



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

ANTONIO ERNANDO CARLOS FERREIRA JUNIOR

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E DE VIAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS EM
RATOS

FORTALEZA

2020

ANTONIO ERNANDO CARLOS FERREIRA JÚNIOR

**PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E DE VIAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS EM
RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Clínica Odontológica

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

FORTALEZA

2020

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)

- F439p Ferreira-Junior, Antonio Ernando Carlos.
PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E DE VIAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS EM RATOS / Antonio Ernando Carlos Ferreira-Junior. – 2020.
103 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. Osteonecrose da arcada osseodentária associada a bisfosfonatos. 2. Fator de Necrose Tumoral alfa. 3. Ácido Zoledrônico. 4. Bisfosfonatos. 5. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD 617.6

ANTONIO ERNANDO CARLOS FERREIRA JÚNIOR

**PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E DE VIAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS EM
RATOS**

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

Aprovado em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Alana de Freitas Pires

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Luiz André Cavalcante Brizenno

Centro Universitário Christus (Unichristus)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concedidas e por todos os momentos em minha vida na qual estive do meu lado, abençoando e guiando meus passos.

À minha família, principalmente aos meus pais, **Rita e Ernando**, pelo apoio em todos os momentos e amor incondicional, sendo meu maior exemplo de força e honestidade e responsáveis por todas as minhas vitórias.

À minha orientadora, **Professora Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, pelos grandes ensinamentos científicos, éticos, pessoais e morais transmitidos, fazendo-me desenvolver uma profunda admiração profissional e pessoal. Também sou imensamente grato pela sua disponibilidade e palavras de incentivo. Agradeço a oportunidade que me foi dada desde o 4º semestre da faculdade, passando por monitorias, iniciação científica e projetos de extensão e chegando até o mestrado e agora doutorado. Sou muito feliz pela receptividade, respeito e paciência com a qual fui tratado como orientado durante toda essa jornada.

Ao **Professor Mário Rogério Lima Mota**, co-orientador, por toda a paciência em repassar conhecimento e apoio nos momentos mais difíceis. Sou imensamente grato por conviver ao lado de um ser humano impecavelmente inteligente, simples e acessível, e que não mede esforços em compartilhar o seu amplo conhecimento com grande empolgação.

Ao **Professor Fabrício Bitu Sousa**, co-orientador, pelos ensinamentos clínicos e científicos sempre com visão diferenciada e ponderada dos achados científicos. Obrigado pela confiança, oportunidades e carinho.

Aos meus grandes amigos de laboratório e pesquisa animal, **Paulo Goberlânio e Camila Oliveira e Elisa Lima Verde**, por me auxiliarem em cada momento da vida acadêmica e pessoal. Nosso companheirismo e cumplicidade cresceram a cada dia e hoje posso considerá-los como amigos raros que desejo levar por toda vida. Sou imensamente

grato por toda a ajuda ofertada e pela salvação em muitos momentos difíceis.

Aos **colegas e amigos** do Laboratório de Patologia Bucodental **Thinali, Isabelly, Karine, Pedro Henrique, Joao Eudes, Thâmara, Ealber, Thales, Erasmo**, entre **outros tantos que passaram durante esses anos**, pela amizade, companhia e troca de experiências. Me sinto muito orgulhoso e grato de poder estar ao lado de profissionais tão renomados e inteligentes que fazem parte dessa equipe

Aos bolsistas de iniciação científica **Imaculada, Mariana, Lucas, Francisco Denis, Manu, dentre tantos outros** que passaram pelo laboratório e contribuíram para as pesquisas clínicas e laboratoriais. Sem o esforço e dedicação dessas pessoas esse trabalho e tantos outros não seriam possíveis. Sou grato por todos os experimentos compartilhados, os quais foram transformados em instantes de alegria, leveza e descontração. Torço muito pelo sucesso de todos.

Aos técnicos de laboratório **Alceu Machado e Débora** pela grande contribuição e ensinamentos nas etapas laboratoriais, cortes e montagem de lâminas histológicas.

Às alunas de pós-graduação em Ciências Médicas **Josyane e Dayse** pela imensa contribuição com reações e reagentes necessários ao desenvolvimento desse estudo.

Ao **Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA)**, principalmente na figura do **Prof. Roberto César**, por acreditar nas ideias do nosso laboratório e contribuir com nossas pesquisas, fornecendo imensa acessibilidade e conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos

RESUMO

Os bisfosfonatos são medicamentos comumente utilizados no tratamento de distúrbios ósseos e principalmente no tratamento de metástases ósseas durante a terapia antineoplásica. Como efeito adverso, esses fármacos são associados com o desenvolvimento de Osteonecrose dos Maxilares associada a Bisfosfonatos (OMB), uma condição de difícil tratamento que apresenta patogênese pouco esclarecida. Sugere-se, entretanto, que mecanismos inflamatórios possam estar associados, com aumento da expressão de citocinas e participação de grupos celulares imunes específicos. Dessa forma, constitui objetivo do presente trabalho delinear vias de mediadores pró-inflamatórios incluindo a participação do estresse oxidativo na patogênese da OMB experimental. Para isso, foram utilizados 54 (6 por grupo) ratos Wistar machos (180-220g) submetidos a quatro injeções venosas semanais de solução salina estéril ou ácido zoledrônico (AZ) 0,20 mg/kg, associadas ou não ao bloqueio das vias de TNF- α (infliximabe 0,5 mg/kg), iNOS (aminoguanidina 50 mg/kg) e COX-2 (celecoxibe 16 mg/kg). Os mesmos foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (dia 49). Após 70 dias, foi realizada a eutanásia, onde foram removidos e pesados os órgãos (fígado, baço, rins e estômago) e as mandíbulas dos animais. Essas últimas foram hemisseccionadas (lados esquerdo e direito) e submetidas às análises radiográfica, histológica, histomorfométrica (contagem de polimorfonucleares, mononucleares, número de lacunas de osteócitos vazias e osteoclastos) e imuno-histoquímica para os marcadores COX-2, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina(IL)-1 β , IL-6, Caspase-3, RANK, RANKL e OPG pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Verificaram-se, também, os níveis de Mieloperoxidase (MPO), Nitrito/nitrato, Glutathione e Malonaldeído. Radiograficamente o grupo salina apresentou a área no sítio de exodontia reparada ao final do período experimental, já nos grupos tratados com ácido zoledrônico, os valores obtidos de área radiolúcida foram superiores ao grupo salina ($p < 0,001$), obtendo assim áreas sugestivas de osteonecrose que se mantiveram sem diferenças mesmo entre os diferentes bloqueios adicionados posteriormente ($p = 0,098$). Após análise histomorfométrica, o número de neutrófilos no grupo salina (3 ± 1) foi significativamente menor ao do grupo ácido zoledrônico (373 ± 85) ($p < 0,05$). Os animais co-tratados com aminoguanidina apresentaram redução significativa do número de neutrófilos (140 ± 18) em relação ao grupo AZ ($p < 0,05$). Em adição, o mesmo grupo tratado com aminoguanidina (233 ± 12) aumentou o número de mononucleares em relação

ao grupo tratado somente com AZ (168 ± 29). O número de osteoclastos em apoptose e lacunas de osteocitos vazias não demonstraram diferenças após os diferentes bloqueios. Na análise imunohistoquímica, o grupo ácido zoledrônico demonstrou aumento significativo na expressão de TNF- α ($p < 0,001$), IL-1 β ($p < 0,001$), IL-6 ($p = 0,007$), iNOS ($p = 0,003$), COX-2 ($p = 0,003$), NF- κ B ($p < 0,001$), RANKL ($p = 0,020$), OPG ($p = 0,001$), TRAP ($p < 0,001$) e Caspase-3 ($p = 0,001$) em relação ao grupo salina. Além disso, foram visualizadas, também, maiores dosagens de MPO ($p < 0,005$), Glutathione ($p = 0,025$) e Malanoaldeído ($p = 0,027$) no grupo AZ em relação ao grupo salina. Após os bloqueios, foi visualizado diminuição significativa, em relação ao grupo tratado com AZ, da expressão de IL-1 no grupo co-tratado com tocilizumabe ($p = 0,021$), de IL-6 no grupo co-tratado com tocilizumabe ($p = 0,041$), de TNF- α no grupo co-tratado com infliximabe ($p < 0,001$), de iNOS no grupo co-tratado com aminoguanidina ($p = 0,042$) e de COX-2 nos grupos co-tratados com aminoguanidina ($p = 0,012$) e celecoxibe ($p = 0,038$), sem diferenças significativas para a expressão de NF- κ B entre todos os grupos que receberam AZ ($p = 0,091$). Com isso, conclui-se que os bloqueios parciais de TNF- α , IL-6 e COX-2 através de infliximabe, tocilizumabe e celecoxibe, respectivamente, não interferiram nas características radiográficas e histológicas da OMB. Entretanto, o bloqueio do estresse oxidativo através da administração da aminoguanidina, alterou aspectos celulares inflamatórios (relação polimorfonucleares/mononucleares), contudo sem repercussão no número de células osteoclásticas com sinais de apoptose ou lacunas de osteócitos vazias.

Palavras Chaves: Osteonecrose da arcada osseodentária associada a bisfosfonatos, Fator de Necrose Tumoral alfa, Ácido Zoledrônico, Bisfosfonatos, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Bisphosphonates are drugs commonly used in the treatment of bone disorders and mainly in the treatment of bone metastases during antineoplastic therapy. As an adverse effect, these drugs are associated with the development of bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis (OMB), a difficult-to-treat condition with poorly understood pathogenesis. However, it is suggested that inflammatory mechanisms may be associated with increased cytokine expression and participation of specific immune cell groups. Thus, the objective of the present study is to delineate proinflammatory mediators pathways including the participation of oxidative stress in the pathogenesis of experimental OMB. Fifty-four (Six per group) Male Wistar rats (180-220g) were submitted to four weekly venous injections of sterile saline or zoledronic acid (AZ) 0.20 mg / kg, associated or not with blockade of TNF- α (infliximab 0,5 mg / kg), iNOS (aminoguanidine 50 mg / kg) and COX-2 (celecoxib 16 mg / kg). Subsequently, they were submitted to left lower first molar extraction (day 49). After 70 days, euthanasia was performed, where the organs (liver, spleen, kidneys and stomach) and jaws of the animals were removed and weighed. The latter were hemisected (left and right sides) and submitted to radiographic, histological, histomorphometric analysis (polymorphonuclear, mononuclear count, number of empty osteocyte and osteoclast gaps) and immunohistochemistry for the markers COX-2, Tumor Necrosis Factor. α (TNF- α), Interleukin (IL) -1 β , IL-6, Caspase-3, RANK, RANKL and OPG by the streptavidin-biotin-peroxidase method. Myeloperoxidase (MPO), Nitrite / nitrate, Glutathione and Malanoaldehyde levels were also verified. As a result, radiographically the saline group presented the area at the repaired extraction site at the end of the experimental period, whereas the groups treated with zoledronic acid, the values obtained from the radiolucent area were significantly higher than the saline group ($p < 0.001$), thus obtaining areas suggestive of osteonecrosis without differences even between the different blocks ($p = 0.098$). After histomorphometric analysis, the number of neutrophils in the saline group (3 ± 1) was significantly lower than in the zoledronic acid group (373 ± 85) ($p < 0.05$). The animals co-treated with aminoguanidine showed a significant reduction in the number of neutrophils (140 ± 18) in relation to the AZ group ($p < 0.05$). In addition, the same aminoguanidine-treated group (233 ± 12) increased the number of mononuclears compared to the AZ-treated group alone (168 ± 29). The number of apoptotic osteoclasts and empty osteocyte gaps showed no differences after the different

blocks. In immunohistochemical analysis, the zoledronic acid group showed significant increase in TNF- α (p <0.001), IL-1 β (p <0.001), IL-6 (p = 0.007), iNOS (p = 0.003), COX-2 (p = 0.003), NF- κ B (p <0.001), RANKL (p = 0.020), OPG (p = 0.001), TRAP (p <0.001) and Caspase-3 (p = 0.001) relative to the saline group. In addition, higher dosages of MPO (p <0.005), Glutathione (p = 0.025) and Malanoaldehyde (p = 0.027) were also observed in the AZ group compared to the saline group. After blockade, a significant decrease was seen in the AZ-treated group for IL-1 expression in the tocilizumab co-treated group (p = 0.021), for IL-6 in the tocilizumab co-treated group (p = 0.041), TNF- α in the infliximab co-treated group (p <0.001), iNOS in the aminoguanidine co-treated group (p = 0.042) and COX-2 in the aminoguanidine (p = 0.012).) and celecoxib groups (p = 0.038), with no significant differences for NF- κ B expression among all groups receiving AZ (p = 0.091). Thus, it was concluded that partial blockages of TNF- α , IL-6 and COX-2 through infliximab, tocilizumab and celecoxib, respectively, did not interfere with the radiographic and histological characteristics of OMB. However, the blockade of oxidative stress through the administration of aminoguanidine, altered inflammatory aspects present (polymorphonuclear / mononuclear ratio), but without repercussion in the number of cells with apoptosis signs or empty osteocyte gaps.

Keywords: Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw, Tumor Necrosis Factor-alpha, Zoledronic Acid, Bisphosphonates, Oxidative Stress