tratados com salina (19,33±4,65) (p-valor=0,122; Teste t de Student), diferindo do comportamento dos demais grupos experimentais (p-valor=0,003; ANOVA 2-way/Bonferroni) (Figura 9).

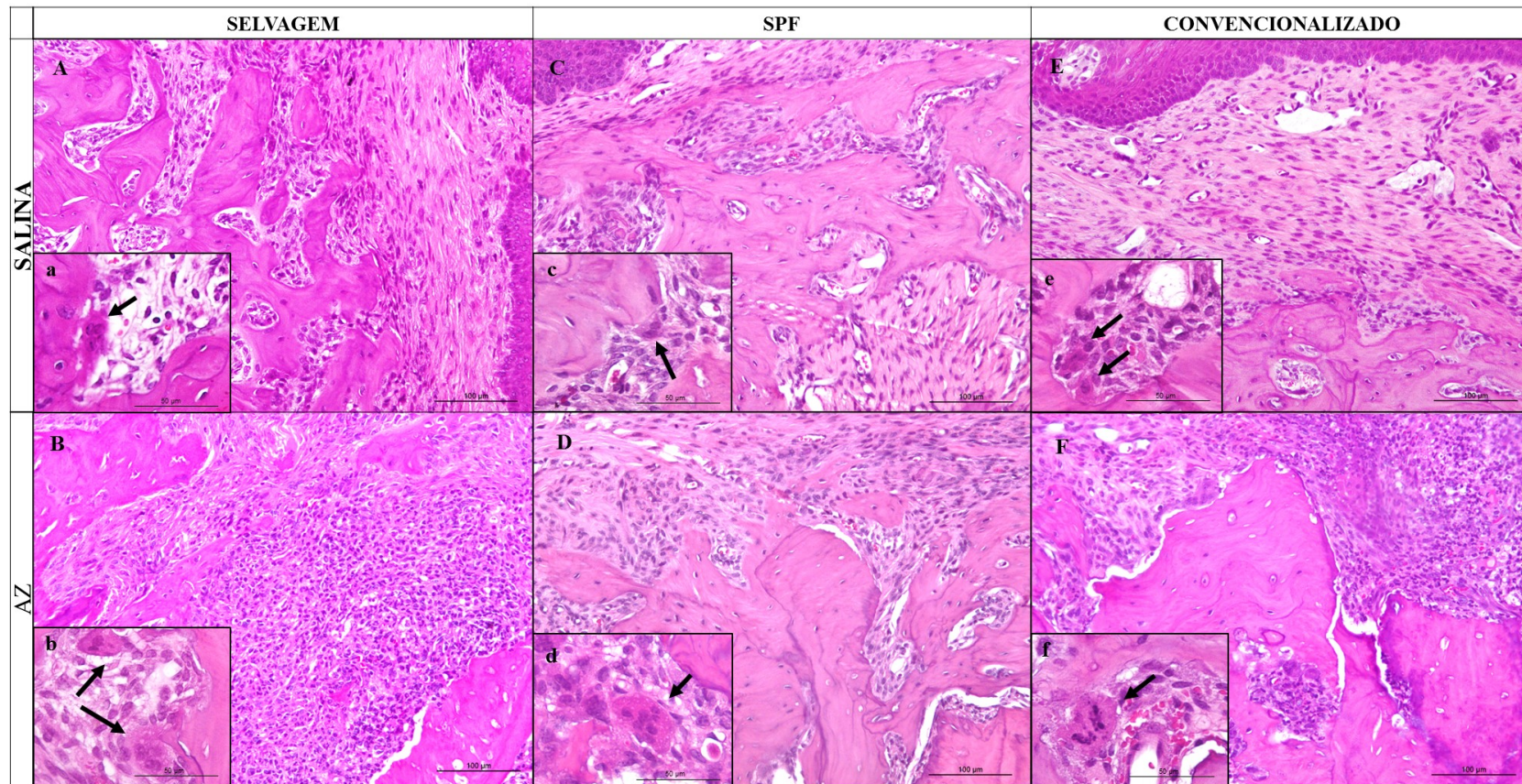
O percentual de osteoclastos apoptóticos foi estatisticamente superior nos animais submetidos à OMB (SELV-AZ: 69,44±3,01%; SPF-AZ: 41,7±8,80%; CONV-AZ: 67,46±10,74%) quando comparados àqueles tratados com salina (SELV-AZ:

1,33±0,87%; SPF-SAL: 6,05±2,88%; CONV-SAL: 8,33±6,54%) (p-valor SELV<0,001; p-valor SPF=0,008; p-valor CONV=0,001; Teste t de Student) (Figura 9).

Alguns camundongos submetidos à OMB exibiram formações sugestivas de presença de colônias bacterianas no sítio de exodontia. Os grupos selvagem-AZ (40%) e convencionalizado-AZ (20%) evidenciaram maior frequência de animais com esse sinal do que os animais SPF-AZ (16,7%). Camundongos tratados com solução salina apresentaram presença de formações sugestivas de colônias bacterianas, mas em frequência menor do que os animais tratados com AZ (SELV-SAL: 33,3%; SPF-SAL: 16,7%; CONV-SAL:0%). Entretanto, entre os grupos tratados com salina e AZ, não houve diferenças estatisticamente significantes em relação a esse parâmetro (p-valor=1,00, Teste exato de Fisher) (Figura 9).

Parte dos animais tratados com AZ exibiu sequestros ósseos no sítio de exodontia (SELV-AZ: 60%; SPF-AZ: 42,7%; CONV-AZ: 60%). Nos grupos controles tratados com salina, esse sinal também foi observado, entretanto, em menores proporções (SELV-SAL: 16,7%; SPF-SAL: 20%; CONV-SAL: 20%). Estatisticamente, não houve diferenças significantes nesse parâmetro quando os grupos tratados com salina foram comparados aos grupos tratados com AZ (p-valor SELV=0,242; p-valor SPF=0,576; p-valor CONV=0,524; Teste exato de Fisher) (Figura 9).

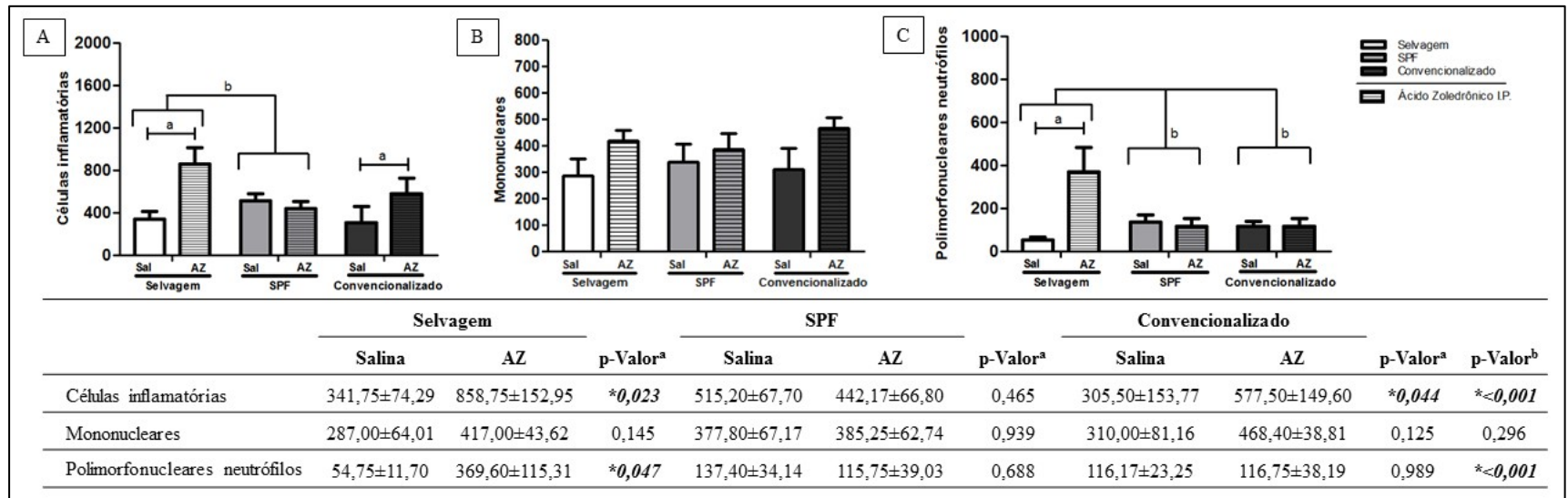
Figura 7 - Aspectos histológicos do sítio de exodontia de animais selvagens, SPF e convencionizados, tratados com AZ ou salina.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (A-C-E) Os grupos selvagem, SPF e convencionizados tratados com salina apresentaram osso com elevada celularidade preenchido por osteócitos no sítio de exodontia do 2º molar inferior esquerdo, com focos de células inflamatórias. (a,c,e) No detalhe, observam-se osteoclastos típicos (B, F) Os camundongos selvagem e convencionizado tratados com AZ exibiram osso ora celularizado e, em trechos, osso desvitalizado, com lacunas de osteócitos vazias, além de moderado a intenso infiltrado inflamatório misto. (b, d, f) No detalhe, observam-se osteoclastos com sinais de apoptose (presença de vacúolos intraplasmáticos e núcleos picnóticos). (D) Os camundongos SPF tratados com AZ exibiram osso celularizado com pequenas áreas de lacunas de osteócitos vazias e presença de focos inflamatórios. (d) Observou-se, ainda, osteoclastos com sinais de apoptose (vacúolos intracitoplasmáticos) (Hematoxilina-Eosina – 200x-400x).

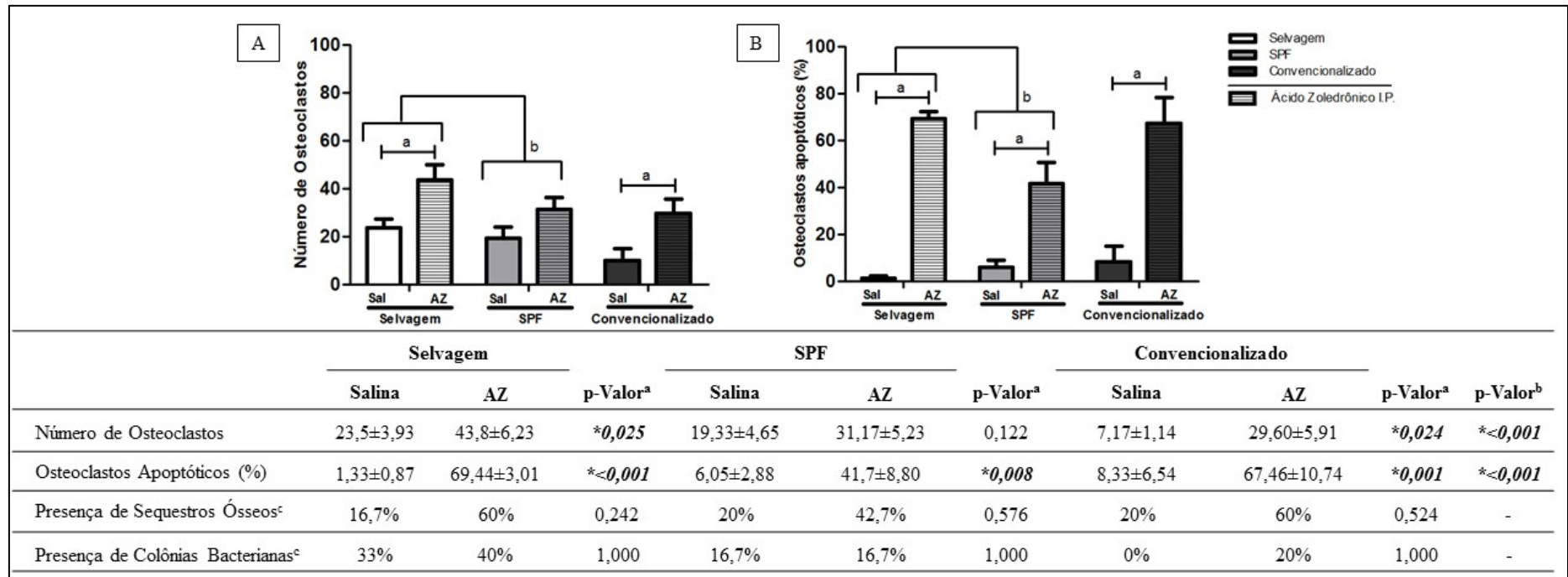
Figura 8 - Análise histomorfométrica da presença de células inflamatórias do sítio de exodontia de animais selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com salina e AZ.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (A, tabela) Os animais dos grupos selvagem e convencionalizados tratados com AZ exibiram maior número de células inflamatórias no alvéolo pós-exodontia em relação aos tratados com salina. (B e C, tabela) Esse aumento parece ter sido causado pela elevação do número de polimorfonucleares neutrófilos no grupo SELV-AZ, enquanto que, no grupo CONV-OMB, parece ter sido motivado pela combinação das suas células. (* $p < 0,05$, ^aComparação entre salina e AZ no mesmo grupo (Teste t de Student); ^bComparação entre comportamento dos grupos Selvagem, SPF e Convencionalizado entre si (Teste ANOVA 2-way/Bonferroni); Média±EPM.)

Figura 9 - Análise histomorfométrica de parâmetros ósseos do sítio de exodontia de animais selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com salina e AZ.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (A, tabela) Os grupos SELV-AZ e CONV-AZ exibiram maior número de osteoclastos em relação aos tratados com salina, comportamento não observado nos animais SPF. (B, tabela). Entretanto, todos os animais tratados com AZ evidenciaram maior percentual de osteoclastos apoptóticos quando comparados aos camundongos tratados com salina. Essa diferença foi mais acentuada nos grupos selvagem e convencionalizado. (Tabela) Os animais tratados com AZ apresentaram maior frequência de animais com frequência de sequestros ósseos e os grupos SELV-AZ e CONV-AZ, de presença de colônias bacterianas no sítio pós-exodontia (**p<0,05*, ^aComparação entre salina e AZ no mesmo grupo (Teste t de Student); ^bComparação entre comportamento dos grupos Selvagem, SPF e Convencionalizado entre si (Teste ANOVA 2-way/Bonferroni); Média±EPM. ^cTeste exato de Fisher (n, %))

Tabela 2 – Análise comparativa entre os dados histomorfométricos de camundongos SPF e convencionalizados tratados com AZ em relação aos animais selvagens tratados com AZ.

Selvagem-AZ versus SPF-AZ ou CONV-AZ	p-Valor	SPF-AZ	Convencionalizado-AZ
Células inflamatórias	0,032*	↓	NS
Polimorfonucleares neutrófilos	0,081	NS	NS
Mononucleares	0,497	NS	NS
Osteoclastos Apoptóticos (%)	0,069	NS	NS
Osteoclastos Total	0,248	NS	NS

Fonte: Dados da pesquisa.

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos); NS: Não-significante.

*p<0,05; Teste ANOVA 1-way.

6.4 Análise de Parâmetros Hematológicos

6.4.1 Eritrograma (*Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito*)

A análise do eritrograma revelou que não houve diferenças estatísticas em relação à contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito entre os camundongos tratados com salina ou tratados com ácido zoledrônico nos grupos selvagem, SPF ou convencionalizados no dia 0 e dia 70.

Entre os grupos, os camundongos selvagens, SPF e convencionalizados apresentaram médias da contagem de hemácias (p-valor=0,758; ANOVA 2-way/Bonferroni) e do hematócrito (p-valor=0,074; ANOVA 2-way/Bonferroni) estatisticamente semelhantes entre si no dia 0 (Tabela 3). A hemoglobina apresentou-se mais elevada nos animais SPF (SPF-SAL: 15,50±0,12 g%; SPF-AZ: 14,98±0,23 g%) quando comparados aos selvagens (SELV-SAL: 13,30±0,26 g%; SELV-AZ:12,73±0,33 g%) (p-valor=0,010; ANOVA 2-way/Bonferroni) (Tabela 3).

Entre os dias 0 e 70, observou-se redução da contagem de hemácias nos camundongos selvagens (p-valor=0,016; Teste t-pareado) e SPF tratados com AZ (p-valor=0,046; Teste t-pareado), o que não ocorreu com os animais convencionalizados-AZ (p-valor=0,100; Teste t-pareado). Essa diminuição provavelmente culminou em redução do hematócrito nos animais SPF-AZ (p=0,036; Teste t-pareado). Ademais, houve também redução dos níveis de hemoglobina nos animais selvagens, tanto aqueles que haviam sido tratados com salina (p=0,034; Teste t-pareado), quanto os tratados com AZ (p=0,048; Teste t-pareado), comportamento que não foi reproduzido nos grupos SPF e convencionalizados (p<0,001; ANOVA 2-way/Bonferroni) (Tabela 4).

No entanto, no final do experimento (dia 70), os camundongos convencionalizados (CONV-SAL: 9,26±0,24 x10⁶/mm³; CONV-AZ:9,38±0,06 x10⁶/mm³) apresentaram maior contagem de hemácias quando comparados aos grupos selvagem (SELV-SAL: 8,67±0,18 x10⁶/mm³; SELV-AZ:8,49±0,17 x10⁶/mm³) e SPF (SPF-SAL:8,94±0,12 x10⁶/mm³; SPF-AZ:8,71±0,17 x10⁶/mm³) (p=0,001; ANOVA 2-way/Bonferroni). Houve ainda maior taxa de hematócrito nos animais convencionalizados (CONV-SAL: 44,50±0,67 %; CONV-AZ: 43,50±0,46 %) em relação aos grupos selvagem (SELV-SAL:41,75±1,03 %; SELV-AZ:40,75±1,03 %) e SPF (SPF-SAL: 41,00±0,00 %; SPF-AZ: 40,17±0,83 %), porém, essa taxa apresentou-se reduzida quando comparada ao dia 0 nos animais do mesmo grupo (p=0,013; Teste t-pareado) (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise Hematológica do eritrograma de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.

		Selvagem			SPF			Convencionalizado			
		Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	p-Valor ^b
Dia 0	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	9,35±0,36	9,77±0,42	0,486	9,70±0,19	9,94±0,22	0,446	9,91±0,21	9,91±0,30	0,996	0,758
	Hemoglobina (%g)	14,83±0,32	14,52±0,37	0,561	15,28±0,25	15,71±0,18	0,181	14,72±0,25	14,38±0,36	0,463	*0,010
	Hematócrito (%)	42,00±2,16	43,60±1,47	0,546	46,17±1,05	46,38±1,02	0,891	46,83±0,79	47,33±1,43	0,766	0,074
Dia 70	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	8,67±0,18	8,49±0,17	0,484	8,94±0,12	8,71±0,19	0,400	9,56±0,24	9,38±0,06	0,472	*0,001
	Hemoglobina (%g)	13,30±0,26	12,73±0,33	0,225	15,50±0,12	14,98±0,23	0,125	14,93±0,30	14,82±0,17	0,741	*<0,001
	Hematócrito (%)	41,75±1,03	40,75±1,03	0,518	41,00±0,00	40,17±0,83	0,363	44,50±0,67	43,50±0,56	0,280	*0,001

Fonte: Dados da pesquisa

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

*p<0,05, ^aComparação entre salina e AZ no mesmo grupo (Teste t de Student); ^bComparação entre comportamento dos grupos Selvagem, SPF e Convencionalizado entre si (Teste ANOVA 2-way/Bonferroni); Média±EPM.

Tabela 4 - Análise da variação do eritrograma entre os dias 0 e 70 dos camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.

Dia 0 versus Dia 70	Selvagem		p-Valor	SPF		p-Valor	Convencionalizado	
	Salina	AZ		Salina	AZ		Salina	AZ
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	0,074	0,016*	↓	0,210	0,046*	↓	0,327	0,100
Hemoglobina (%g)	0,034*	0,048*	↓	0,742	0,086		0,517	0,659
Hematócrito (%)	0,882	0,194		0,085	0,036*	↓	0,221	0,013*

Fonte: Dados da pesquisa.

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

*p<0,05; Teste t-pareado.

6.4.2 Leucograma (Leucócitos, Linfócitos e Neutrófilos)

No que diz respeito à análise hematológica de glóbulos brancos, camundongos tratados com salina ou AZ dos grupos selvagem, SPF e convencionalizados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si no número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos no início do experimento (Tabela 5). Entretanto, entre os grupos, animais SPF (SPF-SAL: 5883 ± 364 /mm³; SPF-AZ: 6175 ± 739 /mm³) e convencionalizados (CONV-SAL: 6683 ± 722 /mm³; CONV-AZ: 7583 ± 978 /mm³) apresentaram maior número de leucócitos totais quando comparados ao grupo selvagem no dia 0 (SELV-SAL: 3550 ± 685 /mm³; SELV-AZ: 5375 ± 727 /mm³) (p-valor=0,001; ANOVA 2-way/Bonferroni) (Tabela 5). Isso provavelmente se deveu pelo maior número de linfócitos, que também apresentaram maiores taxas nesses animais (SPF-SAL: 5301 ± 364 /mm³; SPF-AZ: 5577 ± 746 /mm³; CONV-SAL: 5828 ± 672 /mm³; CONV-AZ: 6277 ± 917 /mm³), quando comparados aos animais selvagens (SELV-SAL: 3127 ± 578 /mm³; SELV-AZ: 2519 ± 279 /mm³) (p-valor=0,004; ANOVA 2-way/Bonferroni) (Tabela 5).

Entre os dias 0 e 70, os camundongos convencionalizados tratados com AZ exibiram redução do número de leucócitos (p-valor=0,010; Teste t-pareado) e linfócitos (p-valor=0,014; Teste t-pareado) (Tabela 6).

No final do período experimental (dia 70), animais que receberam tratamento com salina ou AZ dos grupos selvagem, SPF e convencionalizados não exibiram diferenças estatísticas na contagem de leucócitos, linfócitos e neutrófilos. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos selvagem, SPF e convencionalizados em cada um desses parâmetros (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise Hematológica do leucograma de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.

		Selvagem			SPF			Convencionalizado			
		Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	p-Valor ^b
Dia 0	Leucócitos (/mm ³)	3550±685	2840±308	0,341	5883±364	6175±739	0,756	6683±722	7583±978	0,476	*0,001
	Linfócitos (/mm ³)	3127±578	2519±279	0,344	5301±364	5577±746	0,771	5828±672	6277±917	0,701	*0,004
	Neutrófilos (/mm ³)	402±97	314±39	0,391	549±104	587±101	0,800	844±73	1299±503	0,410	0,063
Dia 70	Leucócitos (/mm ³)	5175±1289	5375±727	0,897	6075±193	6142±786	0,948	5733±513	5100±717	0,489	0,869
	Linfócitos (/mm ³)	4537±1177	3882±1114	0,700	5523±269	5705±783	0,860	5081±491	4460±571	0,428	0,558
	Neutrófilos (/mm ³)	563±126	484±120	0,667	521±93	1152±752	0,522	619±74	602±162	0,926	0,813

Fonte: Dados da pesquisa.

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

*p<0,05, ^ap<0,05, ^aComparação entre salina e AZ no mesmo grupo (Teste t de Student); ^bComparação entre comportamento dos grupos Selvagem, SPF e Convencionalizado entre si (Teste ANOVA 2-way/Bonferroni); Média±EPM.

Tabela 6 - Análise da variação do leucograma entre os dias 0 e 70 dos camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.

Dia 0 versus Dia 70	Selvagem		SPF		Convencionalizado	
	p-Valor		p-Valor		p-Valor	
	Salina	AZ	Salina	AZ	Salina	AZ
Leucócitos (/mm ³)	0,443	0,090	0,646	0,486	0,234	0,010* ↓
Linfócitos (/mm ³)	0,451	0,249	0,594	0,388	0,252	0,014* ↓
Neutrófilos (/mm ³)	0,521	0,389	0,892	0,465	0,172	0,195

Fonte: Dados da pesquisa.

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

*p<0,05; Teste t-pareado.

6.4.3 Plaquetometria

No início do experimento, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na contagem de plaquetas dos animais tratados salina e AZ pertencentes aos grupos selvagem, SPF e convencionalizados (Tabela 7).

Entre os dias 0 e 70, os animais SPF tratados com AZ apresentaram redução significativa na contagem de plaquetas (Tabela 8).

No 70º dia experimental, observou-se uma redução significativa na contagem de plaquetas no grupo selvagem tratado com ácido zoledrônico (SELV-AZ: 505750 ± 93938 /mm³), quando comparado aos animais do grupo selvagem tratados com salina (SELV-SAL: 803500 ± 19116 /mm³) (p-valor=0,021; ANOVA 2-way/Bonferroni). Esse comportamento diferiu em relação aos demais grupos SPF e convencionalizado, onde não foi observada diferenças estatisticamente significantes na contagem de plaquetas entre os animais tratados ou não com ácido zoledrônico (p-valor=0,027; ANOVA 2-way/Bonferroni) (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise hematológica da plaquetometria de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.

		Selvagem			SPF			Convencionalizado			
		Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	p-Valor ^b
Dia 0	Plaquetas (/mm ³)	638500± 148206	590400± 88863	0,779	553500± 100827	662500± 25959	0,255	750167± 18349	689167± 45480	0,242	0,433
Dia 70	Plaquetas (/mm ³)	803500± 19116	505750± 93938	*0,021	424250± 96108	427167± 51265	0,977	610333± 86445	547833± 73421	0,594	*0,027

Fonte: Dados da pesquisa.

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

*p<0,05, *p<0,05, ^aComparação entre salina e AZ no mesmo grupo (Teste t de Student); ^bComparação entre comportamento dos grupos Selvagem, SPF e Convencionalizado entre si (Teste ANOVA 2-way/Bonferroni); Média±EPM.

Tabela 8 - Análise da variação da plaquetometria entre os dias 0 e 70 dos camundongos selvagens, SPF e convencionalizados tratados com AZ ou salina.

Dia 0 versus Dia 70	Selvagem p-Valor		SPF p-Valor		Convencionalizado p-Valor		
	Salina	AZ	Salina	AZ	Salina	AZ	
Plaquetas (/mm ³)	0,303	0,693	0,233	0,008*	↓	0,097	0,177

Fonte: Dados da pesquisa.

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

*p<0,05, Teste t-pareado.

6.5 Análise dos parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos experimentais

6.5.1 Análise do ganho de massa corpórea

A análise do ganho de massa corpórea revelou que os camundongos, independente do grupo (selvagem, SPF e convencionalizado) ou do tratamento (salina ou AZ), ganharam peso ao longo dos setenta dias de experimento (p -valor $<0,001$; ANOVA 1-way-para-medidas-repetidas/Bonferroni). Esse ganho de massa corpórea ocorreu por volta do 56º dia experimental nos animais selvagem tratados com salina e por volta do 42º dia experimental nos animais selvagem tratados com AZ, em relação ao início do experimento. Nos grupos convencionalizados (SAL e AZ), ganho de peso significativo em relação à aferição inicial de massa corpórea foi visto a partir do dia 49, o que evidencia comportamento semelhante aos animais selvagem. Por outro lado, os animais SPF apresentaram aumento de peso significativo em relação à massa corpórea inicial apenas no último dia de experimento, assumindo comportamento diferente dos demais grupos (p -valor=0,016; ANOVA 2-way-para-medidas-repetidas/Bonferroni) (Tabela 9).

Em nenhum dia experimental houve diferenças estatisticamente relevantes entre os animais tratados com salina ou ácido zoledrônico dos grupos selvagem, SPF ou convencionalizado (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise do ganho de massa corpórea dos animais selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com salina ou AZ.

	Selvagem			SPF			Convencionalizado			p-Valor ^b
	Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	Salina	AZ	p-Valor ^a	
Peso										
D0	22,50±0,56	21,57±0,41	0,203	19,27±0,51	20,07±0,53	0,300	20,41±0,52	21,06±0,53	0,402	0,016
D7	22,83±0,57	21,64±0,18	0,095	19,38±0,51	19,94±0,69	0,542	20,59±0,50	20,77±0,40	0,776	
D14	21,92±0,35	21,50±0,24	0,340	19,48±0,50	19,76±0,62	0,742	21,06±0,40	21,69±0,35	0,257	
D21	22,92±0,42	22,14±0,24	0,122	19,63±0,60	20,06±0,67	0,651	21,07±0,56	21,81±0,38	0,292	
D28	23,58±0,71	22,93±0,28	0,422	19,98±0,53	20,11±0,63	0,879	21,37±0,46	22,24±0,43	0,193	
D35	24,08±0,75	23,43±0,34	0,417	20,22±0,53	20,49±0,73	0,778	21,66±0,54	22,37±0,46	0,334	
D42	23,92±0,77	23,71±0,31*	0,814	20,28±0,56	20,54±0,59	0,759	21,93±0,52	22,74±0,35	0,217	
D49	22,33±0,59	22,00±0,70*	0,727	20,34±0,81	20,56±0,51	0,815	22,16±0,61*	22,84±0,35*	0,349	
D56	23,83±0,64*	22,57±0,63*	0,190	20,34±0,57	20,57±0,54	0,779	21,84±0,58*	23,21±0,38*	0,072	
D63	23,75±0,54*	22,71±0,4*	0,182	20,96±0,73	20,87±0,66	0,931	22,53±0,65*	23,47±0,34*	0,224	
D70	23,67±0,56*	22,79±0,62*	0,318	21,04±0,64*	21,67±0,57*	0,481	22,59±0,57*	23,90±0,29*	0,061	
p-Valor^c	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		

Fonte: Dados da pesquisa

AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos).

*p<0,05 versus D0. *p<0,05, ^aComparação entre salina e AZ no mesmo grupo (Teste t de Student); ^bComparação entre comportamento dos grupos Selvagem, SPF e Convencionalizado entre si (Teste ANOVA 2-way-para-medidas-repetidas/Bonferroni); ^c Comparação, no mesmo grupo, entre o dia experimental e o dia 0 (Teste ANOVA 1-way-para-medidas-repetidas/Bonferroni); Média±EPM.

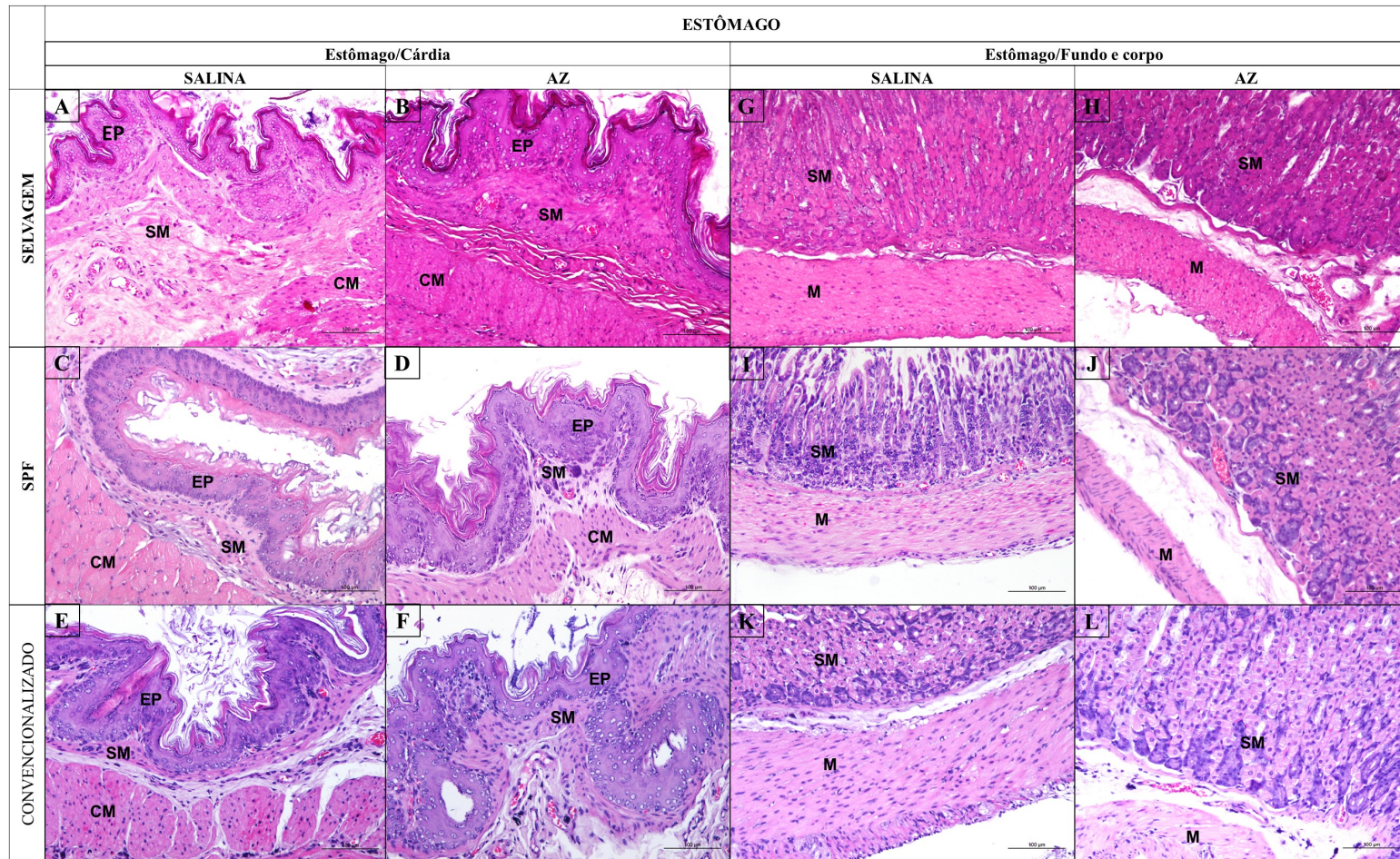
6.5.2 Análise histopatológica do estômago, fígado, rim e baço

6.5.2.1 Estômago

O estômago foi analisado em duas regiões: a região da cárdia e a região de fundo/corpo. Em geral, em todos os grupos experimentais, o estômago exibiu a região de cárdia revestida por epitélio pavimentoso estratificado ortoceratinizado, sob o qual havia córion fibroso denso com vasos sanguíneos diferentes calibres, os quais eventualmente exibiam ectasia (Figura 10).

Na região fúndica, os animais, independente do tratamento recebido, apresentaram preservação da mucosa gástrica, sendo visualizadas as células principais e parietais. Nas camadas submucosa da mucosa e mucosa, visualizaram-se vasos sanguíneos de calibres variados que, por vezes, evidenciavam ectasia (Figura 10).

Figura 10 – Fotomicrografia do estômago de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.



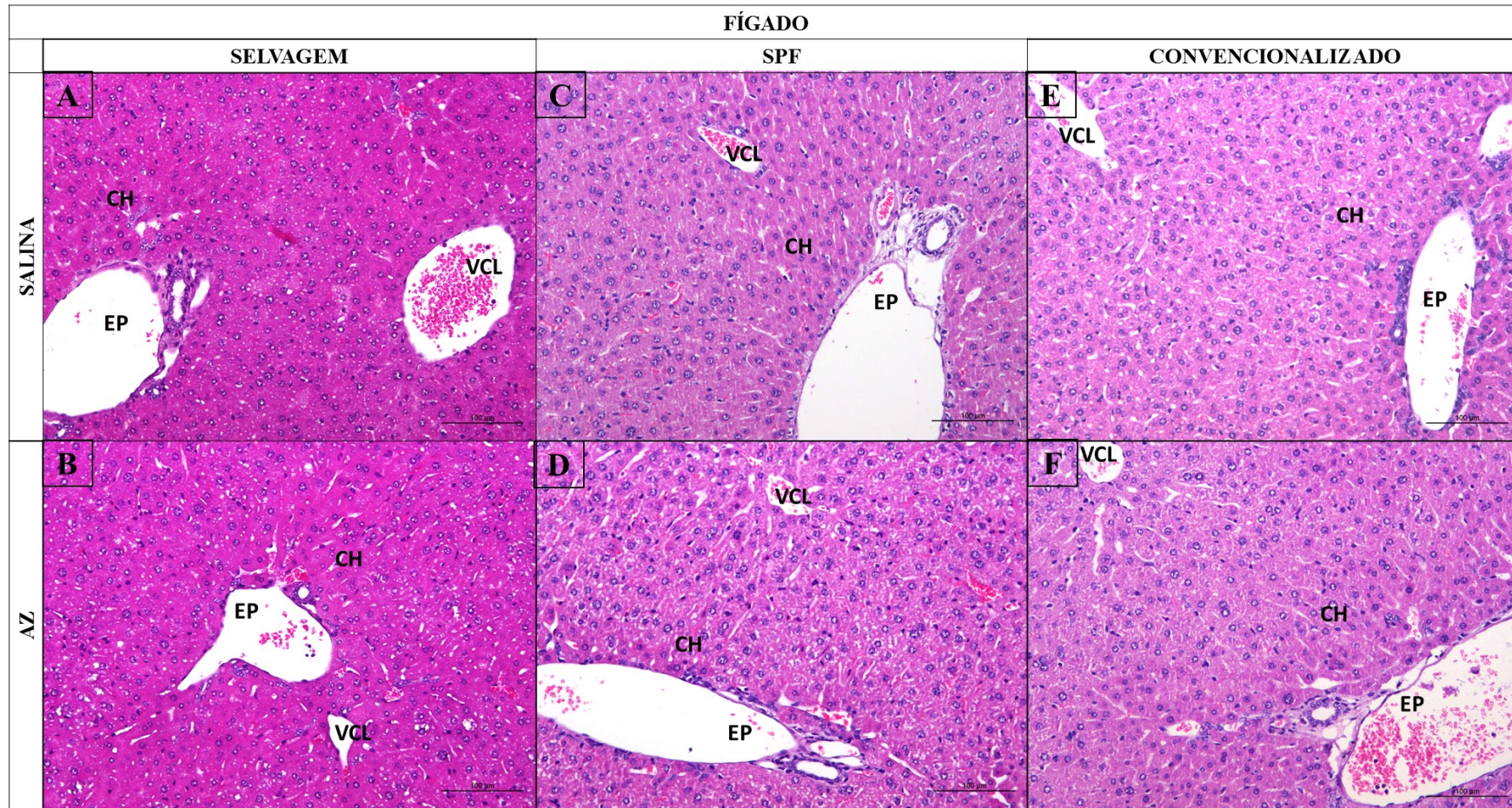
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos); EP: Epitélio; CM: Camada Muscular; M: Camada Mucosa; SM: Camada Submucosa da Mucosa. (A-F): Mucosa gástrica exibindo região de cárdia revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoceratinizado, sob o qual há córion fibroso com vasos sanguíneos, por vezes, ectásicos. (G-L): Região de fundo e corpo com camadas mucosa e submucosa preservadas, exibindo vasos sanguíneos, alguns dos quais congestos. (Hematoxilina-Eosina 200x).

6.5.2.2 *Fígado*

Os animais selvagens tratados com salina ou AZ exibiram arquitetura hepática preservada, contendo hepatócitos com leve a moderada tumefação, discreta hemorragia sinusoidal, hiperplasia de Células de Kupffer e alguns focos inflamatórios dispersos (Figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografias do fígado de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.



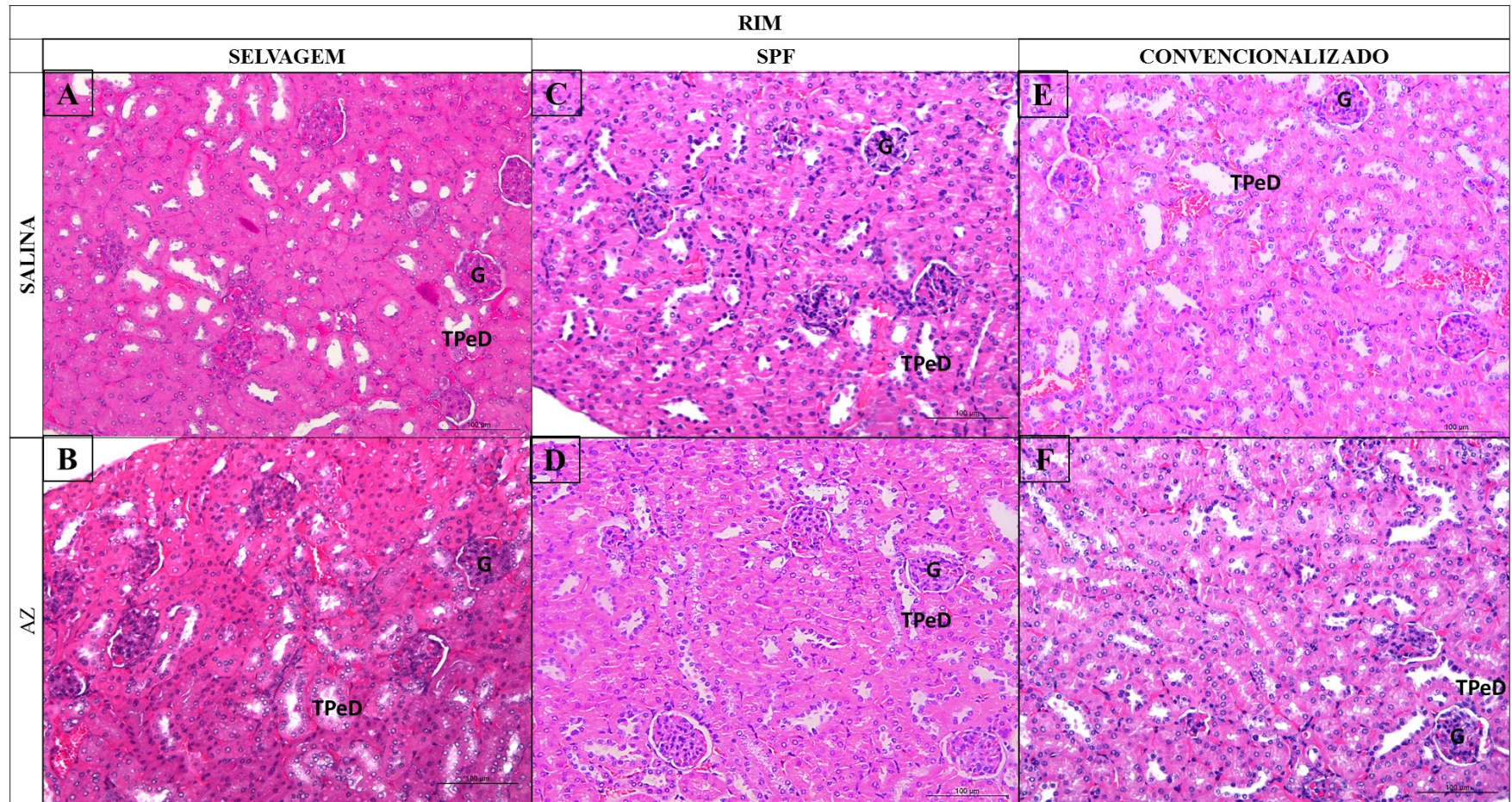
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos); EP: Espaço Porta; VCL: Veia Centrolobular; CH: Cordões de Hepatócitos. (A, F): Os grupos selvagem, SPF e convencionalizados tratados com AZ e salina apresentaram arquitetura lobular preservada com cordões de hepatócitos, exibindo de leve a moderada tumefação. (Hematoxilina-Eosina 200x).

6.5.2.3 Rim

De uma maneira geral, os diferentes grupos experimentais apresentaram aspectos semelhantes na análise histopatológica do rim. (Figura 12). Assim, o aspecto microscópico dos rins dos camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com salina ou AZ, evidenciou estruturas glomerulares preservadas, muitas vezes com presença de hemorragia tubular e intersticial, e de leve a moderada tumefação do epitélio tubular, além de pequenos focos de células inflamatórias ocasionais, frequentemente localizados próximos a vasos sanguíneos ectásicos. Alguns animais, em todos os grupos, exibiram vacuolização do epitélio tubular, entretanto, se observou que essa frequência foi menor nos camundongos SPF tratados com AZ, quando comparados aos do grupo selvagem e convencionalizados que receberam o bisfosfonato (Figura 12). Cilindros-hialinos também foram vistos ocasionalmente em todos os grupos experimentais (Figura 12).

Figura 12 - Fotomicrografias do rim de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.



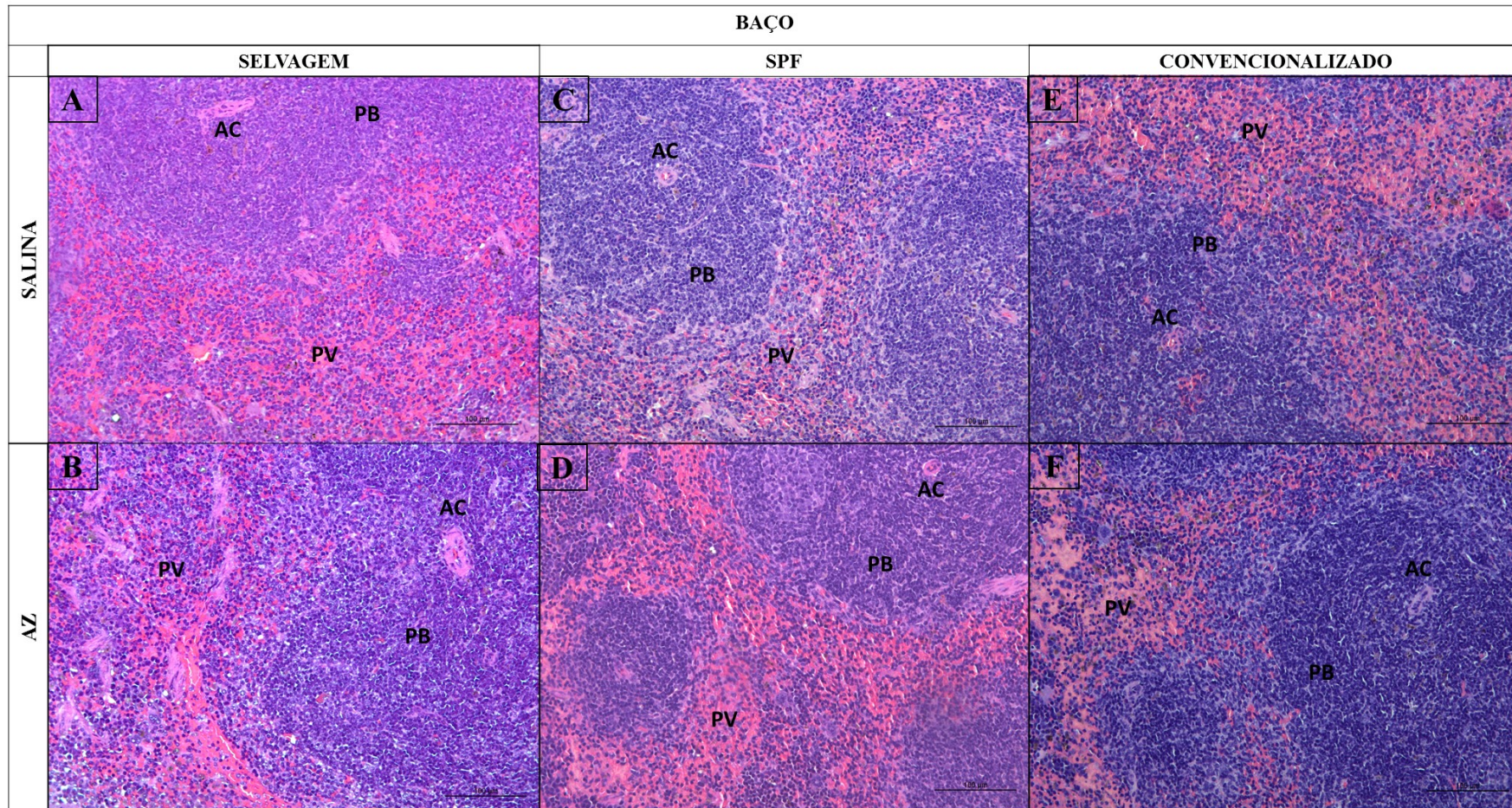
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos); G: Glomérulo; TPeD: Túbulo Proximal e Distal. (A, F): Os grupos selvagem, SPF e convencionalizados tratados com AZ e salina apresentaram preservação da estrutura glomerular, com presença de focos hemorrágicos e leve a moderada tumefação de epitélio tubular. Alguns animais, em sua maioria dos grupos SPF e convencionalizado tratados com AZ, exibiram vacuolização de epitélio tubular.

6.5.2.4 Baço

A análise microscópica do baço de animais selvagem, tratados com salina ou AZ, revelou polpa branca constituída por bainha de linfócitos T periarteriais situadas excentricamente em relação às artérias centrais e nódulos esplênicos (corpúsculos de Malpighi), caracterizando preservação da estrutura folicular, em meio a hemorragia recente e megacariócitos de permeio, hemossiderófagos e, ocasionalmente, pigmentos de hemossiderina. Camundongos do grupo SPF e convencionalizados, independente do tratamento com AZ ou salina, evidenciaram características semelhantes na análise dos parâmetros microscópicos de toxicidade no baço (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografias do baço de camundongos selvagens, SPF e convencionalizados, tratados com AZ ou salina.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: AZ: Ácido Zoledrônico; SPF: *Specific Pathogen-Free* (Animais livres de patógenos específicos); AC: Arteriola Central; PB: Polpa Branca; PV: Polpa Vermelha. (A, F): Os grupos selvagem, SPF e convencionalizados tratados com salina ou AZ exibiram preservação da estrutura folicular no baço, com equidade entre as polpas branca e vermelha. (Hematoxilina-Eosina 200x).

7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, buscou-se investigar se a presença de micro-organismos patogênicos seria capaz de prevenir ou atenuar a OMB. Observou-se que os animais que não possuíam microbiota patogênica, isto é, livres de patógenos específicos (*Specific Pathogen-Free*, SPF), e que haviam recebido administrações intraperitoneais de AZ apresentaram alguns sinais clínicos de atraso cicatricial no alvéolo pós-extração, com avaliação imaginológica evidenciando área hipodensa neste local, entretanto, histologicamente, exibindo menor infiltrado inflamatório e número de osteoclastos diminuído em relação aos grupos selvagem e convencionalizado também tratados com o bisfosfonato. Esses resultados provavelmente indicam que a presença de infecção assume um papel decisivo para progressão e gravidade da perpetuação das lesões de OMB.

A análise citológica qualitativa revelou uma diversidade microbiana bastante evidente em camundongos selvagens, que foi transferida com sucesso através da técnica de convencionalização para animais ex-SPF e manteve-se até o último dia experimental. Os animais SPF, por sua vez, exibiram colônias bacterianas de aspecto mais uniforme e organizado. No dia 70, obteve-se aspecto citológico semelhante em camundongos SPF tratados com salina, o que evidencia a permanência deste *status* microbiano por todo o período experimental e que as técnicas de controle de infecção para as diversas manipulações realizadas nestes animais foram bem-sucedidas.

Entretanto, foi visto, no dia 70, em camundongos selvagens salina e submetidos à OMB, a presença de eventuais formações sugestivas de *Candida sp.* Embora espécies de *Candida sp.* não sejam largamente descritas em conteúdos microbianos orais de camundongos C57/BL 6, sabe-se que disbioses, capazes de reduzir a formação de algumas bactérias benéficas, como as do gênero *Bacteroides*, podem aumentar a sua proliferação em camundongos (FAN et al., 2017). Além disso, alguns estudos clínicos, como o de Aftimos et al. (2014), encontraram fungos em 100% das lesões de OMB, enquanto que outros descrevem a presença ocasional de leveduras nas amostras ósseas (SEDGHIZADEH et al., 2008). Já Perna et al. (2013) reportaram a presença de infecção micótica em apenas uma amostra analisada, o que demonstra que a infecção fúngica pode participar do biofilme presente em lesões de OMB, entretanto, não parece ser determinante para seu desenvolvimento.

Adicionalmente, foi visto que camundongos SPF tratados com AZ passaram a exibir bactérias filamentosas Gram-positivas em sua composição microbiana oral, o que havia sido detectado em poucos animais no início do experimento. Em estudo prévio, a análise de

amostras de pacientes tratados com bisfosfonatos, que desenvolveram ou não desenvolveram OMB, e de pacientes normossistêmicos, que não haviam recebido qualquer tratamento prévio com bisfosfonato, demonstrou que, em pacientes tratados com bisfosfonatos, pode ocorrer disbiose da microbiota oral, predominando espécies Gram-positivas, e alterações na resposta imune à infecção. Essa modificação se dá às custas do aumento da transcrição gênica de inibidor de protease secretória de linfócitos, proteinase 3, além de redução de catepsina G e domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NLRs). Com esse desequilíbrio, gera-se, então, um microambiente favorável para a proliferação de bactérias oportunistas, como *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* e *Gemella* (PULSHALKAR et al., 2014). Assim, os camundongos SPF poderiam ter pequenos conteúdos de bactérias filamentosas que, após a administração do ácido zoledrônico e o provável estado de disbiose gerado, proliferou em maior número, estando evidente nos achados citológicos.

A avaliação de lesões de osteonecrose pode ser realizada com maior acurácia por meio de tomografias computadorizadas. Esse exame imaginológico é capaz de oferecer dados sobre o osso cortical e trabecular, mostrando detalhes sobre a extensão da osteonecrose (WULTLZ et al., 2008) e permitindo uma reconstrução tecidual tridimensional, sobre a qual pode estimar-se a quantidade de osso comprometido por necrose com precisão (TORRES et al., 2012).

Os sinais imaginológicos de OMB, em geral, compreendem zonas radiolúcidas irregulares, com ocasionais sequestros ósseos radiopacos e pouca evidência de cicatrização, podendo haver também fraturas patológicas (CHIANDUSSI et al., 2006; KRISHNAN et al., 2009; HOWIE et al., 2015). Análises microtomográficas tridimensionais atestaram que o tratamento com bisfosfonatos, em longo prazo, esteve associado ao aumento da densidade mineral óssea, da espessura trabecular e do volume ósseo proporcional em animais (CÓRDOVA et al., 2016; KUROSHIMA et al., 2018). Outros estudos confirmam que esses achados se mantêm inclusive na presença de lesões iniciais de OMB (VILARINHO et al., 2017). As lesões de OMB instaladas e mais tardias, muitas vezes sintomáticas, podem resultar em áreas de menor número e espessura de trabéculas, além de reduzido volume ósseo proporcional (KIM et al., 2017). Em análises bidimensionais, realizadas por microtomografia ou radiografias, OMB aparece comumente como área osteolítica e perda de integridade das paredes alveolares, mas esses aspectos radiográficos podem ser heterogêneos e variar desde proliferação periosteal, anormalidades na lâmina dura, aumento do espaço do ligamento periodontal, osteólise difusa, aumento da radiopacidade da área envolvida, com esclerose óssea, formação de sequestros ósseos e até mesmo fratura patológica da região afetada (CHIANDUSSI et al., 2009; FEDELE et al., 2010; TREISTER; FRIEDLAND; WOO, 2010; ROCHA et al.,

2012; CURRA et al., 2016; KOLPAKOVA et al., 2017). Os achados imaginológicos encontrados neste trabalho estão de acordo com os estudos prévios da literatura. Assim, observou-se, em camundongos selvagens tratados com AZ, região de exodontia com área osteolítica, hipodensa, que sugeria a presença de necrose, por vezes com sequestros ósseos. Ressalta-se que, sendo o primeiro estudo do presente grupo de pesquisa em que se aplica a metodologia em camundongos, além da área osteolítica, outros parâmetros, como a presença imaginológica de sequestros ósseos, foram utilizados para sugestão diagnóstica de lesões de osteonecrose.

Os camundongos SPF e convencionalizados, ambos tratados com AZ, mostraram achados imaginológicos semelhantes. Isso denota que, nestes grupos, pode ter havido atraso cicatricial nos alvéolos pós-exodontia. Embora, sem diferenças estatisticamente relevantes, o grupo SPF demonstrou área osteolítica inferior em relação aos grupos selvagem e convencionalizado. Já o grupo convencionalizado demonstrou extensa área osteolítica, no entanto, sem diferenças estatísticas, em relação aos camundongos selvagem-AZ. Estudo anterior reporta resultado semelhante em ratos submetidos a modelo experimental de ligadura. Neste, foi detectada maior área de necrose quando a ligadura foi associada à inoculação local de bactérias do gênero *Actinomyces* (*Actinomyces naeslundii*), as quais são comumente encontradas em exames histológicos de lesões de OMB, quando comparados aos animais submetidos à administração de bisfosfonatos e que receberam inoculação local na ligadura de solução salina (LI et al., 2015). Esses resultados, em conjunto com aqueles descritos no presente estudo, indicam que as bactérias patogênicas colonizando o osso pós-trauma cirúrgico culminam em maiores áreas osteolíticas, que clinicamente podem ser compatíveis com lesões de OMB. Isso provavelmente se deve ao estímulo bacteriano, capaz de excitar respostas inflamatórias mais pronunciadas e permanentes no tecido ósseo, levando ao seu processo natural de remodelação, o qual encontrava-se inibido pelo tratamento antirreabsortivo.

Por outro lado, animais tratados com solução salina submetidos à exodontia exibiram alvéolos pós-cirúrgicos cicatrizados, com área hiperdensa compatível com neoformação óssea de trabeculado normal. Esses achados microtomográficos estão de acordo com estudos anteriores, que evidenciam em grupos controles, tratados com solução salina, alvéolos com osso novo uniforme que preenchia toda a área de osso vazia e extrusando qualquer raiz, que, por ventura, tenha restado, sem presença de destruição cortical, sequestros ósseos ou exposição óssea (HOWIE et al., 2015; KOLPAKOVA et al., 2017; VILARINHO et al., 2017). Radiograficamente, resultados semelhantes foram vistos em estudos clássicos de modelos experimentais de OMB, onde os grupos controles, que não foram tratados com bisfosfonatos,

apresentaram, 28 dias após a exodontia, alvéolos com radiopacidade linear de densidade uniforme (SONIS et al., 2009; BARBA-RECREO et al., 2014; JABBOUR et al., 2014).

O estudo histomorfométrico das hemimandíbulas reuniu parâmetros para verificar o desenvolvimento de lesões de OMB nos alvéolos pós-extração. Assim, como esperado, camundongos tratados com salina, independente do grupo (selvagem, SPF ou convencionalizado), não apresentaram sinais clássicos sugestivos de ocorrência de lesões necróticas. Em seus sítios pós-exodontia, evidenciaram-se cicatrização óssea e tecidual, com recobrimento de mucosa íntegra, presença de osso celularizado, onde havia atividade osteoblástica e osteoclástica, além de células inflamatórias no sítio de exodontia e ocasionais colônias bacterianas em alguns animais. Esses achados estão de acordo com o aspecto histológico da mandíbula de animais controle de modelos experimentais de OMB, onde a eutanásia é realizada entre três e quinze semanas após a exodontia (SONIS et al., 2009; MAAHS et al., 2011; MARINO et al., 2012; CONTE-NETO et al., 2013; SILVA et al., 2015; YANG et al., 2015)

Por outro lado, em diversos modelos experimentais, determina-se a ocorrência de lesões necróticas em osso a partir da observação de aspectos, como: osso pouco celularizado ou, em partes, desvitalizado, com lacunas de osteócitos vazias, as quais podem representar áreas de sequestros ósseos, além de reabsorção irregular da superfície óssea e infiltrado inflamatório marcante, osteoclastos apoptóticos e material basofílico amorfo sugestivo de colônias bacterianas (SONIS et al., 2009; MARINO et al., 2012; CONTE-NETO et al., 2013; BARBA-RECREO et al., 2014; HOWIE et al., 2015; SILVA et al., 2015; TANAKA et al., 2015; YANG et al., 2015; KOLPAKOVA et al., 2017). Diversos trabalhos também demonstram o aumento da presença de sequestros ósseos, com lacunas de osteócitos vazias, em lesões de OMB (AGHALOO et al., 2011; MARINO et al., 2012; CÓRDOVA et al., 2016). No presente estudo, camundongos selvagens que receberam tratamento com AZ exibiram presença desses sinais, o que confirma a ocorrência da lesão necrótica nos mesmos. Aspectos semelhantes foram observados nos camundongos convencionalizados tratados com AZ, concluindo que, nestes animais, possa ter havido desenvolvimento de lesões de OMB de maneira similar aos animais selvagens. Os camundongos SPF, por sua vez, exibiram alguns parâmetros parecidos com os demais grupos, como osteoclastos com sinais de apoptose e presença de ocasionais sequestros ósseos, porém, com infiltrado inflamatório bastante inferior aos demais grupos. Achado semelhante foi reportado previamente em estudo experimental com camundongos C57 BL/6, que receberam infusões diárias de AZ e foram submetidos à exodontia do primeiro molar superior. Os autores relatam que os camundongos exibiram sinais claros de atraso cicatricial, evidenciando ausência de neoformação óssea e de angiogênese no sítio de extração. Os autores

atribuíram o fracasso de induzir à lesão de OMB de maneira idêntica ao que ocorre clinicamente pela ausência de bactérias na cavidade bucal dos camundongos utilizados, que foram mantidos em condições *germ-free* por todo o experimento (KOBAYASHI et al., 2010).

Isso indica que as bactérias patogênicas, colonizando o osso pós-trauma cirúrgico, culminam em maiores áreas necróticas, as quais, clinicamente, podem ser compatíveis com lesões de OMB. As bactérias parecem fornecer estímulos imunológicos para a manutenção de uma resposta inflamatória local ao osso que, impedido de remodelar, necrosa, o que já foi sugerido anteriormente na literatura (KOS; LUCZAK, 2009). Em modelo experimental de OMB em ratos, o lipopolissacarídeo (LPS), oriundo da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, foi injetado em perfurações cirúrgicas realizadas na base da mandíbula de ratos, sob tratamento prévio de AZ, e resultou em maior área histológica de necrose óssea em relação a animais que receberam isoladamente o bisfosfonato. A influência do estímulo bacteriano parece ser importante para o agravamento dessas lesões, uma vez que, nesse mesmo estudo, observou-se que, após a inoculação local da endotoxina, o grupo tratado com polimixina B, um agente capaz de neutralizar a ação do LPS, a área histológica correspondente ao osso necrótico reduziu significativamente quando comparados aos ratos que não receberam esse tratamento (SAKAGUCHI et al., 2015). Tanaka et al. (2015) também demonstraram que mandíbulas de ratas tratadas com alendronato e submetidas à exodontia e que receberam inoculação local LPS no sítio cirúrgico apresentaram área histológica de osteonecrose superior aos animais que não haviam sido inoculados com a endotoxina. Um estudo discorda de que as bactérias necessariamente precisariam ser extremamente virulentas ou patogênicas para causar tal dano. Tsurushima et al. (2013) observaram que, independentemente de o animal ser inoculado com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bactéria Gram-negativa, ou compostos imunoadjuvantes, como o adjuvante completo de Freund (CFA), comumente utilizado em vacinas para aumentar o tempo de exposição do antígeno ao sistema imune, há aumento da área de OMB em relação aos animais controle, indicando que o tempo de estimulação imunoinflamatória é que poderia ser decisivo para a piora do quadro.

Em contrapartida, alguns outros achados refutam que a presença de bactérias, mesmo aquelas comumente relacionadas à lesão de OMB, possa causar algum dano adicional às manifestações histopatológicas observadas em lesões necróticas por bisfosfonatos. Em estudo experimental de indução de OMB por ligadura, observou-se que a inoculação de bactérias do gênero *Actinomyces* não foi capaz de alterar em número os osteócitos não-viáveis, quando comparados aos animais submetidos à administração de bisfosfonatos, mas que receberam inoculação local na ligadura de solução salina (LI et al., 2015).

Mesmo exibindo contagem de células inflamatórias semelhantes, o grupo selvagem tratado com AZ demonstrou perfil diferente do grupo convencionalizado. No infiltrado inflamatório observado nos animais selvagens, houve maior número de polimorfonucleares neutrófilos. Já no grupo convencionalizado, esse aumento pareceu ocorrer pela combinação de células polimorfonucleares e mononucleares. O infiltrado inflamatório encontrado em lesões de OMB é comumente associado à presença de polimorfonucleares neutrófilos (MARINO et al., 2012; BARBA-RECREO et al., 2014; SILVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017), demonstrando semelhança com os achados descritos no presente trabalho.

Godwin, Fraser e Ibbotson (1964) comprovaram que ratos SPF que desenvolviam doenças pulmonares apresentavam aumento do número de células inflamatórias, quando comparados a animais saudáveis, e que esse aumento ocorria por conta da elevação principalmente de linfócitos. Em animais *germ-free*, estudos prévios descrevem que a redução da atividade de neutrófilos possa ocorrer por ausência da estimulação de bactérias da microflora convencional, com redução da estimulação oriunda de níveis mais elevados de IL-1 β (BUDAVÁRI et al., 1985; BHATTARAI et al., 2016), o que pode ser reduzida também em camundongos SPF, quando comparados aos selvagens. Outro estudo reporta a ocorrência de menor influxo de neutrófilos em camundongos swiss convencionalizados quando comparados a camundongos selvagens submetidos à infecção pulmonar através de inoculação de bactérias *Klebsiella pneumoniae* (FAGUNDES et al., 2012). Esses achados confirmam o maior número de mononucleares visualizados no grupo convencionalizado submetido à OMB no atual estudo e parecem estar de acordo com o perfil imunológico comumente desenvolvido nesses animais na presença de estímulos infecciosos, como as bactérias do meio oral inoculadas nos camundongos ex-SPF. Entretanto, salienta-se que mais investigações sobre o perfil imunoinflamatório em animais SPF são requeridas.

Aumento da contagem de osteoclastos total em camundongos tratados com AZ dos grupos selvagem e convencionalizado foi observado quando comparado aos que foram tratados com salina. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores do presente grupo de pesquisa, que observaram fenômeno semelhante em ratos submetidos à OMB. Os autores ressaltam que a elevação no número de osteoclastos esteve associada à alta imunoexpressão de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 e Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), além de estarem em consonância ao aumento do número de células inflamatórias (polimorfonucleares neutrófilos e monócitos) e de osteoclastos apoptóticos (BARROS-SILVA et al., 2016). A partir desses achados, acredita-se que o maior número total de osteoclastos, observado nos camundongos selvagens e convencionalizados tratados com AZ, provavelmente, está relacionado ao maior infiltrado inflamatório verificado nos sítios pós-exodontias desses

animais. Isso pode ter sido motivado pela agressão de bactérias patogênicas do conteúdo oral no osso, que, embora não significativa, apresentou frequência maior no aspecto histológico das hemimandíbulas pós-exodontias desses animais. A presença das bactérias colonizando fragmentos de ossos não-reabsorvido reforça a estimulação imune provinda dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), que induzem o sistema imune inato a produzir citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6. Essas citocinas podem regular diretamente o eixo RANK-RANKL-Osteoprotegerina (OPG), aumentando a expressão de RANKL, o que culmina no estímulo à diferenciação e ativação osteoclástica na tentativa de induzir a reabsorção óssea (REDLICH; SMOLEN, 2012; BARROS-SILVA et al., 2019).

Sabe-se, ainda, que grande parte desses osteoclastos terá sua função inibida ou maior potencial de sofrer apoptose. Isso é consequência do mecanismo de ação dos aminobisfosfonatos, que, após serem adsorvidos pelas células clásticas de osso, bloqueiam a enzima farnesil-pirofosfatase sintase, criando uma escassez intracelular de substâncias necessárias para a modificação pós-translacional dos lipídios, a partir da atividade de pequenas proteínas sinalizadoras com atividade GTPase, e a disfunção resultante dificulta a regulação da morfologia e atividade dos osteoclastos, levando à má função celular e apoptose (SELANDER et al., 1996; SHIPMAN et al., 1998; ROELOFS et al., 2006; WEISTEIN et al., 2009). Em consonância com esses achados, no presente estudo, observou-se, em todos os grupos experimentais tratados com AZ, maior percentual de osteoclastos com sinais de apoptose quando comparados aos animais tratados com salina.

A análise hematológica dos animais do grupo selvagem submetidos a administrações de AZ demonstrou diminuição no número de hemácias e hemoglobina, no dia 70, em relação ao que foi observado no início do experimento. Além disso, os camundongos selvagens exibiram, já no dia 0, menores níveis de hemoglobina, quando comparados aos camundongos SPF e convencionalizados. Estudos desenvolvidos com metodologia semelhante ao presente trabalho mostraram que podem ocorrer eventos anêmicos em animais tratados com ácido zoledrônico (SILVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017). Zhu et al. (2013), em metanálise realizada a partir de ensaios clínicos randomizados, já haviam descrito que o tratamento com ácido zoledrônico estava relacionado ao maior e significativo risco relativo para desenvolvimento de anemias, corroborando esses achados. Entretanto, já foi comprovado anteriormente que o uso de alendronato de sódio, em altas doses, não apresenta efeitos citotóxicos sobre eritrócitos (KOPKA et al., 2011). Ressalta-se que o alendronato é uma aminobisfosfonato utilizado para tratamento de osteoporose e administrado por via oral, onde a absorção gastrointestinal fica em torno de 2 a 5% (FERNANDES; LEITE; LANÇAS;

2005), no entanto, esta relação entre o tratamento com aminobisfosfonatos e as mudanças no eritrograma necessita de mais investigações experimentais para ser melhor elucidada.

Os níveis de hemoglobina mostraram-se elevados no grupo SPF, no dia 0, quando comparados aos animais selvagens e convencionalizados. A maioria dos glicuronídeos de bilirrubina, formada através da degradação das moléculas de hemoglobina, é desconjugada pela β -glicuronidase bacteriana e degradada em urobilinogênicos incolores. Embora os urobilinogênios e o resíduo de pigmento intacto sejam excretados em grande parte nas fezes, aproximadamente 20% dos urobilinogênios formados são reabsorvidos no íleo e cólon, retornados ao fígado e reexcretados prontamente na bile (KUMMAR et al., 2005). Sendo um processo dependente das bactérias comensais, que garantem seu bom reaproveitamento, os níveis de hemoglobina mais elevados nos animais SPF podem refletir o bom funcionamento da interação entre uma microbiota favorável e livre de patógenos e o metabolismo sistêmico. Adicionalmente, sabe-se que microbiota intestinal equilibrada e benéfica favorece as células intestinais a adquirirem considerável capacidade de absorção e armazenamento de ferro, que será transportado pela hemoglobina. Já foi descrito na literatura que alterações metabólicas devidas à administração de prebióticos afetaram a absorção de ferro (TAKO et al., 2008) via aumento da expressão de genes reguladores de ferro no cólon e duodeno e aumento de *Lactobacillaceae* no cólon (YEUNG et al., 2005; WEINBORN et al., 2017). Foi visto ainda menor absorção de ferro em ratos *germ-free* quando comparados a ratos SPF, que possuem microbiota livre de bactérias patogênicas, estimando-se perda de 25% do ferro ingerido (REDDY et al., 1972).

O presente trabalho evidenciou elevação na contagem de leucócitos de camundongos SPF, no dia 0, quando comparados aos grupos selvagem. Outro estudo demonstra similaridade estatística, porém, com discreto aumento percentual (cerca de 10%) na quantidade de linfócitos encontradas em camundongos SPF em relação a animais convencionais (isto é, selvagens) (OSTI-SPINELLI et al., 2012). Em outros trabalhos, que exibem diferenças em parâmetros hematológicos de ratos Sprague-Dawley *germ-free* e convencionais, reforça-se a evidência de uma menor contagem sérica de leucócitos naqueles livres de microbiota (McLEOD, BALISH, 1978).

No dia 70, foi visto que os animais selvagens e SPF apresentaram número elevado, embora não significativo, de leucócitos, semelhante ao número dessas células presentes nos níveis séricos de animais do grupo convencionalizado. Essa elevação pode ter surgido a partir do estímulo traumático da exodontia, que fornece uma porta de entrada para microorganismos orais, patogênicos ou não. Estudo anterior da literatura compara a responsividade de animais *germ-free* e convencionais, indicando que, frente a um mesmo estímulo infeccioso,

ambos reagem de maneira semelhante (WIDMER, SONDEL, BACH, 1972), o que explica a ausência de discrepâncias no número de células inflamatórias no último dia experimental entre os grupos.

Camundongos convencionalizados exibiram redução significativa na contagem de leucócitos no final do experimento em relação ao dia 0. Neste dia experimental, os camundongos convencionalizados haviam recebido inoculações recentes de bactérias via *swab* oral, o que pode ter provocado estímulo inflamatório e leve aumento na quantidade de leucócitos circulantes e de moléculas pró-inflamatórias, como já descrito em modelos experimentais de convencionalização (McLEOD, BALISH, 1978; EL AIDY et al., 2012). Ao ser inoculado com bactérias diferentes, o meio oral dos camundongos passou a exibir uma disbiose, devido à competição entre bactérias recentemente inoculadas e comensais, não-patogênicas. A disbiose pode, então, gerar estímulos imunológicos (REDFERN; SUCHODOLSKI; JERGENS, 2017), o que foi visto como pequena elevação, sem relevância estatística, no número de leucócitos circulantes em relação ao grupo SPF. Sabe-se, ainda, que a presença continuada da microbiota diversificada e estável é fundamental para a manutenção das propriedades imunomoduladoras de células tronco da medula óssea (XIAO et al., 2017). Assim, no presente estudo, no dia 70, os animais, já com nova microbiota estabelecida, retornaram ao comportamento semelhante ao grupo selvagem. Ao final desse período, pode ter havido a indução de reguladores negativos da inflamação, como células T reguladoras e IL-10, como mostrado previamente em modelo experimental de convencionalização intestinal após cerca de 30 dias da inoculação bacteriana (EL AIDY et al., 2012).

Na atual pesquisa, foi visto também uma tendência à redução do número de plaquetas associado às administrações do ácido zoledrônico no 70º dia experimental, que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes quando o grupo selvagem tratado com AZ foi comparado ao salina. A maior parte dos artigos não menciona alterações na contagem de plaquetas associada ao uso de ácido zoledrônico ou outro bisfosfonato aminado, apenas um relato na literatura acerca da ocorrência de trombocitopenia em pacientes sob uso de AZ (KULKARNI et al., 2016). Os autores acreditam que essa condição possa estar envolvida à apoptose de células-tronco mesenquimais ou devido à supressão de células T reguladoras pelo ácido zoledrônico no sangue periférico, aumentando os níveis de células $\gamma\delta$ T e interleucina-17 (ZHANG et al., 2013). Assim, fazem-se necessários estudos mais específicos para compreender se há influência do tratamento com bisfosfonatos na produção ou função plaquetária. Por outro lado, a presença de bactérias parece ter reduzido essa tendência à trombocitopenia. Notou-se que, apenas no grupo SPF, houve diminuição estatisticamente significativa no número de plaquetas de animais tratados com AZ entre os dias 0 e 70,

comportamento que não foi observado nos animais selvagens e convencionalizados. Essa redução pode estar intrinsicamente associada ao perfil hematológico de animais SPF, entretanto, não há estudos na literatura que reportem esses dados e de como se comportam frente à inflamação.

A massa corpórea dos animais submetidos, independente do grupo experimental e do tratamento recebido, aumentou ao longo do tempo. Entretanto, esse aumento ocorreu por volta do 49º dia experimental nos animais selvagens e convencionalizados, enquanto que, nos grupos SPF, demonstrou significativamente elevação em relação à massa corpórea inicial somente no 70º dia experimental. Alguns estudos prévios demonstram que possa haver concordância entre microbiota intestinal e oral em pacientes controles e pacientes com artrite reumatoide, sugerindo sobreposição na abundância e função de espécies bacterianas em diferentes locais do corpo (ZHANG et al., 2015).

Adicionalmente, é bem descrito na literatura que a atividade imunoinflamatória pode contribuir para o ganho de peso. Assim, estudos confirmam que camundongos *knockout* para TLR2 e TLR4 exibiram menor ganho de peso (SHI et al., 2006), resistência insulínica, utilização de energia de substrato e inflamação tecidual quando comparados a camundongos *wild-type* (EHSES et al., 2010). Adicionalmente, estudos anteriores relatam maior ganho de massa corpórea em adolescentes obesos com uma microbiota subgingival repleta de bactérias bastante patogênicas, como as que causam doença periodontal (ZEIGLER et al., 2012), o que confirma a interação entre os micro-organismos orais e alterações sistêmicas. Animais selvagens e convencionalizados apresentaram conteúdo microbiano mais diverso, além de terem evidenciado presença de lesões necróticas bem desenvolvidas, o que reforça que a sinalização TLR2 e TLR4 estaria mais ativa nesses grupos e, que, portanto, pode ter influenciado no ganho de peso.

Tem sido bastante investigada a relação entre o tratamento com bisfosfonatos de uso oral e o desenvolvimento de câncer gástrico, devido ao potencial de inflamação e irritação desses fármacos à mucosa (WALLACE et al., 1999) e os sintomas no trato gastrointestinal superior relatados pelos pacientes pós-administração, causando dores abdominais, dispepsia, náusea, vômito e anorexia (KELLY, TAGGART, 1997; KHAPRA; ROSE, 2006). Alguns estudos atestam essa associação (BUSBY et al., 2017), porém, as recentes metanálises realizadas acerca do tema não são conclusivas para que se mantenha verdadeira (WRIGHT; SCHOFIELD; MOLOKHIA, 2015; CAI et al., 2017). No presente trabalho, onde os animais foram tratados com ácido zoledrônico via intraperitoneal, o estômago exibiu características histopatológicas semelhantes aos animais que receberam solução salina, com integridade de mucosa, presença de células parietais e principais, exibindo eventualmente focos inflamatórios

e ectasia vascular. Modelo experimental realizado com ratos submetidos à indução de OMB por administração de ácido zoledrônico, via endovenosa, e tratados com diferentes regimes anti-inflamatórios, via oral, descreveu achados semelhantes (SILVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

No fígado, os animais desse estudo submetidos às administrações de AZ apresentaram características semelhantes àqueles tratados com salina. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Howie et al. (2015), no qual secções de fígado de ratas tratadas com ácido zoledrônico ou salina exibiram arquitetura normal, com leve infiltrado inflamatório crônico perivascular, células apoptóticas dispersas e sinusóides dilatados, independentemente do grupo. As características farmacocinéticas do AZ contribuem para que não haja efeitos adversos sobre esse órgão, pois parte do fármaco é incorporado na sua forma inalterada pelo esqueleto e a outra metade é não-metabolizada e excretada na urina (DE LUCA et al., 2011).

Um dos efeitos adversos do uso de bisfosfonatos é a redução da função renal (ROSEN et al., 2003). Esse efeito geralmente ocorre na presença de altas doses de aminobisfosfonatos, o que torna o uso geral seguro em doses terapêuticas (PFISTER et al., 2005; BOONEN et al., 2008). Pfister et al. (2005) avaliaram o dano renal agudo oriundo do tratamento com bisfosfonatos e observaram que ácido zoledrônico, ibandronato e clodronato apresentaram danos renais semelhantes, como necrose nefrotóxica, presença de células apoptóticas e perda da borda em escova dos túbulos renais. Em todos os casos, a administração de altas doses de bisfosfonatos não foi capaz de causar anomalias glomerulares ou intersticiais significativas. No presente estudo, o tratamento com ácido zoledrônico esteve associado à presença de vacuolização do epitélio tubular em animais selvagens e convencionalizados. Resultado semelhante já fora descrito anteriormente, observando-se maior prevalência de vacuolização de epitélio tubular em animais tratados com altas doses de clodronato e ácido zoledrônico (PFISTER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2017).

A análise de toxicidade esplênica revelou que todos os grupos, independentemente do tratamento recebido, exibiram características semelhantes, compatíveis com parâmetros de normalidade. Achado semelhante foi descrito previamente por estudos experimentais desenvolvidos com metodologia semelhante a este (SILVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017), o que indica que provavelmente os bisfosfonatos não estão frequentemente relacionados à toxicidade no baço. A presença ou inoculação de diferentes bactérias, realizada anteriormente, também não parece ter influenciado, no dia 70, em nenhum parâmetro histopatológico observado no baço dos animais convencionalizados.

Diversos modelos de convencionalização são idealizados com a inoculação de bactérias em animais *germ-free*, o que permite uma comparação fiel da condição livre de micro-

organismos com a recolonização microbiana dos animais. Assim, é possível avaliar a influência direta e real desses agentes, bem como verificar a interferência da resposta imune no desenvolvimento da doença investigada. Entende-se como limitação do presente trabalho que a presença de bactérias nos animais SPF, mesmo que não patogênicas, pode interferir na análise do papel de micro-organismos na iniciação das lesões de osteonecrose dos maxilares. Além disso, torna pouco possível precisar se as alterações microtomográficas e histológicas que foram visualizadas nos animais SPF-AZ estavam compatíveis unicamente com o mecanismo de ação do fármaco no tecido ósseo ou se poderiam sofrer alguma interferência, mesmo que ínfima, da microbiota não-patogênica residente.

8 CONCLUSÃO

A presença de bactérias está relacionada à ocorrência de lesões de OMB em camundongos selvagens e convencionalizados, o que foi evidenciado a partir de alterações histopatológicas e tomográficas.

O modelo de convencionalização utilizado, de forma inédita, no presente estudo, foi capaz de manter o padrão microbiológico das bactérias orais durante os 70 dias do protocolo experimental.

As administrações de ácido zoledrônico estão associadas à redução do número de hemácias e dos níveis de hemoglobina, sugerindo a ocorrência de eventos anêmicos nos animais submetidos à OMB.

A presença de uma microbiota diversificada provavelmente induziu o ganho mais rápido de peso nos animais selvagens e convencionalizados.

REFERÊNCIAS

- AAPRO, M.; ABRAHAMSSON, P. A.; BODY, J. J.; COLEMAN, R. E.; COLOMER, R.; COSTA, L.; CRINO, L.; DIRIX, L.; GNANT, M.; GRALOW, J.; HADJI, P.; HORTOBAGYI, G. N.; JONAT, W.; LIPTON, A.; MONNIER, A.; PATERSON, A. H. G.; RIZZOLI, R.; SAAD, F.; THURLIMANN, B. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumors: recommendations of an international expert panel. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 3, p. 420–432, 2008.
- ABTAHI, J.; AGHOLME, F.; SANDBERG, O.; ASPENBERG, P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 6, p. 494-499, 2012.
- AFTIMOS, V.; ZEINOUN, T.; BOU TAYEH, R.; AFTIMOS, G. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a study of 18 cases associated with fungal infection. **International Journal of Dentistry**. doi: 10.1155/2014/869067, 2014.
- AGHALOO, T. L.; KANG, B.; SUNG, E. C.; SHOFF, M.; RONCONI, M.; GOTCHER, J. E.; BEZOUGLAIA, O.; DRY, S. M.; TETRADIS, S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 8, p. 1871-1882, 2011.
- AGUIRRE, J. I.; AKHTER, M. P.; KIMMEL, D. B.; PINGEL, J. E.; WILLIAMS, A.; JORGENSEN, M.; KESAVALU, L.; WRONSKI, T. J. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) With periodontitis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n.10, p. 2130–2143, 2012.
- ALLEGRA, A.; OTERI, G.; NASTRO, E.; ALONCI, A.; BELLOMO, G.; DEL FABRO, V.; QUARTARONE, E.; ALATI, C.; DE PONTE, F. S.; CICCIO, D.; MUSOLINO, C. Patients with bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw have reduced circulating endothelial cells. **Hematological Oncology**, v. 25, n. 4, p. 164-169, 2007.
- ALLEN, M. R.; CHU, T-M. G.; RUGGIERO, S. L. Absence of exposed bone following dental extraction in beagle dogs treated with 9 months of high-dose zoledronic acid combined with dexamethasone. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 6, p. 1017-1026, 2013.
- ALMEIDA, M.; HAN, L.; AMBROGINI, E.; BARTELL, S. M.; MANOLAGAS, S. C. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF-kappaB in osteoblastic cells via a PKCbeta/p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 10, p. 2030-2037, 2010.
- ALVES, A. P.; PESSOA, C. DO O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES FILHO, M. O. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 6, p. 457-464, 2007.
- ANBINDER, A. L.; MORAES, R. M.; LIMA, G. M. G.; OLIVEIRA, F. E.; CAMPOS, D. R. C.; ROSSONI, R. D.; OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA, J. C.; ELEFTERIOU, Y.

F. Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy-induced bone loss in mice. **Bone**, v. 83, p. 241-247, 2016.

BAGAN, J.; SHETH, C. C.; SORIA, J. M.; MARGAIX, M., BAGAN, L. 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.

BAGAN, J.; SAEZ, G. T.; TORMOS, M. C.; HENS, E.; TEROL, M. J.; BAGAN, L.; DIAZ FERNANDEZ, J. M.; LLUCH, A.; CAMPS, C. Interleukin-6 concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Oral Diseases**, v. 20, n. 5, p. 446–452, 2014.

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

BARBA-RECREO, P.; VERA, L.D.C.P.; GARCIA-ARRANZ, M.; YÉBENES, L.; BURGEÑO, M. 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.

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

BARROS-SILVA, P. G.; FERREIRA-JÚNIOR, A. E. C.; OLIVEIRA, C. C.; LIMA-VERDE, M. E. Q.; FREITAS, M. O.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R. L.; ALVES, A. P. N. N. Chronic treatment with zoledronic acid alters the expression levels of inflammatory, bone and apoptotic markers and toll-like receptors 2 and 4 in rat dental pulp. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**, doi: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.01.069>, 2019.

BARROS-SILVA, P. G.; OLIVEIRA, C. C.; BRIZENO, L. A. C.; WONG, D. V. T.; LIMA-JÚNIOR, L.C.P.; GONÇALVES, R. P. SOUSA, F. B.; MOTA, M. R. L.; RIBEIRO, R.A.; ALVES, A. P. N. N. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Diseases**, v. 22, n. 7, 2016.

BHATTARAI, Y.; KASHYAP, P. C. Germ-Free Mice Model for Studying Host-Microbial Interactions. **Methods in Molecular Biology**, v. 1438, p. 123-135, 2016.

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

BONACINA, R.; MARIANO, U.; VILLA, F.; VILLA, A. Preventive strategies and clinical implications for bisphosphonate-related osteonecrosis of the Jaw: A review of 282 patients.

Journal of the Canadian Dental Association, v. 77, 2011.

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

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

BUSBY, J.; MURCHIE, P.; MURRAY, L.; IVERSEN, L.; LEE, A. J.; SPENCE, A.; WATSON, M. C.; CARDWELL, C. R. The effect of medications which cause inflammation of the gastro-oesophageal tract on cancer risk: a nested case–control study of routine Scottish data. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 8, p. 1828-1835, 2017.

CAI, D.; QIN, J.; CHEN, G.; FENG, W.; LIU, J. Bisphosphonates use and risk of gastric cancer: an updated meta-analysis of cohort and case-control studies. **Minerva Medica**, v. 105, n. 5, p. 464-472, 2017.

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

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9], 2015. Acesso em 15 de julho de 2016.

COLEMAN, R. E. Bisphosphonates: Clinical Experience. **The Oncologist**, v. 9, n. suppl. 4, p. 14-27, 2004.

COLEMAN, R. E. Risks and benefits of bisphosphonates. **British Journal of Cancer**, v. 98, n. 11, p. 1736–1740, 2008.

COLEMAN, R. The use of bisphosphonates in cancer treatment. **Annals of The New York Academy Of Sciences**, v. 1218, p. 3-14, 2011.

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

CONTE-NETO, N.; SPOLIDORIO, L. C.; ANDRADE, C. R.; BASTOS, A. S.; GUIMARÃES, M.; MARCANTONIO Jr., E. Experimental development of bisphosphonate-

related osteonecrosis of the jaws. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 1, p. 65-73, 2013.

CÓRDOVA, L. A.; GUIBAUD, F.; AMIAUD, J.; BATTAGLIA, S.; CHARRIER, C; LEZOT, F.; REDINI, F.; HEYMANN, D. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, v. 44, n. 9, p. 1387-1394, 2016.

CURRA, C.; CARDOSO, C. L.; FERREIRA-JÚNIOR, O.; CURI, M. M.; MATSUMOTO, M. A.; CAVENAGO, B. C.; SANTOS, P. M.; SANTIAGO-JÚNIOR, J.F. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 308–313, 2016.

CZUPRYNSKI, C. J.; BALISH, E. Pathogenesis of *Leisteria monocytogenes* for gnotobiotic rats. **Infection and immunity**, v. 32, n. 1, p.323-331, 1981.

DE GUARDA, M. G; PARAGUASSU, G. M.; CERQUEIRA, N. S.; CURY, P. R.; FARIAS, J. G.; RAMALHO, L. M. P. Laser GaAlAs (k860 nm) Photobiomodulation for the Treatment of Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaw. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 5, p. 293-297, 2012.

DE LUCA, A.; LAMURA, L.; GALLO, M.; DANIELE, G.; D’ALESSIO, A. GIORDANO, P.; MAIELLO, M. R.; PERGAMENO, M.; PERRONE, F.; NORMANNO, N. Pharmacokinetic evaluation of zoledronic acid. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 7, n. 7, p. 911-918, 2011.

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

DEL POZO, J. L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical & Pharmacology Therapeutics**, v. 82, n. 2, p. 204-209, 2007.

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

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

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

EHSES, J. A.; MEIER, D. T.; WUEEST, S.; RYTKA, J.; BOLLER, S.; WIELINGA, Y.; SEHRAENEN, A.; LEMAIRE, K.; DEBRAY, S.; VAN LOMMEL, L.; POSPISILIK, J.A.;

TSCHOPP, O.; SCHULTZE, S. M.; MALIPIERO, U.; ESTERBAUER, H.; ELLINGSGAARD H.; RUTTI, S.; SCHUIT, F. C.; LUTZ, T. A.; SCHNETZLER, B.; KONRAD, D.; DONATH, Y. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. **Diabetologia**, v. 53, n. 8, p. 1795-1806, 2010.

EL AIDY, S.; VAN BAARLEN, P.; DERRIEN, M.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J.; HOOIVELD, G.; LEVENEZ, F.; DORÉ, J.; DEKKER, J.; SAMSOM, J. N.; NIEUWENHUIS, E. E.; KLEEREBEZEM, M. Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. **Mucosal Immunology**. v. 5, n. 5, p. 576-579, 2012.

ENDO, N.; RUTLEDGE, S. J.; OPAS, E. E.; VOGEL, R.; RODAN, G. A.; SCHIMIDT, A. Human Protein Tyrosine Phosphatase-c7: Alternative Splicing and Inhibition by Bisphosphonates. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 4, p. 535-543, 1996.

FAGUNDES, C. T., AMARAL, F. A., VIEIRA, A. T., SOARES, A. C., PINHO, V., NICOLI, J. R., VIEIRA, L. Q.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 1411-1420, 2012.

FAN, D.; COUGHLIN, L. A.; NEUBAUER, M. M.; KIM, J.; KIM, M.; ZHAN, X.; SIMMS-WALDRIP, T. R.; XIE, Y.; HOOPER, L. V.; KOH, A. Y. Activation of HIF-1 α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 808-814, 2017.

FASSIO, A.; BERTOLDO, F.; IDOLAZZI, L.; VIAPIANA, O.; ROSSINI, M.; GATTI, D. Drug-induced osteonecrosis of the jaw: the state of the art. **Reumatismo**, v. 69, n. 1, p. 9–15, 2017.

FEDELE, S.; PORTER S. R.; D'AIUTO, F.; ALJOHANI, S.; VESCOVI, P.; MANFREDI, M.; ARDUINO, P. G.; BROCCOLETTI, R.; MUSCIOTTO, A.; DI FEDE, O.; LAZAROVICI, T. S.; CAMPISI, G.; YAROM, N. Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A case series. **American Journal of Medicine**, v. 123, n. 11, p. 1060–1064, 2010.

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.

FICARRA, G.; BENINATI, F.; RUBINO, I.; VANNUCCHI A.; LONGO, G.; TONELLI, P.; PINI PRATO, G. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n.11, p. 1123–1128, 2005.

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

FROMIGUE, O.; LAGNEAUX, L.; BODY, J-J. Bisphosphonates Induce Breast Cancer Cell Death In Vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 11, 2000.

- GANGULI, A.; STEWARD, C.; BUTLER, S. L.; PHILIPS, G. J.; MEIKLE, S. T.; LLOYD, A.W.; GRANT, M. H. Bacterial adhesion to bisphosphonate coated hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 4, p. 283–287, 2005.
- GÖNEN, Z. B.; YILMAZ ASAN, C. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw using platelet-rich fibrin. **Cranio - Journal of Craniomandibular Practice**, v. 35, n. 5, p. 332–336, 2017.
- GRAVES, P. **Histopathology of preclinical toxicity studies**. Elsevier, 3^a edição, 2007.
- GREEN, J. R. Bisphosphonates: preclinical review. **Oncologist**, v. 9, n. Suppl. 4, p. 3-13, 2004.
- HALLEEN, J. M.; RÄISÄNEN, S.; SALO, J. J.; REDDY, S. V.; ROODMAN, G. D.; HENTUNEN, T. A.; LEHENKARI, P. P.; KAIJA, H.; VIHKO, P.; VÄÄNÄNEN, H. K. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 33, p. 22907-22910, 1999.
- HANSEN, T.; KIRKPATRICK, C. J.; WALTER, C.; KUNKEL, M. Increased numbers of osteoclasts expressing cysteine proteinase cathepsin K in patients with infected osteoradionecrosis and bisphosphonate-associated osteonecrosis—a paradoxical observation? **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, v. 449, n. 4, p. 448-454, 2006.
- HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Bisphosphonate Osteochemonecrosis (Bis-Phossy Jaw): Is This Phossy Jaw of the 21st Century? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 5, p. 682-689, 2005.
- HIKITA, H.; MIYAZAWA, K.; TABUCHI, M.; KIMURA, M.; GOTO, S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 663-672, 2009.
- HOFF, A. O.; TOTH, B. B.; ALTUNDAG, K.; JOHNSON, M. M.; WARNEKE, C. L.; HU, M. NOOKA, A.; SAYEGH, G.; GUARNERI, V.; DESROULEAUX, K.; CUI, J.; ADAMUS, A.; GAGEL, R. F.; HORTOBAGYI, G. N. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.23, n. 6, p. 826–836, 2008.
- HOWIE, R. N.; BORKE, J. L.; KURAGO, Z.; DAOUDIS, A.; CRAY, J.; ZAKHARY, I. E.; BROWN, T. L.; RALEY, N.; TRAN, L. T.; MESSER, R.; MEDANI, F.; ELSALANTY, M. E. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.
- HUGHES, D. E.; WRIGHT, K. R.; UY, H. L.; SASAKI, A.; YONEDA, T.; ROODMAN, G. D.; MUNDY, G. R.; BOYCE, B.F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 10, p. 1478–87, 1995.
- HUJA S. S.; FERNANDEZ S. A.; HILL K. J.; LI, Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. **Anatomical Record A Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 12, p. 1243–1249, 2006.

- JABBOUR, Z.; HAKIM, M. E.; HENDERSON, J. E.; ALBUQUERQUE, R. F. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. **Oral Oncology**, v. 50, n. 5, p. 485-490, 2014.
- JANOVSKA, Z.; MOTTL, R.; SLEZAK, R.. Experience with the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Biomedical Papers**, [s. l.], v. 159, n. 2, p. 313–317, 2015.
- JI, X.; PUSHALKAR, S.; LI, Y.; GLICKMAN, R.; FLEISHER, K.; SAXENA, D. Antibiotic effects on bacterial profile in osteonecrosis of the jaw. **Oral diseases**, v. 18, n.1, p. 85-95, 2011.
- JIANG, Y.; MEHTA, C. K.; HSU, T. Y.; ALSULAIMANI, F. F. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. **Infection and Immunity**, v.70, n. 6, p.3143-3148, 2002.
- JUNG, A.; BISZA, S.; FLEISCH, H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. **Calcified Tissue Research**, v.11, n. 4, p.269-80, 1973.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.
- KALYAN, S.; WANG, J.; QUABIUS, E.; HUCK, J.; WITFANG, J.; BAINES, J. F.; KABELITZ, D. Systemic immunity shapes the oral microbiome and susceptibility to bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 212, 2015.
- KANG, B.; CHEONG, S.; CHAICHANASAKUL, T.; BEZOUGLAIA, O.; ATTI, E.; DRY, S. M.; PIRIH, F.; Q.; AGHALOO, T. L.; TETRADIS, S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.28, n. 7, p. 1631-1640, 2013.
- KAPLAN, I.; ANAVI, K.; ANAVI, Y.; CALDERON, S.; SCHWARTZ-ARAD, D.; TEICHER, S.; HIRSHBERG, A. The clinical spectrum of *Actinomyces*-associated lesions of the oral mucosa and jawbones: correlations with histomorphometric analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontology**, v. 108, n. 5, p. 738-746, 2009.
- KATSARELIS, H.; SHAH, N. P.; DHARIWAL, D. K.; PAZIANAS, M. Infection and Medication-related Osteonecrosis of the Jaw. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 4, p. 534-539, 2015.
- KATZ, H. Endodontic Implications of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws: A Report of Three Cases. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 11, 2005.
- KEKLIKOGLU, N. The localization of Fos B, a member of transcription factor AP-1 family, in rat odontoblasts and pulpal undifferentiated ectomesenchymal cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 42, n. 3, p. 191-193, 2004.

KELLY, R.; TAGGART, H. Incidence of gastrointestinal side effects due to alendronate is high in clinical practice. **BMJ**, v.315, n. 7117, p.1235.

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

KIM, S. M.; EO, M. Y.; KIM, Y. S.; LEE, S. K. Histochemical observation of bony reversal lines in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**, v. 123, n. 2, p. 220-228, 2017.

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

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

KOHNO, N.; AOGI, K.; MINAMI, H.; NAKAMURA, S; ASAGA, T.; IINO, Y.; WATANABE, T.; GOESSL, C.; OHASHI, Y.; TAKASHIMA, S. Zoledronic Acid Significantly Reduces Skeletal Complications Compared With Placebo in Japanese Women With Bone Metastases From Breast Cancer: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 15, p. 3314-3321, 2005.

KOLPAKOVA, M. E.; ZUBAREVA, A. A.; ARTAMONOVA, T. D.; LISOVSKAYA, E. K.; CHEFU, S. G.; YAGMUROV, O. D.; YAREMEKO, A. I.; VLASOV, T. D. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rat treated with zoledronic acid. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 2, p. 156–159, 2017.

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

KOS, M.; JUNKA, A.; SMUTNICKA, D.; BARTOSZEWICZ, M.; KURZYNOWSKI, T.; GLUZA, K. Pamidronate Enhances Bacterial Adhesion to Bone Hydroxyapatite. Another Puzzle in the Pathology of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, p. 1010-1016, 2013.

KOS, M.; JUNKA, A.; SMUTNICKA, D.; SZYMCZYK, P.; GLUZA, K.; BARTOSZEWICZ, M. Bisphosphonates enhance bacterial adhesion and biofilm formation on bone hydroxyapatite. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 43, p. 863-869, 2015.

KOS, M.; LUCZAK, K. Bisphosphonates promote jaw osteonecrosis through facilitating bacterial colonization. **Bioscience Hypotheses**, v. 2, p. 34–36, 2009.

- KRISHNAN, A.; ARSLANOGLU, A.; YILDIRM, N.; SILBERGLEIT, R.; AYGUN, N. Imaging findings of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with emphasis on early magnetic resonance imaging findings. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 33, n. 2, p. 298-304, 2009.
- KULKARNI, P.; CRUSHMAN, T.; DONTIREDDY, V.; RAO, S. Spontaneously recovered severe thrombocytopaenia following zoledronic acid infusion for osteoporosis. **BMJ Case Reports**, v. 2016, p. 2015–2017, 2016.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. Robbins. **Bases patológicas das doenças**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- KUROSHIMA, S.; SASAKI, M.; NAKAJIMA, K.; TAMAKI, S.; HAYANO, H.; SAWASE, T. Prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like lesions is increased in a chemotherapeutic dose-dependent manner in mice. **Bone**, v. 112, p. 177–186, 2018.
- LANDESBERG, R.; COZIN, M.; CREMERS, S.; WOO, V.; KOUSTENI, S.; SINHA, S.; GARRET-SINHA, L.; RAGHAVAN, S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 5, p. 839–847, 2008.
- LESCLOUS, P.; NAJM, S. A.; CARREL, J. P.; BAROUKH, B.; LOMBARDI, T.; WILLI, J. P.; RIZZOLI, R.; SAFFAR, J. L.; SAMSON, J. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? **Bone**, v. 45, n. 5, p. 843-852, 2009.
- LI E. C.; DAVIS L. E. Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. The pharmacokinetics. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 11, p. 2669-2708, 2003.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, v. 36, n. 3, p.177-187, 1965.
- LÓPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F.; MOLINA-MIÑANO, F.; GÓMEZ-GARCÍA, F.; VICENTE-ORTEGA, V. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 9, p. 697-702, 2010.
- 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.; AZAMBUJA, A. A.; CAMPOS, M. M.; SALUM, F. G.; CHERUBINI, K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head & Neck**, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2011.
- MARINO, K. L.; ZAKHARY, I.; ABDELSAYED, R. A.; CARTER, J. A.; O'NEILL, J. O.; KHASHABA, R. M.; ELSALANT, M.; STEVENS, M. R.; BORKE, J. L. Development of a Rat Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). **The Journal of Oral Implantology**, v. 38, p. 511-528, 2012.
- MARKOWITZ, G. S.; FINE, P. L.; STACK, J. I. KUNIS, C. L.; RADHAKRISHNAN, J.; PALECKI, W.; PARK, J.; NASR, S. H.; HOH, S.; SIEGEL, D. S.; D'AGATI, V. D. Toxic

acute tubular necrosis following treatment with zoledronate (zometa). **Kidney International**, v. 64, n. 1, p. 281-289, 2003.

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

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

MASHIBA, T.; MORI, S.; BURR, D.; KOMATSUBARA, S.; CAO, Y.; MANABE, T.; NORIMATSU, H. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. Suppl, p. 36-42, 2005.

McLEOD, J. C.; BALISH, E. Endotoxin in germfree, gnotobiotic, or conventional-flora Sprague-Dawley rats. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n.2, 1602-1606, 1978.

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

MÖNKKÖNEN, H.; AURIOLA, S.; LEHENKARI, P.; KELLINSALMI, M.; HASSINEN, I. E.; VAIPSALAINEN, J.; MÖNKKÖNEN, J. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 4, p. 437–445, 2006.

MOTA, V. B. **Avaliação da eficácia do método de esterilização química por ácido peracético a 0,2% de escovas de Robinson**. 27p. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE.

MÜCKE, T.; KOSCHINSKI, J.; DEPPE, H.; WAGENPFEIL, S.; PAUTKE C.; MITCHELL, D. A. WOLFF, K. D.; HOLZEHOMAS, F. Outcome of treatment and parameters influencing recurrence in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 5, p. 907–913, 2010.

NICOLATOU-GALITIS, O.; PAPADOPOULOU, E.; SARRI, T.; BOZIARI, P.; KARAYIANNI, A.; KYRTSONIS, M. C.; REPOUSIS, P.; BARBOUNIS, V.; MIGLIORATI, C. A. Osteonecrosis of the jaw in oncology patients treated with bisphosphonates: Prospective experience of a dental oncology referral center. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 112, n. 2, p. 195–202, 2011.

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

OLIVEIRA, C. C.; BARROS-SILVA, P. G.; FERREIRA-JÚNIOR, A. E. C.; GONÇALVES, R. P.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R. L.; ALVES, A. P. N. N. Effects of dexamethasone and nimesulide on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: An experimental study. **Archives of Oral Biology**, v. 83, p. 317–326, 2017.

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.

PELAZ, A.; JUNQUERA, L.; GALLEGO, L.; GARCIA-CONSUEGRA, L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, L.; CUTILLI, T.; OLAY, S. Epidemiology, pharmacology and clinical characterization of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. A retrospective study of 70 cases. **Acta Otorrinolaringológica Española**, v. 66, n. 3, p. 139-147, 2015.

PERNA, C.; RUIZ-BRAVO, E.; REGOJO, R. M.; TARIN, V.; ALONSO, S.; PÉREZ-MIES, B. Osteonecrosis maxilar asociada a infección por *Actinomyces* y tratamiento con bifosfonatos. **Revista Española de Patología**, v. 46, n. 3, p. 153-157, 2013.

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

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

PULSHALKAR, S.; LI, X.; KURAGO, Z.; RAMANATHAPURAM, L. V.; MATSUMURA, S.; FLEISHER, K. E.; GLICKMAN, R.; YAN, W.; LI, Y.; SAXENA, D. Oral microbiota and host innate immune response in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **International Journal of Oral Science**, v. 6, p. 219–226, 2014.

REDDY, B.S.; PLEASANTS, J.R.; WOSTMANN, B.S. Effect of intestinal microflora on iron and zinc metabolism, and on activities of metalloenzymes in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 101–107, 1972.

REDFERN, A.; SUCHODOLSKI, J.; JERGENS, A. Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 181, n. 14, p. 370–370, 2017.

REID, I. R.; CORNISH, J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 90–96, 2012.

REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 3, p. 234-250, 2012.

RIDLEY, A. J.; PATERSON, H. F.; JOHNSTON, C. L.; DIEKMANN, D.; HALL, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell**, v. 70, n.3, p. 401–410, 1992.

RIPAMONTI, C. I.; MANIEZZO, M.; CAMPA, T.; FAGNONI, E.; BRUNELLI, C.; SAIBENE, G.; BAREGGI, C.; ASCANI, L.; CISLAGHI, E. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 1, p. 137–145, 2009.

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

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

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

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

ROSEN, L. S.; GORDON, D.; KAMINSKI, M.; HOWELL, A.; BELCH, A.; MACKEY, J.; APFFELSTAEDT, J.; HUSSEIN, M. A.; COLEMAN, R. E.; REITSMA, D. J, CHEN, B. L.; SEAMAN, J. J. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma: a randomized, double-blind, multicenter, comparative trial. **Cancer**, v. 98, n. 8, p. 1735-44, 2003.

ROSEN, L. S.; GORDON, D. H.; DUGAN-JÚNIOR, W.; MAJOR, P.; EISENBERG, P. D.; PROVENCHER, L.; KAMINSKI, M.; SIMEONE, J.; SEAMAN, J.; CHEN B. L.; COLEMAN, R. E. Zoledronic Acid Is Superior to Pamidronate for the Treatment of Bone Metastases in Breast Carcinoma Patients with at Least One Osteolytic Lesion. **Cancer**, v. 100, n. 1, p. 36-43, 2004.

RUSSMUELLER, G.; SEEMANN, R.; WEISS, K.; SPEISS, M.; PERISANIDIS, C.; FUEREDER, T.; WILLINGER, B.; SULZBACHER, I.; STEININGER, G. The association of medication-related osteonecrosis of the jaw with *Actinomyces spp.* infection. **Scientific Reports**, v.17, n. 6, p. 31604, doi: 10.1038/srep31604, 2016.

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

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

RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; FANTASIA, J.; GOODDAY, R.; AGHALOO, T.; MEHROTRA, B.; O'RYAN, F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.72, p. 1938-1956, 2014.

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

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

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

SAKAGUCHI, O.; KOKURYO, S.; TSURUSHIMA, H.; TANAKA, J.; HABU, M.; UEHARA, M.; NISHIHARA, T.; TOMINAGA, K. Lipopolysaccharide aggravates bisphosphonate-induced osteonecrosis in rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 4, p. 528–534, 2015.

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

SARATHY, A. P.; BOURGEOIS, S. L.; GOODELL, G. G. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws and Endodontic Treatment: Two Case Reports. **Journal of Endodontics**, v.31, n. 10, p. 759-763, 2005.

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

SEDGHIZADEH, P. P.; KUMAR, S. K.; GORUR, A.; SCHAUDINN, C.; SHULER, C. F.; COSTERTON, J. W. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.66, n. 4, p.767-775, 2008.

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

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

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

SILVA, P. G. B.; FERREIRA-JÚNIOR, A. E. C.; TEÓFILO, C. R.; BARBOZA, M. C.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R.L.; RIBEIRO, R. A.; ALVES, A. P. N. N. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v. 6, p. 1237-1245, 2015.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015-3025, 2006.

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

SPINELLI, M. O.; CRUZ, R. J.; GODOY, C. M. S. C.; JUNQUEIRA, M. S.; MOTTA, M. C.; BORTOLATTO, J. Estudo Comparativo Dos Valores Hematológicos Entre Sexo E Categorias Sanitárias De Camundongos C57Bl/6 E Balb/C. , v. 1, n. 1, 64-70, 2012.

SONIS, S.T.; WATKINS, B. A.; LYNG, G. D.; LERMAN, M. A.; ANDERSON, K. C. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncology**, v. 45, n. 2, p. 164-72, 2009.

TAKO, E.; GLAHN, R.P.; WELCH, R.M.; LEI, X.; YASUDA, K.; MILLER, D.D. Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 3, p. 472–480, 2008.

TALAMO, G.; ANGTUACO, E.; DONG, W. L.; MICELI, M. H.; ZANGARI, M.; TRICOT, G.; BARLOGIE, B.; ANAISSIE, E. Avascular necrosis of femoral and/or humeral heads in multiple myeloma: results of a prospective study of patients treated with dexamethasone-based regimens and high-dose chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 22, p. 5217-5223, 2005.

TANAKA, J.; KOKURYO, S.; YOSHIGA, D.; TSURUSHIMA, H.; SAKAGUCHI, O.; HABU, M.; NISHIHARA, T.; YOSHIOKA, I.; TOMINAGA, K. An osteonecrosis model induced by oral bisphosphonate in ovariectomised rats. **Oral Diseases**, v. 21, n. 8, p. 969–976, 2015.

TASSONE, P.; FORCINITI, S.; GALEA, E.; MORRONE, G.; TURCO, M. C.; MARTINELLI, V.; TAGLIAFERRI, P.; VENUTA, S. Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. **Leukemia**, v. 14, n. 5, p. 841–844, 2000.

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

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

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

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

TSURUSHIMA, H. KOKURYO, S.; SAKAGUCHI, O.; TANAKA, J. TOMINAGA, K: Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.42, p. 1481–1487, 2013.

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

VILARINHO, J. L. P.; FERRARE, N.; MOREIRA, A. M. R.; MOURA, H. F.; ACEVEDO, A. C.; CHAVES, S. B.; MELO, N. S.; LEITE, A. F.; MACEDO, S. B.; SOUZA, M. P.; GUIMARÃES, A. T. B.; FIGUEIREDO, P. T. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. **Archives of Oral Biology**, v. 82, p. 79-85, 2017.

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

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

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

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

WEI, X.; PUSHALKAR, S.; ESTILO, C.; WONG, C.; FAROOKI, A.; FORNIER, M.; BOHLE, G.; HURYN, J.; LI, Y.; DOTY, S.; SAXENA, D. Molecular profiling of oral

microbiota in jawbone samples of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral diseases**, v.18, p. 602-612, 2012.

WEINBORN, V.; VALENZUELA, C.; OLIVARES, M.; ARREDONDO, M.; WEILL, R.; PIZARRO, F. Prebiotics increase heme iron bioavailability and do not affect non-heme iron bioavailability in humans. **Food & Function**, v. 8, n. 5, p. 1994–1999, 2017.

WEINSTEIN, R.S.; ROBERSON, P. K.; MANOLAGAS, S. C: Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 1, p. 53-62, 2009.

WIDMER, M. B.; SONDEL, P. M.; BACH, F. H. Responsiveness of germfree mice in mixed leukocyte culture. Reexamining of nature of the responding unit. **Journal of Experimental Medicine**, v. 136, n. 2, p. 398-402, 1972.

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

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

WRIGHT, E.; SCHOFIELD, P. T.; MOLOKHIA, M. Bisphosphonates and evidence for association with esophageal and gastric cancer: A systematic review and metaanalysis. **BMJ Open**, [s. l.], v. 5, n. 12, 2015.

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

XIAO, E.; HE, L.; WU, Q.; LI, J.; HE, Y.; ZHAO, L.; CHEN, S.; NA, J.; LIU, Y.; CHEN, C.; ZHANG, Y. Microbiota regulates bone marrow mesenchymal stem cell lineage differentiation and immunomodulation. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2017.

YAMAZAKI, T.; YAMORI, M. ISHIZAKI, T.; ASAI, K.; GOTO, K.; TAKAHASHI, K.; NAKAYAMA, T.; BESSHO, K. Increased incidence of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients treated with bisphosphonates: a cohort study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.41, p.1397-1403, 2012.

YEUNG, C.K.; GLAHN, R.P.; WELCH, R.M.; MILLER, D.D. Prebiotics and iron Bioavailability—Is there a connection? **Journal of Food Science**, v. 70, n. 5, p. R88–R92, 2005.

ZEIGLER, C.C.; PERSSON, G. R.; WONDIMU, B.; MARCUS, C.; SOBKO, T.; MODÉER, T.. Microbiota in the oral subgingival biofilm is associated with obesity in adolescence. **Obesity**, v. 20, n. 1, p. 157-164, 2012.

ZERIAL, M., STENMARK, H. Rab GTPases in vesicular transport. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 613– 620; 1993.

ZHANG, D., UDAGAWA, N., NAKAMURA, I., MURAKAMI, H., SAITO, S., YAMASAKI, K., SHIBASAKI, Y., MORII, N., NARUMIYA, S., TAKAHASHI, N., SUDA, T. The small GTP-binding protein, Rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. Pt 8, p. 2285–2292, 1995.

ZHANG, Q.; ATSUTA, I.; LIU, S.; CHEN, C.; SHI, S.; SHI, S.; LE, A. D. IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 12, p. 3176-3188, 2013.

ZHANG, X.; ZHANG, D.; JIA, H.; FENG, Q.; WANG, D.; LIANG, D.; WU, X.; LI, J.; TANG, L.; LAN, Z.; CHEN, B.; LI, Y.; ZHONG, H.; XI, H.; JI, Z.; CHEN, W.; TANG, S.; XU, X.; WANG, X.; CAI, X.; LIU, S.; XIA, Y.; LI, J.; QIAO, X.; AL-AAMA, J. Y.; CHEN, H.; WANG, L.; WU, Q-J.; ZHANG, ZHENG, W.; LI, Y.; \HANG, M.; LUO, G.; XUE, W.; XIAO, L.; LI, J.; CHEN, W.; XU, X.; YIN, Y.; YANG, H.; WANG, J.; KISTIANANSEN, K.; LIU, L.; LI, T.; HUANG, Q.; LI, Y.; LAN, Z. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nature medicine**, v. 21, n. 8, p. 895-905, 2015.

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

ANEXOS**ANEXO A - Termos de anuência****TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA INFECÇÃO E DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”**, sob a coordenação da Prof.^a **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, do Departamento de Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, 15 de julho de 2016.



Fabrício Bitú Sousa

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

ANEXO B – Termo de Anuência**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA INFECCÃO E DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”**, sob a coordenação da Prof.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, 30 de junho de 2016.



Manoel Odorico de Moraes Filho

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

ANEXO C – Termo de Autorização de Instituição co-participante**TERMO DE AUTORIZAÇÃO**

Eu, **Fernando André Campos Viana**, abaixo assinado, responsável pelo **Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)**, autorizo a realização do estudo “**O papel da infecção e de receptores Toll-like tipo 2 na osteoquimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico**”, a ser conduzido pela aluna de doutorado **Camila Carvalho de Oliveira** (Programa de Pós-graduação em Odontologia – Universidade Federal do Ceará) e coordenado pela **Prof.ª Dr.ª Ana Paula Negreiros Nunes Alves** (Departamento de Clínica Odontológica, Curso de Odontologia, Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará) na Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Fui informado pelo responsável do estudo sobre as características e objetivos da pesquisa, bem como das atividades que serão realizadas na instituição a qual represento.

Declaro ainda concordar com o parecer ético a ser emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da instituição proponente, conhecer e cumprir as Resoluções do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esta instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa e de seu compromisso no resguardo do bem-estar dos animais participantes da pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de segurança e bem-estar.


Fortaleza, CE, de 15 de Junho de 2016.



Prof. Dr. Fernando André Campos Viana

Professor da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Coordenador do curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
Universidade de Fortaleza

Fernando André Campos Viana
Coordenador do Curso de Odontologia

ANEXO D – Termo de Anuência**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA INFECÇÃO E DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”**, sob a coordenação da Prof.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.


Fortaleza, 15 de julho de 2016.



Fernando André Campos Viana

**Professor do curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)
Coordenador do Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza
(UNIFOR)**

COORDENAÇÃO EDSON QUEIROZ
Universidade de Fortaleza



Fernando André Campos Viana
Coordenador do Curso de Odontologia

ANEXO E – Termo de Anuência**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA INFECÇÃO E DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”**, sob a coordenação da Prof.^a **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, do Departamento de Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, 21 de julho de 2016.



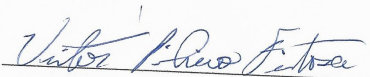
Renata Cordeiro Teixeira Medeiros

Professora do curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)
Coordenador do setor de Radiologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

ANEXO F – Termo de Anuência**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA INFECCÃO E DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”**, sob a coordenação da Prof.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, 19 de julho de 2016.

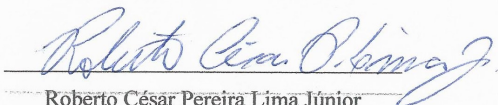


Victor Pinheiro Feitosa
Coordenador do Laboratório Multidisciplinar de Odontologia - Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará.

ANEXO G – Termo de Anuência**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado **“O PAPEL DA INFECCÃO E DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”**, sob a coordenação da Prof.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, 20 de julho de 2016.

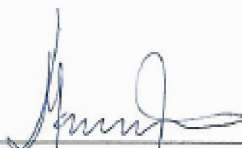


Roberto César Pereira Lima Júnior
**Professor Adjunto III de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará
Coordenador do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA),
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade
Federal do Ceará.**

ANEXO H – Termo de Anuência**TERMO DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins que estou de acordo com a execução e colaboração do projeto de pesquisa intitulado intitulado “O PAPEL DA INFECÇÃO E DE RECEPTORES *TOLL-LIKE* TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”, sob a coordenação da Prof.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, do Departamento de Clínica Odontológica, Curso de Odontologia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, 20 de julho de 2016.



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

ANEXO I – 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 “O PAPEL DO MICRO-ORGANISMO E DE RECEPTORES *TOLL-LIKE* TIPO 2 NA OSTEOQUIMIONECROSE DO OSSO MANDIBULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO”, protocolo N°85/16, sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de n° 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 no dia 20 de dezembro de 2016.

Vigência do projeto	15/01/2017 a 31/03/2019
Espécie/Linhagem	Camundongos isogênicos C57 BL/6
N° de Animais	72
Peso	25g
Sexo	Machos
Origem	Biotério da UNIFOR (Nubex)

Fortaleza, 25 de janeiro de 2017

Alexandre Havt Bindá

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: 1688362

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



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
ENSINANDO E APRENDENDO

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel do micro-organismo e de receptores Toll-like tipo 2 na osteoquimionecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico", protocolada sob o CEUA nº 6466171017, sob a responsabilidade de **Fernando André Campos Viana e equipe; Ana Paula Negreiros Nunes Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA/UNIFOR) na reunião de 26/02/2018.

We certify that the proposal "The role of the microorganism and Toll-like type 2 receptors in zoledronic acid-induced osteochemionecrosis of mandibular bone", utilizing 48 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6466171017, under the responsibility of **Fernando André Campos Viana and team; Ana Paula Negreiros Nunes Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Fortaleza's University (CEUA/UNIFOR) in the meeting of 02/26/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2018](#) a [02/2019](#) Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)
Espécie: [Camundongos heterogênicos](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [2 a 3 meses](#) N: [48](#)
Linhagem: [C57 Black](#) Peso: [100 a 150 g](#)

Local do experimento: [Nubex - biotério da UNIFOR com experimentos de imagens no curso de Odontologia - UNIFOR](#)

Fortaleza, 20 de março de 2018

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Saulo Ellery Santos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza