



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA
CURSO DE ODONTOLOGIA

ANTONIO EDSON ALMEIDA ABREU

**Uso da Pentoxifilina e Tocoferol na quimionecrose induzida por ácido zoledrônico em
mandíbulas de ratos**

FORTALEZA

2020

ANTONIO EDSON ALMEIDA ABREU

Uso da Pentoxifilina e Tocoferol na quimionecrose induzida por ácido zoledrônico em
mandíbulas de ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Odontologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia.

Orientador: Prof^ª. Dra. Delane Viana Gondim

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)

- A145u Abreu, Antonio Edson Almeida.
Uso da pentoxifilina e tocoferol na quimionecrose induzida por ácido zoledrônico em mandíbulas de ratos / Antonio Edson Almeida Abreu. – 2020.
40 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Delane Viana Gondim.
1. Osteonecrose.. 2. Osteoquimionecrose.. 3. Bisfosfonatos.. 4. Ácido zoledrônico.. 5. Pentoxifilina e Tocoferol.. I. Título.

CDD 617.6

ANTONIO EDSON ALMEIDA ABREU

Uso da Pentoxifilina e tocoferol na quimionecrose induzida por ácido zoledrônico em
mandíbulas de ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Odontologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia.

Aprovado em ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Delane Viana Gondim (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª MSc. Luane Macedo Sousa
Faculdade de Odontologia Paulo Picanço (FACPP)

MSc Jonas Nogueira Ferreira Maciel Gusmão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB) é uma condição dolorosa e debilitante, que resulta em ulceração na mucosa oral e necrose óssea. A OMB acomete entre 0,8 a 12% da população, e ainda não apresenta uma terapêutica eficaz. Acometendo entre 0,8 e 12% da população. Esse trabalho objetiva avaliar o efeito da pentoxifilina e tocoferol na OMB na mandíbula de ratos. Para isso ratos Wistar (180-200g) foram divididos em 5 grupos: controle (C), Ácido zoledrônico + exodontia (AZ+ EX), Ácido zoledrônico + Exodontia + Pentoxifilina (AZ+EX+P), AZ+EX + Tocoferol (AZ+ EX+T) e AZ+EX + Pentoxifilina e Tocoferol (AZ+EX+P+T). A OMB foi induzida a través da administração de AZ (0,2 mg/kg, e.v) nos dias 0, 7, 14 e 49. No 42º dia foi realizada exodontia do 1º molar inferior esquerdo (1MIE). Os animais foram pré-tratados com Pentoxifilina (15 mg/kg/dia; i.p) e/ou Tocoferol (5,5 mg/kg/dia, i.p) até 2 h antes das Exodontia do 1MIE. Os animais foram eutanasiados no dia 70. Foram realizadas análises histopatológicas das mandíbulas para análise de infiltrado inflamatório, deposição osteóide, osteoclastos apoptóticos. Contagem de osteócitos viáveis e de lacunas vazias foram realizadas através do software ImageJ. Foram realizadas dosagem sérica de cálcio (Ca), fósforo (P), fosfatase alcalina (FAO), Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e análise do estresse oxidativo nos tecidos hepático e renal. Na análise histopatológica, o grupo AZ+EX+P+T apresentou significativa melhora na condição óssea no sítio de exodontia, apresentando maior número de osteócitos viáveis e menor número de lacunas vazias quando comparado ao grupo com OMB ($p<0.05$). O grupo AZ+EX+T apresentou maiores níveis de FAO e os grupos que receberam Pentoxifilina apresentaram maiores níveis de P sérico quando comparados ao grupo com OMB ($p<0.05$). Os grupos pré-tratados apresentaram redução de ALT sanguíneo quando comparados ao grupo com OMB ($p<0.05$). A administração de P+T reduziu significativamente os níveis de malondialdeído hepático quando comparado ao grupo com OMB ($p<0.05$). Nossos resultados sugerem que o pré-tratamento de P+T melhora a condição óssea no local do sítio da exodontia e não apresenta toxicidade sistêmica em ratos com OMB.

Palavras-chave: Osteonecrose. Osteoquimionecrose. Bifosfonatos. Ácido Zoledrônico. Pentoxifilina e Tocoferol.

ABSTRACT

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is a painful, debilitating condition, which still has no effective treatment, resulting in mucosal ulceration and bone necrosis, affecting between 0.8 and 12% of the population. This work aims to evaluate the effect of pentoxifylline and tocopherol on BRONJ in the mandible of rats. For this, Wistar rats (180-200g) were divided into 5 groups: control (C), Zoledronic acid + tooth extraction (AZ+EX), Zoledronic acid + tooth extraction + Pentoxifylline (AZ+EX+P), AZ + EX + Tocopherol (AZ+EX+T) and AZ + EX + Pentoxifylline and Tocopherol (AZ+EX+P+T). Bro was induced through the administration of AZ (0.2 mg / kg, e.v) on days 0, 7, 14 and 49. On the 42nd day, extraction of the lower left first molar (1LLM) was performed. The animals were pre-treated with Pentoxifylline (15 mg / kg / day; i.p) and / or Tocopherol (5.5 mg / kg / day, i.p) up to 2 hours before the 1LLM extraction. The animals were euthanized on day 70. Histopathological analyzes of the mandibles were performed to analyze inflammatory infiltrate, osteoid deposition, apoptotic osteoclasts. Counting of viable osteocytes and empty gaps were performed using the ImageJ software. They were evaluating serum calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (FAO), AST, ALT and analysis of oxidative stress in liver and kidney tissues. In the histopathological analysis, the AZ+EX+P+T group improves improvement in bone condition at the tooth extraction site, a greater number of viable osteocytes and a smaller number of empty gaps when compared to the group with BRONJ (p <0.05). The group pretreated with only Tocopherol showed higher levels of FAO and the groups that received higher secondary Pentoxifylline with a serum P level when compared to the BRONJ group (p <0.05). The pre-dissipated blood ALT groups when compared to the BRONJ group (p <0.05). The administration of P + T significantly reduced the levels of hepatic malondialdehyde when compared to the group with BRONJ (p <0.05). Our results suggest that the pre-treatment of P+T improves the bone condition at the site of extraction and does not present systemic toxicity in rats with BRONJ.

Keywords: Osteonecrosis. Osteoquimionecrosis. Bisphosphonates. Zoledronic Acid. Pentoxifylline and Tocopherol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras 1	Grupos experimentais	15
Figura 2	Protocolo experimental simplificado	16
Figura 3	Fotomicrografia do sítio de exodontia em animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	19
Figura 4	Fotomicrografias do tecido ósseo para análise de número de Osteócitos viáveis e de lacunas vazias	21
Figura 5	Análise quantitativa do número de osteócitos viáveis e animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	22
Figura 6	Análise quantitativa do número de lacunas vazias em animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	22
Figura 7	Análise dos níveis de Fosfatase Alcalina em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	23
Figura 8	Análise dos níveis de Fósforo sérico em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	24
Figura 9	Análise dos níveis de Cálcio sérico em ratos OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	25
Figura 10	Análise dos níveis hepáticos de ALT em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	26
Figura 11	Análise dos níveis hepáticos de AST em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	27
Figura 12	Análise dos níveis teciduais hepático (A) e renal (B) de GSH em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e Tocoferol	28
Figura 13	Análise dos níveis de MDA no fígado (A) e rim (B) em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e Tocoferol	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros histológicos das mandíbulas de ratos	20
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance (análise de variância)
AST	Aspartato Aminotransferase
BFs	Bisfosfonatos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilenodiaminotetracético)
ERO	Espécie Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathione (glutathiona reduzida)
HE	Hematoxilina e Eosina
MDA	Malondialdehyde (malanoaldeído)
NEMPI	Núcleo de Estudos e Pesquisa em Microscopia e Processamento de Imagem
OMB	Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos
OMRM	Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos
OPG	Osteoprotegerin (osteoprotegerina)
ORN	Osteorradionecrose
OVI	Osteoclastos com Vacuolização Intracitoplasmática
RANK	Receptor activated nuclear factor kappa B (recetor ativador do fator nuclear kappa B)
RANKL	Receptor activated nuclear factor kappa B (ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B)
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha (Fator de Necrose Tumoral alfa)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivos específicos	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Aspectos éticos	14
3.2	Animais	14
3.3	Modelo de osteonecrose induzida por bisfosfonatos (OMB)	15
3.4	Administração de pentoxifilina e Tocoferol	16
3.5	Análise histopatológica do osso alveolar	16
3.6	Dosagem sérica de Fosfatase alcalina óssea (FAO), Cálcio (Ca) e Fósforo (P) Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)	17
3.7	Análise do estresse oxidativo	17
3.8	Análise estatística e delineamento do estudo	17
4	RESULTADOS	18
4.1	Análise histopatológica do osso alveolar de animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol	18
4.2	Dosagem sérica de FAO, Ca, P, AST e ALT	23
4.2.1	<i>Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de FAO encontrada no modelo experimental de OMB induzida pela administração de Acido Zoledrônico</i>	23
4.2.2	<i>Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de Fósforo no modelo de Quimionecrose por Acido Zoledrônico</i>	24
4.2.3	<i>Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis séricos de Cálcio em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol</i>	25
4.2.4	<i>Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de ALT no modelo experimental de OMB induzida por Acido Zoledrônico</i>	26
4.2.5	<i>Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de AST no modelo experimental de OMB induzida por Acido Zoledrônico</i>	27
4.3	Efeitos Oxidativos dos Fármacos	28

4.3.1	<i>Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de GSH nos tecidos hepático e renal no modelo experimental de OMB induzida por Ácido Zoledrônico</i>	28
4.3.2	<i>Efeito da administração de Pentoxifilina e Tocoferol sobre os níveis de MDA nos tecidos hepático e renal no modelo experimental de OMB induzida por Ácido Zoledrônico</i>	29
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO – Parecer do comitê de ética	40

1 INTRODUÇÃO

Inicialmente observada como uma consequência da radiação ionizante (MARX., 1983), a osteonecrose dos maxilares aparece clinicamente associada a exposição de osso necrótico. Já a osteonecrose dos maxilares relacionada com medicamentos (OMRM) também é definida pela exposição do osso necrótico, mas nesses casos os pacientes devem ter sido submetidos a um tratamento prévio com medicações antirreabsortivas ou antiangiogênicas (RUGGIERO., 2014).

A OMB foi descrita pela primeira vez em 2003 (MARX.,2003) e a partir dessa época vários relatos de casos e estudos retrospectivos associaram o uso desses fármacos, utilizados amplamente no tratamento da osteoporose, ao aumento de ocorrência de osteonecrose nos maxilares (OLIVEIRA et al.,2014).

Os BFs são potentes inibidores da reabsorção óssea e são utilizados no tratamento da osteoporose e outras doenças que causam a perda de massa óssea como doença de Paget, metástases ósseas e mieloma múltiplo prevenindo fraturas ósseas (RESZKA., 2003). A ação dos BFs resulta no aumento da massa e mineralização óssea, densidade mineral e resistência a fratura (FOURNIER et al.,2002).

Os BFs apresentam seletividade por áreas de reabsorção óssea e agem inibindo a ação dos osteoclastos. Em termos moleculares, um dos principais meios de ação dos BFs é a inibição da enzima farnesil difosfato sintase, causando uma série de alterações citoesqueléticas, reduzindo a capacidade de reabsorção óssea dos osteoclastos, induzindo a apoptose dessas células (LITTLE., 2003).

A incidência de OMB está entre 0,8 e 12 %, além que o risco é significativamente maior em pacientes recebendo BFs intravenosos, em comparação aos pacientes que a recebem por via oral (DURIE et al, 2005). Pacientes com câncer recebendo BFs intravenosos apresentavam de 2.7 a 4.2 vezes mais chance de desenvolver OMB quando comparados a pacientes com câncer que não recebiam BFs. Pacientes oncológicos tratados com BFs que se submetem a procedimentos cirúrgicos dentoalveolares têm de 5 a 21 vezes mais chance de desenvolver osteonecrose que pacientes que não sofrem intervenção cirúrgica dentoalveolar (RUGGIERO et al., 2009).

O maior acometimento de osteonecrose no osso mandibular em relação ao osso maxilar é devido à alta densidade óssea e menor vascularização desse osso (ROTHWELL., 1987). Segundo estudo realizado por Marx et al (2005), existe uma maior prevalência da OMB na mandíbula 68,1% e maxila 27,7%. Quanto a região mais acometida, 65,5% ocorre na

região posterior de mandíbula e 22,7% região posterior de maxila. Esses autores realizaram estudo com 119 pacientes, e em 25,2% dos casos a OMB apareceu espontaneamente, contudo, em 37,8% dos casos o fator desencadeante foi procedimento de exodontia de uma ou mais unidades dentárias, em 28,6% foi relacionado com periodontite, em 11,2% associado à cirurgia periodontal e em 3,4% a colocação de implantes dentários e cirurgias de canal radicular 0,8% (MARX et al., 2005).

O tratamento da OMB apresenta-se como uma condição desafiadora para os profissionais de saúde. Na literatura encontramos uma grande diversidade de possibilidades terapêuticas, bem como, antibióticoterapia, plasma rico em plaquetas, terapia com laser de baixa potência, terapia de oxigenação hiperbárica, ozônio terapia, pentoxifilina e tocoferol, debridamento ósseo e cirurgia. Entretanto, a eficácia dessas terapias e seu mecanismo de ação ainda não foram claramente estabelecidas (GUILHERME et al., 2018).

Rugguiero et al (2006) preconizam que o tratamento da OMB deva ser determinado individualmente com base na condição clínica. Nos pacientes com diagnóstico estabelecido de OMB, o principal objetivo é a eliminação da dor e o controle da infecção nos tecidos adjacentes, de modo a minimizar a progressão da doença. A equipe médica multidisciplinar e o paciente têm de avaliar os riscos e os benefícios da modificação do regime terapêutico ou da interrupção do tratamento com BFs, caso uma OMB seja estabelecida (RUGGUIERO et al., 2006).

O principal objetivo do manejo de pacientes nessa condição é a melhora na qualidade de vida, promovendo um controle da dor e infecção, atuando na prevenção do desenvolvimento de novas lesões e retardando o progresso da doença, promovendo uma completa cicatrização e reparação do defeito ósseo (VESCOVI et al., 2014)

O mecanismo de ação do BFs é pouco compreendido atualmente (BAGAN et al., 2005) contudo, há relatos sobre seu efeito antiangiogênico (FOURNIER et al., 2002). A angiogênese é um processo de desenvolvimento de novos vasos a partir de vasos preexistentes e constitui em uma resposta ao aumento da massa tecidual, ou a partir de alterações na tensão de oxigênio, ou ambas. Vários fatores de crescimento contribuem para a angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) onde a hipóxia é o indutor mais importante. Em adultos sob condições fisiológicas, a angiogênese só ocorre em situações específicas como reparo tecidual e consolidação de fraturas. A redução da proliferação e aumento de apoptose de células endoteliais foram observados em ratos sob ação dos bisfosfonatos, o que sugere que este medicamento inibe a angiogênese (FOURNIER et al., 2002).

A pentoxifilina, um derivado da Xantina, é um pó cristalino branco e cremoso. É livremente solúvel em clorofórmio, metanol, água e em etanol (EPSTEIN et al.,2010). Apresenta ação anti-inflamatória, reduzindo a expressão do fator de necrose tumoral α (anti-TNF- α), aumenta a flexibilidade do eritrócito, promovendo melhora no fluxo sanguíneo e aumentando a oxigenação para os tecidos, estimulando a vasodilatação, inibindo reações inflamatórias *in vivo*, fibroblastos dérmicos e aumentando a atividade de colagenase (DURIE.,2005).

Os tocoferóis são uma classe de compostos químicos orgânicos que consistem em vários fenóis metilados, muitos dos quais têm atividade de vitamina E. O tocoferol é um agente antioxidante que protege a membrana fosfolípídica do dano oxidativo por eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas durante o *stress* oxidativo, isto protege a membrana celular contra a peroxidação lípídica, promovendo a cicatrização normal de tecido endotelial lesionado (DELANIAN et al.,2003).

Epstein e colaboradores (2010) utilizando da pentoxifilina e tocoferol em seis pacientes com osteonecrose associada ao bifosfonato, observaram uma diminuição de 74% na área da exposição óssea, sendo acompanhados por cerca de 10 meses. Os autores demonstraram que a terapia com pentoxifilina e tocoferol pode representar uma alternativa terapêutica promissora para controle da osteonecrose associada ao bifosfonato. Dessa forma, o presente trabalho se propôs em avaliar a eficácia desses fármacos na OMB em ratos.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito preventivo da associação de dois fármacos, pentoxifilina e/ou tocoferol, no estabelecimento da quimioneecrose do osso mandibular induzida por ácido zoledrônico em mandíbula de ratos.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar análise do metabolismo ósseo através:
 - Da presença de infiltrado inflamatório; presença de tecido osteoide e de osteoclastos apoptóticos; contagem de lacunas vazias, osteócitos viáveis, em ratos submetidos à OMB tratados com pentoxifilina e/ou tocoferol.
- Análise Funcional do Tecido ósseo através das dosagens séricas de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), Cálcio (Ca), Fósforo (P), Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e estresse oxidativo em ratos submetidos à OMB e pré-tratados com pentoxifilina e/ou tocoferol.
- Análise da toxicidade hepática através das dosagens enzimáticas de ALT e AST em ratos submetidos à osteoquimioneecrose tratados com pentoxifilina e/ou tocoferol.
- Avaliar os efeitos oxidativos dos fármacos através da Glutaciona Reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA), nos órgãos (rim e fígado), em ratos submetidos à osteoquimioneecrose tratados com pentoxifilina e/ou tocoferol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Esse trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob o número de protocolo 48/2017 (Anexo A). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais, bem como o número de animais utilizados, de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e normas internacionais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy of Science, EUA, 1996*).

3.2 Animais

Foram utilizados 30 ratos wistar (*rattus norvegicus*), com massa corpórea de aproximadamente 180-200 gramas. Esses animais foram procedentes do biotério Central do campus do pici – Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos na sala de experimentação animal do departamento de fisiologia e farmacologia (DFF), onde foram mantidos em gaiolas apropriadas, com 4 animais em cada, sob temperatura variando de 22 a 24°C, com ciclos de 12 horas claro/escuro. Todos receberam ração comercial balanceada e água à vontade

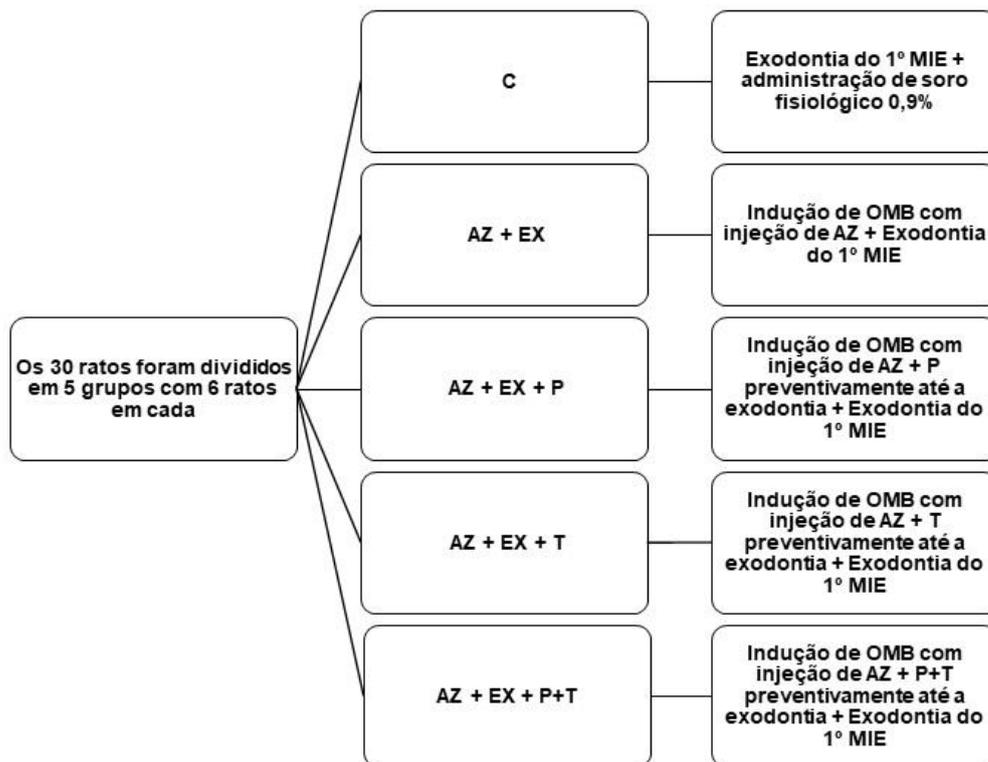
Os 30 animais foram divididos em 5 grupos experimentais onde o

- **Grupo Controle:** foi constituído por 6 ratos, onde, foi realizado procedimento cirúrgico de exodontia do 1º molar inferior esquerdo e administração de solução salina 0,9 % (1ml/kg, via EV).
- **Ácido Zoledrônico + Exodontia:** foi constituído por 6 ratos que foram submetidos ao modelo de indução da OMB com administração EV de ácido zoledrônico (0,2 mg/kg) e exodontia do 1º molar inferior esquerdo.
- **Acido Zoledrônico + Exodontia + Pentoxifilina – Profilático:** foi constituído por 6 ratos que foram submetidos ao modelo de indução OMB com injeção EV de ácido zoledrônico (0,2 mg/kg) e tratados preventivamente com pentoxifilina (15mg/kg/dia) por via intraperitoneal até 2 horas antes da exodontia do 1º molar inferior esquerdo.
- **Acido Zoledrônico + Exodontia + Tocoferol – Profilático:** grupo constituído por 6 ratos que foram submetidos ao modelo de indução OMB com injeção EV de ácido zoledrônico (0,2 mg/kg) e tratados preventivamente com tocoferol (5,5 mg/kg/dia) por via intraperitoneal até imediatamente antes da exodontia do 1º

molar inferior esquerdo.

- **Ácido Zoledrônico + Exodontia + Pentoxifilina e Tocoferol – Profilático:** foi constituído por 6 ratos que foram submetidos ao modelo de indução OMB com injeção EV de ácido zoledrônico (0,2 mg/kg) e tratados preventivamente com pentoxifilina (15mg/kg/dia) e tocoferol (5,5mg/kg/dia) por via intraperitoneal até imediatamente antes da exodontia do 1º molar inferior esquerdo.

Figura 1: Grupos experimentais



Fonte: Dados da pesquisa.

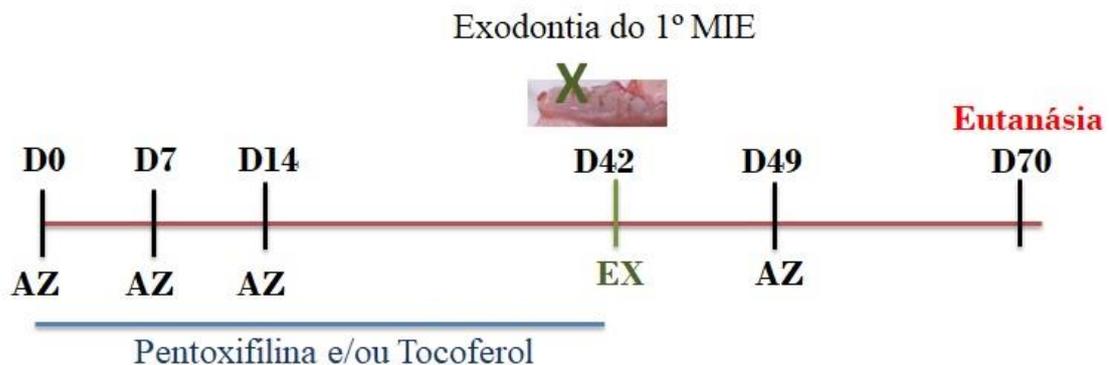
3.3 Modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB)

O protocolo usado para o experimento foi baseado em um modelo experimental adaptado de Sonis et al. (2009) e Maahs et al. (2011). A osteonecrose dos maxilares foi induzida por meio da administração EV de três doses semanais consecutivas de ácido zoledrônico na concentração de 0,2 mg/kg, nos dias 0, 7 e 14. Após quatro semanas (28 dias) da última administração do ácido zoledrônico (42º dia experimental), os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Uma semana depois do procedimento cirúrgico (dia 49), uma nova dose (0,2 mg/kg) do bisfosfonato foi administrada por via EV (SILVA et al., 2015).

3.4 Administração de Pentoxifilina e Tocoferol

Os animais receberam pentoxifilina (15mg/kg/dia; *i.p*) (SHIMIZU et al. 2000) e/ou tocoferol (5,5mg/kg/dia; *i.p*) (BESE et al. 2007), diluídos em 1,0ml de solução salina. Os animais foram submetidos ao modelo de indução OMB com ácido zoledrônico (0,2mg/kg; *e.v*). Os grupos receberam pentoxifilina e/ou tocoferol até 2 horas antes da exodontia do 1º molar inferior esquerdo.

Figura 2: Protocolo experimental simplificado.



Fonte: Dados da pesquisa.

O esquema representa o protocolo experimental de indução de OMB associado à administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol.

3.5 Análise histopatológica do osso alveolar

Após a eutanásia, as hemimandíbulas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10%, por 24 horas. A seguir, foram tratadas com EDTA tamponado a 10% por 60 dias, para a desmineralização, seguido de banho em água corrente por 24 horas. As peças foram armazenadas em álcool absoluto até sua inclusão em parafina. Foram feitos cortes seriados de 4 µm em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (HE). Foram selecionados e fotografados 5 campos de cada lâmina e realizada análise quantitativa de osteócitos viáveis e de lacunas vazias. A área de interesse para registro foi a partir da borda anterior do alvéolo do 1ºMIE e seguindo para posterior. As imagens foram lançadas no software ImageJ® e foi feita a contagem de osteócitos viáveis e lacunas vazias (JILKA., 2013). A análise qualitativa de osteoclastos com vacuolização intracitoplasmática (OVI) (PAZIANAS., 2010), deposição osteóide e infiltrado inflamatório foram feitas por um patologista experiente, desconhecedor dos grupos experimentais (SILVA., 2015), utilizando escores de 0-3 (0-ausente;1-leve;2-moderado e 3-intenso) para

presença de infiltrado inflamatório e 0 ou 1 (0-ausente; 1-presente) para deposição osteoide e OVI (Pinto et al.,2020).

3.6 Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO), Cálcio (ca) e Fósforo (P) Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

Durante a eutanásia foram coletados 2 ml de amostras de sangue a partir da veia caudal dos animais, que foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para avaliação da: FAO, um marcador de atividade osteoblástica, através de metodologia da inativação térmica (GOES et al., 2012); Ca e P como marcadores do metabolismo ósseo; e Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) para avaliar a toxicidades dos fármacos, seguindo as instruções do fabricante (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.7 Análise do estresse oxidativo

Após a eutanásia foram removidos o rim e o fígado, para ser avaliado os efeitos oxidativos dos fármacos, através da Glutathiona Reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA), nos órgãos (rim e fígado), em ratos submetidos à osteoquimionecrose tratados com pentoxifilina e/ou tocoferol.

3.8 Análise estatística e delineamento do estudo

Para os dados paramétricos, os resultados foram expressos como Média \pm Erro padrão da média (EPM). Nas comparações entre os grupos foi utilizado a Análise de Variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey.

Para os dados não paramétricos, os resultados obtidos serão expressos como mediana acompanhada de valores externos, e os testes estatísticos aplicados foram Kruskal-Wallis seguidos de Dunns. Em todas as situações, foram adotadas o nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

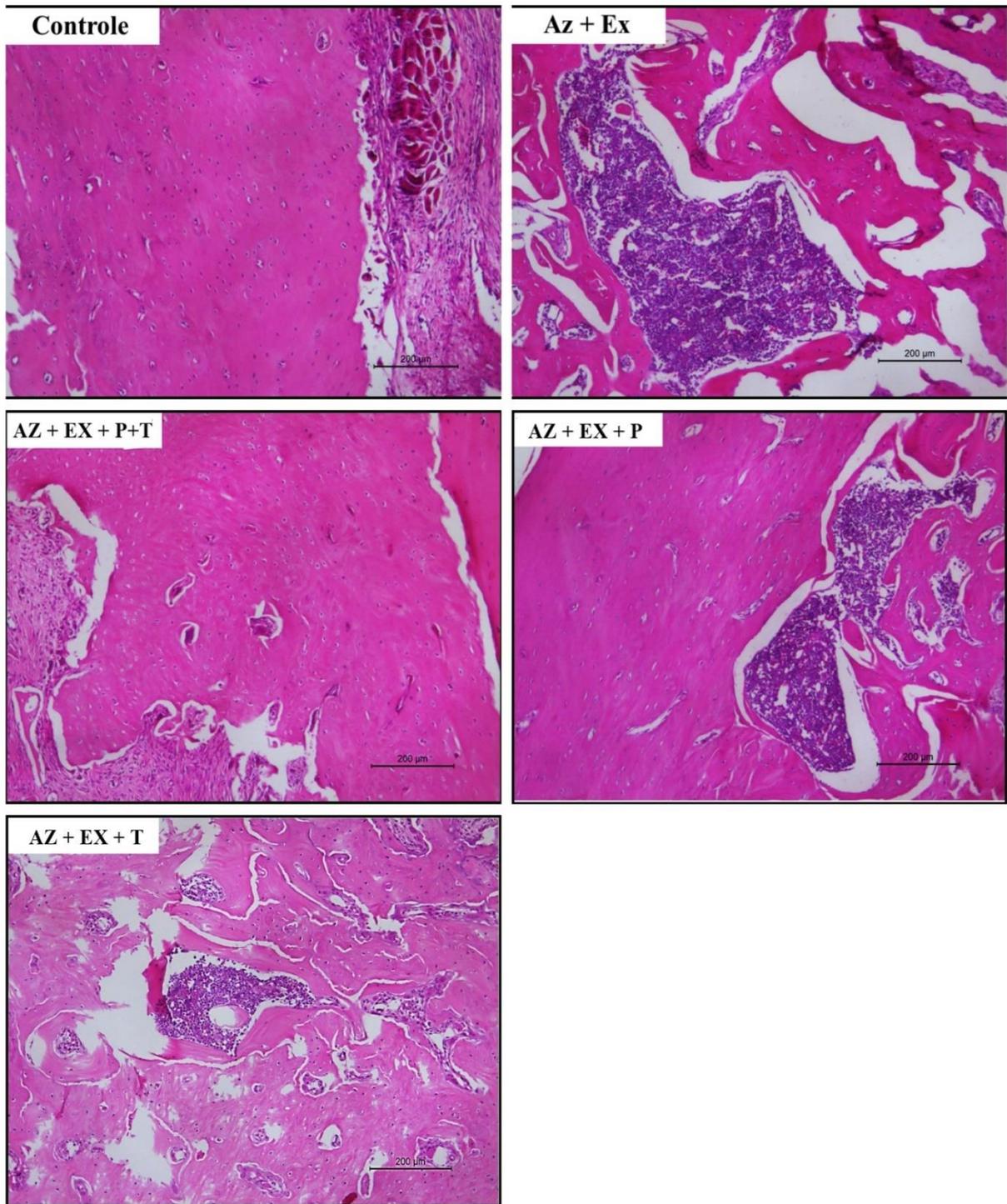
4.1 Análise histopatológica do osso alveolar de animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.

Na região da exodontia, foi observado na análise histopatológica dos animais do grupo controle presença de osso celularizado, além de eventuais focos inflamatórios residuais no osso alveolar (figura 3, Controle). O grupo AZ+EX apresentou no sítio da exodontia, osso mandibular com a presença de lacunas de osteócitos vazias, deposição osteóide, áreas de sequestro ósseo e de intenso infiltrado inflamatório (figura 3, AZ+EX). O grupo AZ+EX+P+T apresentou infiltrado inflamatório, entretanto, o osso apresentou-se celularizado e organizado (Figura 3; AZ+EX+P+T). Os grupos com OMB que receberam somente Pentoxifilina ou Tocoferol apresentaram infiltrado inflamatório, entretanto o grupo que recebeu somente Tocoferol apresentou menor presença de tecido osteoide e OVI (Figura 3; AZ+EX+P e AZ+EX+T)

Não houve diferença estatística na análise semiquantitativa de infiltrado inflamatório entre os grupos. Na análise de presença de deposição osteóide, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos AZ+EX versus Controle e AZ+EX+P versus Controle (Tabela 1).

Na análise de presença de OVI, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos AZ+EX, AZ+EX+P+T e AZ+EX+P quando comparados ao grupo Controle (Tabela 1).

Fig 3. Fotomicrografias do sítio de exodontia em animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

Sítio de exodontia após 28 dias do procedimento cirúrgico dos animais dos grupos experimentais. Controle= animais que receberam salina e realizaram exodontia do 1MIE; AZ+EX= animais que receberam Ácido Zoledrônico e que foram submetidos a exodontia do 1MIE; AZ+EX+ P+T = animais que receberam Ácido Zoledrônico, foram submetidos a exodontia do 1MIE e pré-tratados com Pentoxifilina e Tocoferol; AZ+EX+P= animais que receberam Ácido Zoledrônico, foram submetidos a exodontia do 1MIE e pré-tratados com Pentoxifilina; AZ+EX+ T= animais que receberam Ácido Zoledrônico, foram submetidos a exodontia do 1MIE e pré-tratados com Tocoferol.

Tabela 01: Parâmetros histológicos das mandíbulas de ratos

Parâmetros Histológicos da Mandíbula	Grupos Experimentais				
	Controle	AZ+EX	AZ+EX+P+T a, d	AZ+EX+P b, f	AZ+EX+T c, e, g
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	1.0 (0-1)	1.0 (0-2)	1.0 (0-2)	1.0 (1-1)	1.0 (0-1)
DEPOSIÇÃO OSTEOIDE	0.0 (0-0)	1.0 (0-1)*	0.5 (0-1)	1.0 (0-1)*	0.5 (0-1)
OVI	0.0 (0-0)	1.0 (1-1)*	1.0 (0-1)*	1.0 (1-1)*	0.5 (0-1)

Fonte: Dados da pesquisa

^a Control vs AZ+EX vs AZ+EX+P+T ^b Control vs AZ+EX vs AZ+EX+P . ^c Control vs AZ+EX vs AZ+EX+T.

^d AZ+EX+P+T vs AZ+EX ^e AZ+EX+T vs AZ+EX+P ^f AZ+EX+P vs AZ+EX+P+T ^g AZ+EX+T vs AZ+EX+P

* P-valor em relação ao controle.

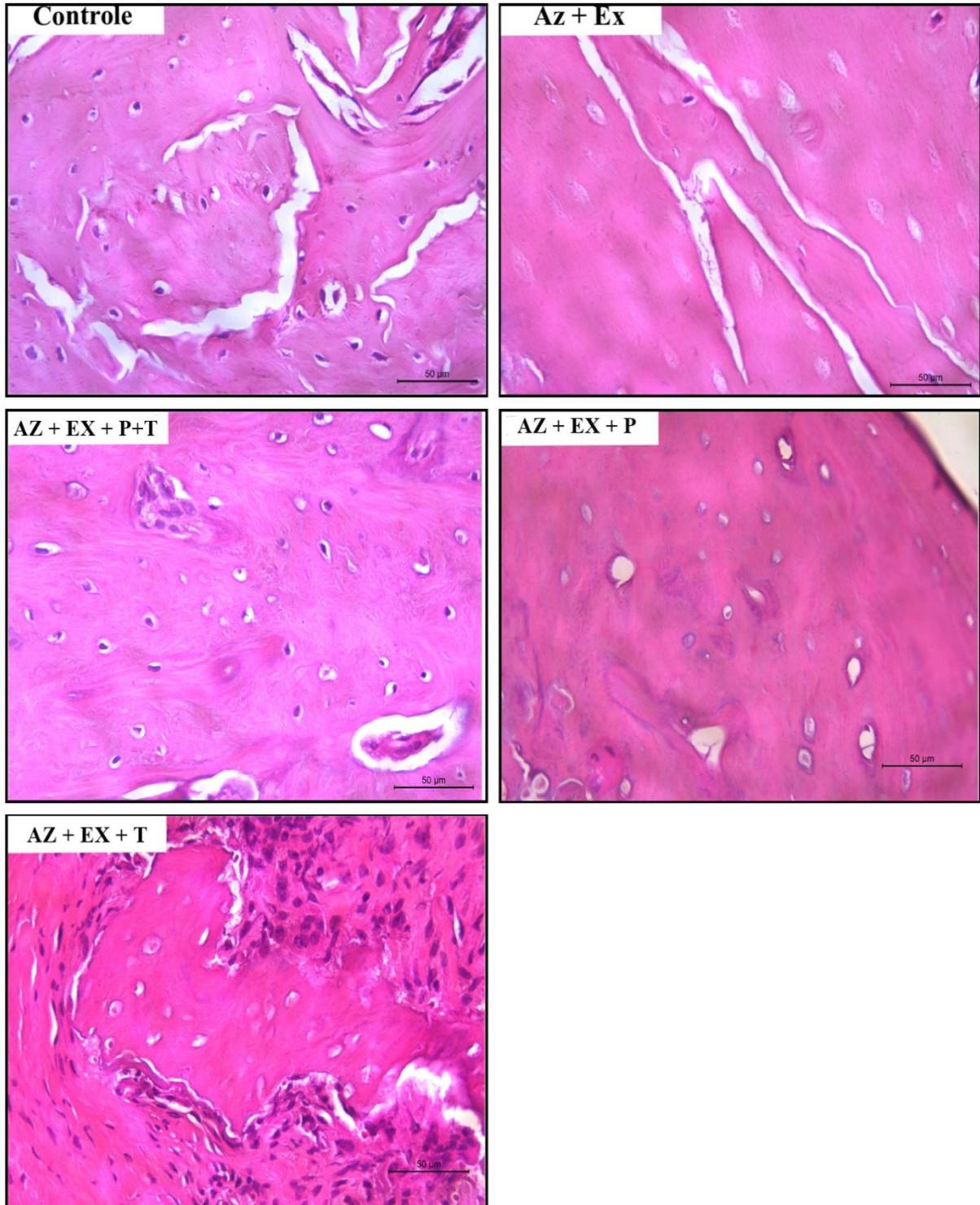
Na análise quantitativa da presença de osteócitos viáveis, foi observado que o grupo AZ+EX apresentou redução significativa dessas células quando comparadas aos grupos C (Controle; $p < 0,05$), e o grupo com OMB tratado com Pentoxifilina e Tocoferol ($p < 0,05$) (Fig 4 e Fig.5).

Não houve diferença estatística entre os grupos com OMB que receberam somente pentoxifilina ou tocoferol e o grupo que recebeu a associação das duas drogas. Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo C (Fig 5).

Foi observado um aumento do número de lacunas vazias no grupo de animais com OMB quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$), enquanto uma redução significativa foi observada no grupo de animais com OMB que recebeu Pentoxifilina e Tocoferol ou somente Pentoxifilina quando comparados ao grupo AZ+EX ($p < 0,05$) (Fig. 6).

Houve aumento significativo do número de lacunas vazias dos animais com OMB que foram tratados somente com pentoxifilina ou tocoferol quando comparados ao Controle ($p < 0,05$). Houve diferença significativa entre os grupos com OMB tratados com as duas drogas associadas e os grupos de animais que receberam pentoxifilina ou tocoferol ($p < 0,05$) (Fig. 6).

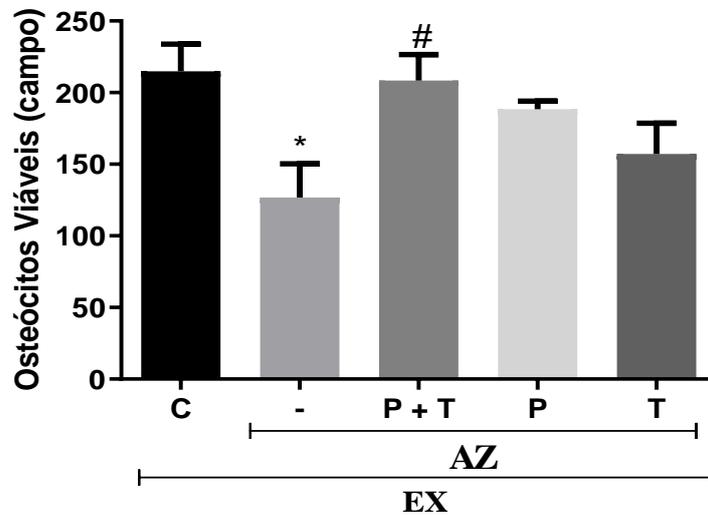
Fig. 4 Fotomicrografias do tecido ósseo para análise de número de osteócitos viáveis e de lacunas vazias nos grupos experimentais.



Fonte: Dados da pesquisa.

Sítio de exodontia após 28 dias do procedimento cirúrgico dos animais dos grupos experimentais. Controle= animais que receberam salina e realizaram exodontia do 1 MIE; AZ+EX= animais que receberam Ácido Zoledrônico e que foram submetidos a exodontia do 1MIE; AZ+EX+ P+T = animais que receberam Ácido Zoledrônico, foram submetidos a exodontia do 1MIE e tratados profilaticamente com Pentoxifilina e Tocoferol; AZ+EX+P= animais que receberam Ácido Zoledrônico, foram submetidos a exodontia do 1MIE e tratados profilaticamente com Pentoxifilina; AZ+EX+T= animais que receberam Ácido Zoledrônico, foram submetidos a exodontia do 1MIE e tratados profilaticamente com Pentoxifilina e Tocoferol.

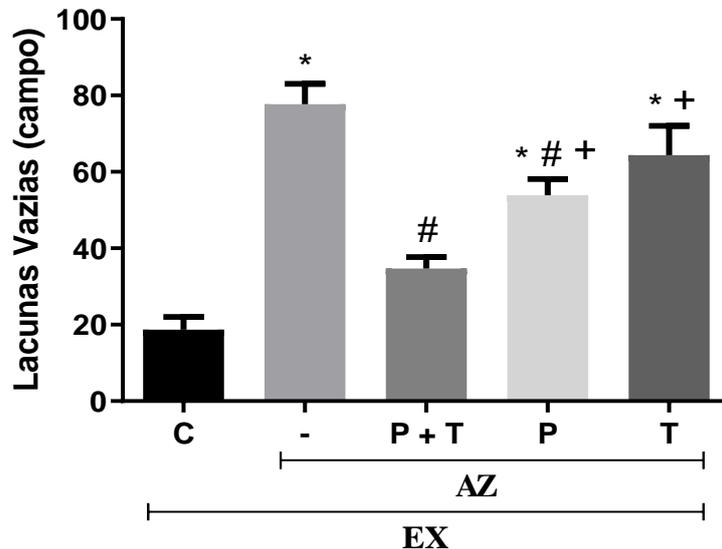
Fig. 5. Análise quantitativa do número de osteócitos viáveis em animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados representam a média \pm EPM e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido de Tukey. Foi observada redução do número de osteócitos viáveis no grupo de animais que recebeu AZ (0.2 mg/kg; e.v) e que foram submetidos a exodontia do 1MIE. O grupo de animais que recebeu P+T apresentou aumento significativo do número de osteócitos viáveis. * $p < 0.05$ vs grupo C; # $p < 0.05$ vs -. C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+ P+T; P= AZ+EX+ P; T= AZ+EX+T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

Fig. 6. Análise quantitativa do número de lacunas vazias em animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados representam a média \pm EPM e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido de Tukey. Foi observada aumento do número de lacunas vazias no grupo de animais que recebeu AZ (0.2 mg/kg; e.v) e que foram submetidos a exodontia do 1MIE. O grupo de animais que recebeu P+T ou somente P apresentou redução significativa do número de lacunas vazias quando comparado ao grupo -. * $p < 0.05$ vs grupo C; # $p < 0.05$ vs -; + $p < 0.05$ vs grupo AZ+EX+P+T. C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+ P+T; P= AZ+EX+ P; T= AZ+EX+ T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

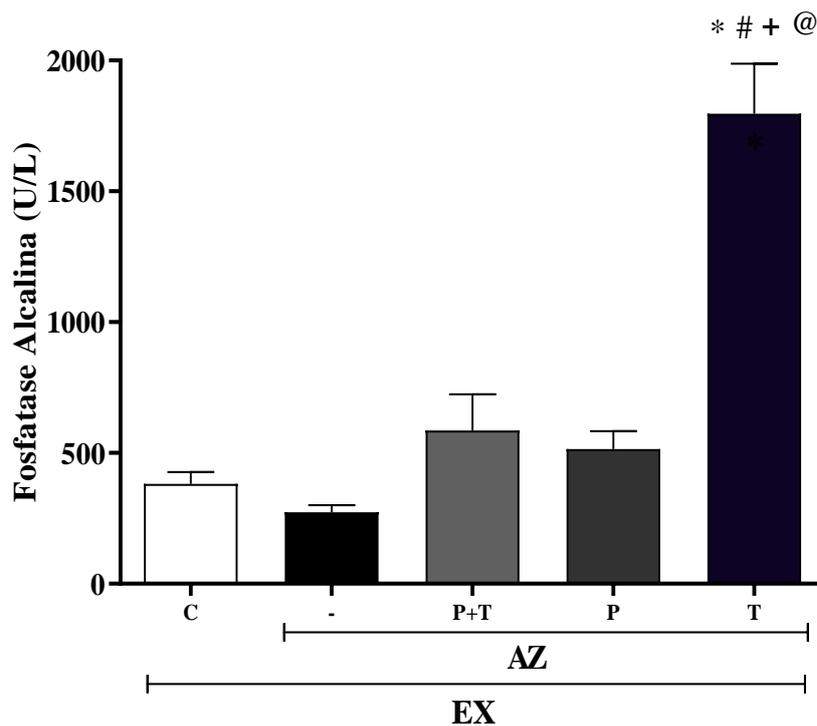
4.2 Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO), Cálcio (Ca) e Fósforo (P) Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

4.2.1 Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de Fosfatase Alcalina encontrada no modelo experimental de OMB induzida pela administração de Ácido Zoledrônico.

Foram observados maiores níveis de fosfatase alcalina no grupo de animais que recebeu somente tocoferol (T).

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos C e o grupo com OMB e nem entre estes e os grupos AZ+EX+P+T e AZ+EX+P ($p > 0.05$) (Fig 7).

Fig. 7 Análise dos níveis de Fosfatase Alcalina em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

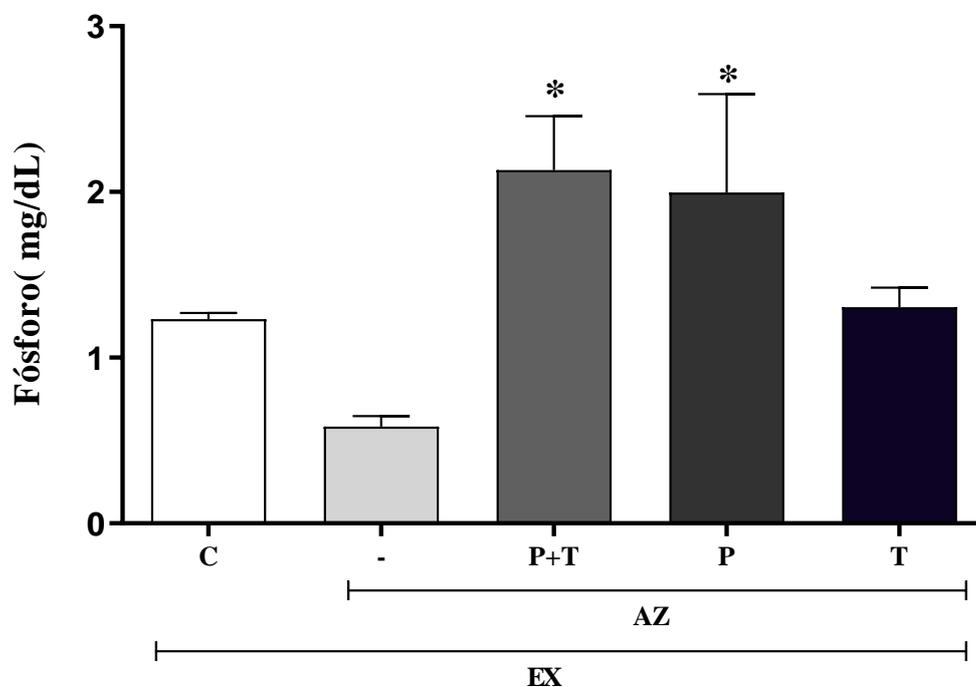
Os dados foram representados pela média \pm EPM e foram analisados por meio do teste One way ANOVA seguido do teste de Tukey. * $p < 0.05$ vs grupo C; # $p < 0.05$ vs -; + $p < 0.05$ vs P+T; @ $p < 0.05$ vs P. C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+P+T; P= AZ+EX+P; T= AZ+EX+ T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

4.2.2 Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de Fósforo no modelo de Quimionecrose por Ácido Zoledrônico

Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis séricos de fósforo entre os grupos C e EX+AZ (-). Os grupos com OMB que receberam Pentoxifilina e Tocoferol ou somente Pentoxifilina foram estatisticamente diferentes do grupo AZ+EX ($p < 0.05$) (Fig 8).

A administração isolada de tocoferol não apresentou diferença estatística quando comparada aos grupos C e AZ+EX (Fig 8).

Fig. 8 Análise dos níveis de Fósforo sérico em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

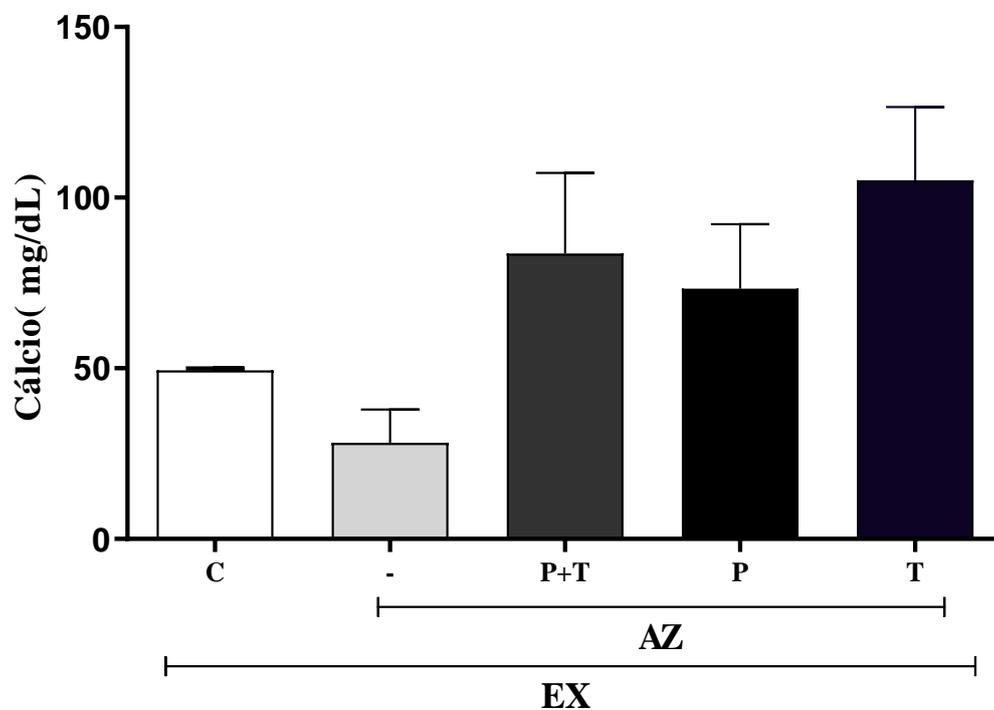
Os dados foram representados pela média \pm EPM e foram analisados por meio do teste One way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs grupo -. C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+ P+T; P= AZ+EX+ P; T= AZ+EX+ T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

4.2.3 Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis séricos de Cálcio em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol

Não foram observadas diferenças estatísticas quanto aos níveis de cálcio sérico entre os grupos analisados ($p>0.05$) (Fig 9).

Foi observada somente uma tendência a redução do cálcio, encontrado no plasma sanguíneo, no grupo AZ+EX quando comparada ao grupo C, assim como, uma tendência ao seu aumento nos grupos de animais que receberam Pentoxilina e/ou Tocoferol (Fig 9).

Fig. 9 Análise dos níveis de Cálcio sérico em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

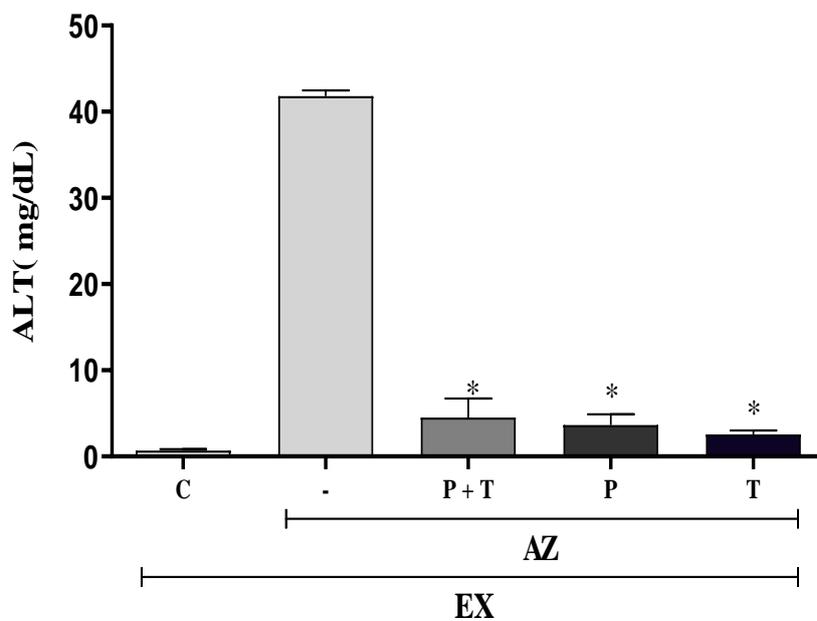
Os dados foram representados pela média \pm EPM e foram analisados por meio do teste One way ANOVA seguido do teste de Tukey. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p>0.05$). C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+P+T; P = AZ+EX+P; T= AZ+EX+T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

4.2.4 Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de ALT no modelo experimental de OMB induzida por Acido Zoledrônico

Foi observado aumento significativo dos níveis sanguíneos de ALT no grupo de animais com OMB quando comparado ao grupo C ($p < 0.05$). A administração de pentoxifilina e/ou tocoferol reduziram significativamente os níveis de ALT dos animais com OMB ($p < 0.05$) (Fig 10).

Não houve diferença estatística entre os animais do grupo C e os animais com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol ($p > 0.05$) (Fig 10).

Fig. 10 Análise dos níveis hepáticos de ALT em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



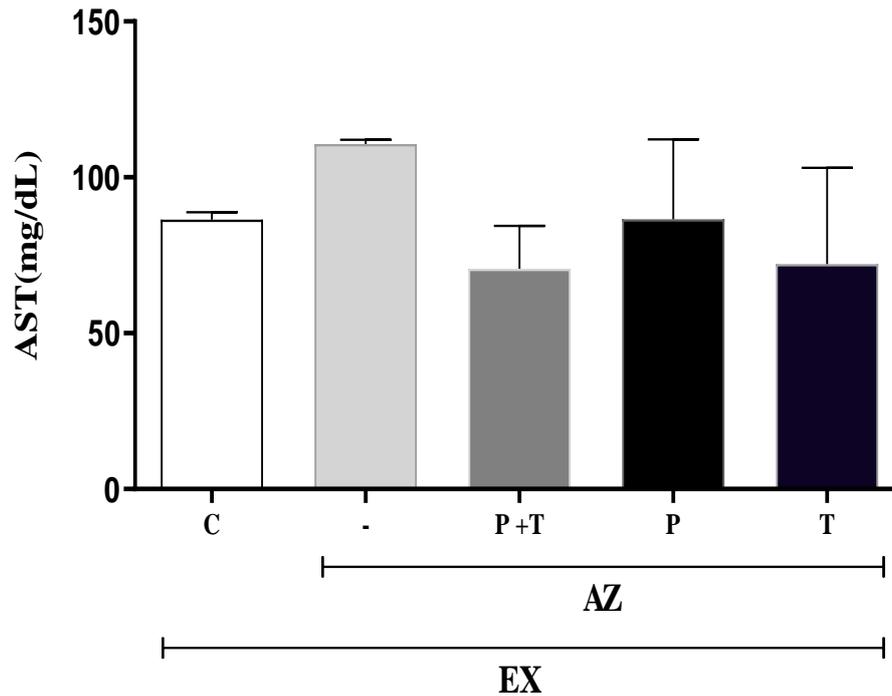
Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados foram representados pela média \pm EPM e foram analisados por meio do teste One way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. $*p < 0,05$ vs grupo -. C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+P+T; P= AZ+EX+ P; T= AZ+EX+ T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

4.2.5 Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de AST no modelo experimental de OMB induzida por Ácido Zoledrônico

Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis sanguíneos de AST entre os grupos C e os com OMB isoladamente ou que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol (Fig 11).

Fig. 11 Análise dos níveis hepáticos de AST em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e/ou Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

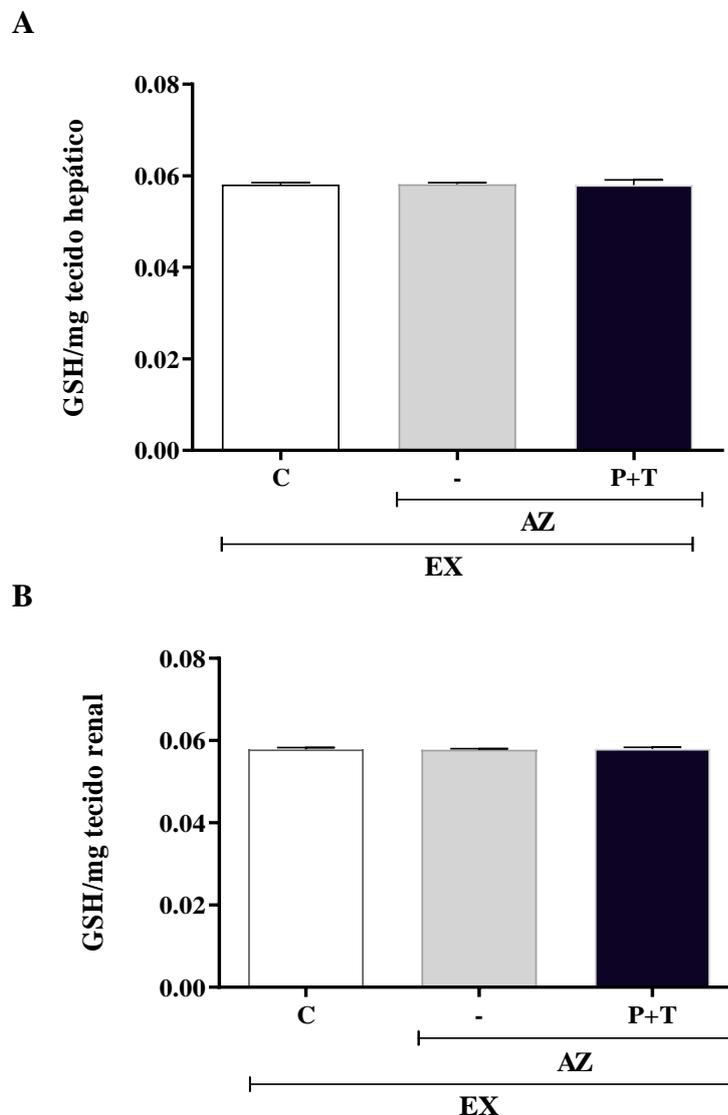
Os dados foram representados pela média \pm EPM e foram analisados por meio do teste One way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0.05$). C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+P+T; P= AZ+EX+P; T= AZ+EX+T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

4.3 Efeitos Oxidativos dos Fármacos

4.3.1 Efeito da administração de Pentoxifilina e/ou Tocoferol sobre os níveis de GSH nos tecidos hepático e renal no modelo experimental de OMB induzida por Ácido Zoledrônico.

Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de GSH nos tecidos hepático e renal entre os grupos analisados (Fig 12).

Fig. 12 Análise dos níveis teciduais hepático (A) e renal (B) de GSH em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

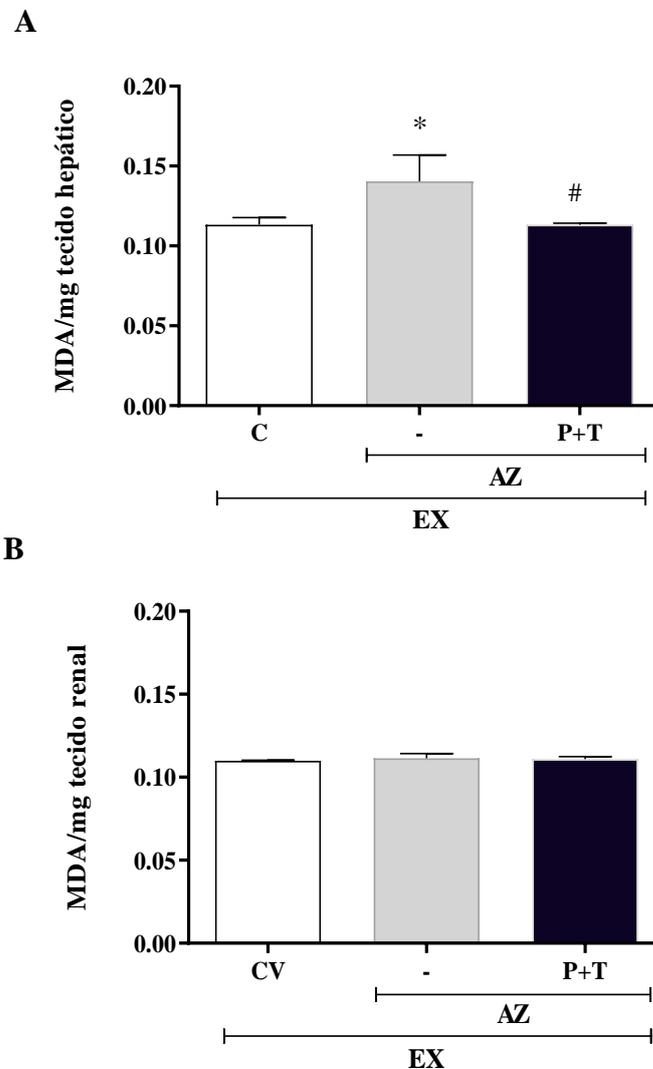
A. Dosagem de GSH no tecido hepático; B. Dosagem de GSH no tecido renal. Os dados foram representados pela média \pm EPM e foram analisados por meio do teste One way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0.05$). C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+ P+T; P= AZ+EX+ P; T= AZ+EX+ T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

4.3.2 Efeito da administração de Pentoxifilina e Tocoferol sobre os níveis de MDA nos tecidos hepático e renal no modelo experimental de OMB induzida por Ácido Zoledrônico

Foi observado aumento significativo nos níveis de MDA nos tecidos hepático de animais com OMB quando comparados ao Controle e a administração preventiva de pentoxifilina e tocoferol reduziram significativamente os níveis de MDA nos animais com OMB nesse mesmo tecido.

Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de MDA no tecido renal entre os grupos analisados ($p > 0.05$) (Fig 13).

Fig. 13 Análise dos níveis de MDA no fígado (A) e rim (B) em ratos com OMB que receberam Pentoxifilina e Tocoferol.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados das figuras A (níveis de MDA no fígado) e B (níveis de MDA no rim) foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$ vs grupo C; # $p < 0.05$ vs -. C= Controle; - = AZ+EX; P+T= AZ+EX+ P+T; P= AZ+EX+ P; T= AZ+EX+ T; AZ= Ácido Zoledrônico; EX= exodontia.

5 DISCUSSÃO

A terapia a base de Pentoxifilina e Tocoferol (P+T) é relatada com grandes taxas de sucesso no tratamento da osteorradionecrose (ORN) (DELANIAN et al., 2003; HAYASHI et al., 2015; ROBARD et al., 2014). Em um estudo prévio com 24 pacientes com ORN, o tratamento com P+T durante 6 meses, apresentou 60% de efetividade (DELANIAN et al., 2003). Em outro estudo clínico, com 18 pacientes portadores de ORN tratados com P+T, com tempo que variou de 6 a 24 meses, obtiveram taxa de sucesso de 89% (DELANIAN et al., 2005). Hayashi et al (2015) observaram uma taxa de cura de 85% no seu estudo com pacientes com ORN tratados com P+T e Robard et al (2014) constataram uma taxa de cura de 60% ao repetir o protocolo proposto por Delanian et al (2005). Com base nesses estudos a terapia com uso de P+T pode ser vista como uma possível terapia para o tratamento de OMB, pois estes medicamentos agem sinergicamente, apresentando ação antifibrótica potente, boa tolerância no organismo e são drogas que possuem baixo custo no mercado.

Um ensaio clínico conduzido por OWOSHO et al, onde ele tratou 7 pacientes com Pentoxifilina e Tocoferol por um período médio de 16 meses obteve cura de 2 pacientes e diminuição satisfatória dos outros 5 casos (OWOSHO et al., 2016). Um outro estudo com 6 pacientes positivos para OMB e tratados com Pentoxifilina e Tocoferol, experimentaram uma diminuição média de 74% na área do osso exposto, sem efeitos adversos (EPSTEIN et al., 2010). Além destes estudos, um outro tratou 1 paciente que fazia uso de ácido zoledrônico para tratamento de osteoporose, este paciente obteve recuperação óssea e cura da OMB (MAGREMANNE M. et al., 2014)

A pentoxifilina é apresentada como um pó cristalino branco, com boa solubilidade em água, foi comercializada inicialmente para tratamento de doenças vasculares. O tocoferol é apresentado na forma de acetato, sendo um líquido muito viscoso e oleoso, bastante hidrofóbico, este possui ação antioxidante e era usado para eliminar os radicais livres gerados durante estresse oxidativo e para proteger as membranas celulares contra peroxidação lipídica (DELANIAN et al., 2005; Lyons et al., 2008). Ambas as drogas possuem ação antifibróticas, atuando como agentes sinérgicos (Fan et al. 2014). Na OMB há destruição de células endoteliais sadias por EROs que são liberadas por radicais livres devido ao estresse oxidativo (Fan et al 2014). A administração de pentoxifilina e tocoferol diminui a fibrose superficial que ocorre na osteonecrose (ROBARD et al., 2014).

Marx et al (1983) observaram que na ORN há hipóxia, hipocelularidade e hipovascularidade tecidual (MARX., 1983), e a ação da Pentoxifilina promove a perfusão da

microcirculação e a melhora da fluidez sanguínea e o Tocoferol atua na eliminação de EROs produzidos no estresse oxidativo causado pela osteonecrose.

Uma das preocupações que surgiu durante o desenvolvimento da pesquisa foi a escolha da via de administração das drogas. Tanto a Pentoxifilina como o Tocoferol são encontrados comercialmente em sua forma oral, a qual possui outros componentes passíveis de influenciar o resultado na pesquisa. As capsulas gelatinosas moles de tocoferol são veiculadas em um bom volume de óleo de soja, para que sua administração seja possível com 400UI de vitamina E por cápsula. No caso da pentoxifilina, o comprimido é produzido para liberação prolongada, composto ainda por povidona, hipromelose, celulose microcristalina, estearato de magnésio, álcool polivinílico + dióxido de titânio + macrogol + talco, corante laca vermelho eritrosina como excipientes adicionais com 400mg de pentoxifilina por comprimido.

Dependendo da via de administração a ser utilizada, são necessárias diferentes doses de princípio, além de vantagens e desvantagens atreladas. Para via oral de administração, a dose costuma ser maior do que a utilizada na via injetável, devido questão de biodisponibilidade. Enquanto a biodisponibilidade de um medicamento, administrado por via injetável (intraperitoneal, endovenosa, intramuscular) é 100% ou próximo de 100%, indicando que todo o princípio ativo introduzido no organismo será aproveitado. A preferência pela administração dos dois ativos em um mesmo produto foi fundamental para redução do estresse na cobaia, risco de desenvolvimento de peritonite e redução do volume total de administração.

Em nossos resultados, verificamos que os tratamentos da OMB com as drogas Pentoxifilina e/ou Tocoferol não reduziram a presença de infiltrado inflamatório entre os sítios da mandíbula nos grupos experimentais. Esse mesmo achado foi constatado por Silva et al (2015), que realizaram estudo com ratos Wistar com OMB e que receberam previamente a exodontia anti-inflamatório esteroidal ou não-esteroidal.

No desenvolvimento da OMB é observado inibição da atividade osteoclástica, apoptose dos osteócitos e qualidade da deposição osteóide. Sabe-se da importância dos osteoclastos na remodelação óssea e na OMB, é observado vacuolização intracitoplasmática dos mesmos, o que leva a apoptose dessas células. Nossos resultados mostraram osteoclastos apoptóticos, o que caracteriza baixa remodelação óssea.

Os osteoclastos possuem papel importante na remodelação óssea. A vacuolização intracitoplasmática que ocorre nos osteoclastos geram apoptose dos mesmos. Por meio dos dados obtidos é possível observar que o grupo com indução de OMB e os pré-tratados com

pentoxifilina e tocoferol e apenas com Pentoxifilina apresentaram essas células em processo apoptótico, entretanto houve uma redução na deposição de tecido osteoide, quando as duas drogas foram administradas. Outro dado importante foi a maior presença de osteócitos viáveis na região do sítio da exodontia de animais com OMB e que receberam as duas drogas. Um estudo conduzido por Marx e Tursun (2012) mostrou que na OMB há presença de osso necrótico com lacunas de osteócitos vazias. Sendo assim, a presença de lacunas vazias é característica importante no diagnóstico histopatológico da OMB, e sua presença está relacionada a intensidade do processo inflamatório.

Ikebe (2013) sugeriu que o trauma da exodontia, associado ao processo inflamatório consequente ao ato operatório e o acúmulo de bifosfonatos nitrogenados no osso alveolar podem proibir a remodelação óssea, evitando a angiogênese e o recrutamento celular, bloqueando efetivamente a formação do tecido de granulação. A persistência da infecção bacteriana aumenta a osteonecrose, aumenta EROs e, devido ao desacoplamento entre os osteoclastos e os osteoblastos, o turnover é inibido. Finalmente, os bifosfonatos nitrogenados liberados previnem a proliferação de queratinócitos da mucosa, causando exposição de osso necrótico (IKEBE et al., 2013).

Para a investigação do funcionamento dos processos metabólicos ósseos, em nosso estudo foi realizada análise bioquímica. A FAO é um marcador sérico de processos colestásicos, sendo importante no diagnóstico das hepatopatias (Emanuelli., 2008). A FAO é uma enzima produzida predominantemente no fígado e no osso. No osso a FAO é produzida pelos Osteoblastos e sua quantificação tem por finalidade avaliar a atividade de remodelação óssea osteoblástica. Em nossos resultados, foi verificado que o grupo com OMB que recebeu pré-tratamento somente com Tocoferol apresentou maiores níveis sanguíneos de fosfatase alcalina.

Kurlu et al (2011) mostraram que coelhos submetidos a distração osteogênica tratados com alfa-tocoferol apresentaram aumento da formação de novo osso. Kasai et al (2015) mostraram que Ratos alimentados com alfa-tocoferol mostraram uma tendência para um aumento da massa óssea. Noguchi et al (2018) sugerem que baixas concentrações de alfa-tocoferol estimulam células mesenquimais da medula óssea.

O fósforo é um dos elementos mais essenciais para a vida, se encontra no corpo humano na porcentagem de 0,5 a 1,1 %. Já o cálcio é o mineral em maior quantidade no corpo humano, sendo encontrado na porcentagem de 1 a 2%. O fósforo possui várias funções reguladoras, auxiliando no metabolismo muscular e sistema nervoso, e combinado com o cálcio tem grande participação na formação óssea e dos dentes. O fósforo e o cálcio são

substratos que atuam na via RANK/RANKL/OPG durante o processo de remodelação óssea (MARTINS et al., 2008). Os dados dos resultados obtidos nos mostram que no grupo osteonecrose há uma significativa redução dos níveis de fósforo e uma tendência a redução nos níveis de cálcio sérico na OMB, e que somente os grupos com OMB que receberam Pentoxifilina (AZ+EX+P+T e AZ+EX+P) apresentaram maiores níveis de fosforo sérico. O aumento da disponibilidade de fósforo e cálcio disponíveis no plasma sanguíneo quando comparados com o grupo osteonecrose sugerem aumento da disponibilidade desses substratos, caracterizando uma provável reversão da diminuição dos níveis de fósforo e cálcio encontrados na OMB.

Análises enzimática de ALT e AST também foram mensuradas, para avaliar a toxicidade hepática das drogas. A ALT está presente em altas concentrações no citoplasma do fígado e é um importante biomarcador encontrado em lesões hepatocelulares (HENRY et al., 2008). Assim, considerando este biomarcador, foi observado que os animais com OMB apresentam maiores níveis sanguíneos de ALT e que o pré-tratamento com pentoxifilina e/ou tocoferol reduziram esses níveis, mostrando que as drogas isoladas e ou associação das mesmas, resultou em efeito hepatoprotetor.

Outro biomarcador mensurado foi o AST que é um importante biomarcador de dano hepatocelular, em altas concentrações, ele se concentra no citoplasma e nas mitocôndrias do fígado. Apesar de não termos observado diferenças entre os grupos, percebe-se a importância de que a associação das duas drogas não provocou aumento dos níveis dessa enzima.

Em muitos processos metabólicos do nosso corpo há geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Na inativação de um agente oxidante ocorre oxidação da Glutathione reduzida (GSH) em Glutathione oxidada (GSSG), diminuindo o nível de GSH presente na proteção celular. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (FERREIRA et al., 1997). A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, sendo armazenada nas células e consumida durante processos inflamatórios, devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio, tendo um papel de neutralizar tais agentes (Huber et al., 2008). Nesse estudo, observamos que o pré-tratamento com as duas drogas associadas, não provocou alterações nos níveis de GSH.

Além dos níveis de GSH os níveis de MDA também foram mensurados. A observação dos níveis de MDA são importantes, pois durante o processo inflamatório há o aumento nos níveis de MDA como produto final da peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo (GROTTO et al., 2008). O pré-tratamento com as duas drogas reduziu os níveis de MDA hepático.

Os resultados deste estudo revelaram que a terapia com P+T para o tratamento de OMB é promissora. O grupo que recebeu as duas drogas mostrou aumento da atividade de remodelação óssea, o que nos é sugerido pelo aumento de FAO presente e pelo aumento da disponibilidade de cálcio e fósforo que são altamente necessários para esse processo. Além disso, apresentou proteção dos danos hepáticos causados possivelmente pelo uso crônico de Bisfosfonatos.

4 CONCLUSÃO

O pré-tratamento com Pentoxifilina e Tocoferol no modelo experimental de OMB induzida pela administração crônica de ácido zoledrônico atua melhorando a condição óssea no sítio da exodontia, promovendo uma maior disponibilidade de osteócitos viáveis, diminuindo a presença de lacunas vazias e deposição de osteóides sem qualidade. Além disso, atua mantendo os níveis de FAO, P e Ca.

O tratamento atua reduzindo MDA hepático e mantendo os níveis de GSH hepático e renal.

5 REFERÊNCIAS

- 1 BESE N.S, MUNZUROGLU F, USLUY B, et al., **Vitamin E protects against the development of radiation-induced pulmonary fibrosis in rats.** Clin Oncol 19:260–264, 2007.
- 2 DELANIAN S. et al., **Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis.** Journal of Clinical Oncology, v. 21, n. 13, p. 2545-2550, 2003.
- 3 DELANIAN S., DEPONDT et al., **Major healing of refractory mandible osteoradionecrosis after treatment combining pentoxifylline and tocopherol: a phase II trial.** Head & neck, v. 27, n. 2, p. 114-123, 2005.
- 4 DURIE BGM, KATZ M, CROWLEY J. **Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates (Letter),** N. Engl J Med 353>99, 2005.
- 5 EMMANUELLI, M. P., LOPES, S. T., MACIEL, R. et al., **Concentração Sérica de fosfatase alcalina, gama glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos.** (Oryctolagus cuniculus). *Ciência Animal Brasileira*, 9(1), 251-255, 2008.
- 6 EPSTEIN M.S. et al., **Management of bisphosphonate-associated osteonecrosis: pentoxifylline and tocopherol in addition to antimicrobial therapy. An initial case series.** Oral Surgery, Oral medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v. 110, n. 5, p. 593-596, 2010.
- 7 FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira (1992), v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997
- 8 FOURNIER P, BOISSIER S, FILLEUR et al., **Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosteronestimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats.** Cancer Res 22: 6538-6544, 2002.
- 9 GEORGE EL, TRUESDELL SL, MAGYAR AL et al., **The effects of mechanically loaded osteocytes and inflammation on bone remodeling in a bisphosphonate-induced environment.** Bone. 127:460–473, 2019.
- 10 GOES P, MELO I.M, DUTRA C.S, et al., **V. Effect of alendronate on bonespecific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats.** Arch Oral Biol. v. 57, n. 11, p. 1537-1544, 2012.
- 11 GROTTTO D et al., **Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído.** Quím. Nova, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 275-279, 2008.

- 12 HAMADEH I.S, NGWA B.A, GONG Y. **Drug induced osteonecrosis of the jaw cancer treat.** 41(5):455-464, 2015.
- 13 HAYASHI M, PELLECCER M, CHUNG E, et al., **The efficacy of pentoxifylline/tocopherol combination in the treatment of osteoradionecrosis.** Spec Care Dentist. 35(6):268-71, 2015.
- 14 HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** 20 ed. Barueri, SP: Manoli, p. 1734, 2008.
- 15 HUBER PC, ALMEIDA, WANDA P et al., **Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.** Quím. Nova, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- 16 IKEBE, T et al., **Pathophysiology of BRONJ: drug-related osteoclastic disease of the jaw.** Oral Sci. Int., 10, pp. 1-8,2013.
- 17 KASAI S, ITO A, SHINDO K et al., **A suplementação de alta dose de α -tocopherol não induz perda óssea em ratos normais.** PLoS ONE 10 (7), 2015.
- 18 KIM SM, WOO KM, MYOUNG H et al., **Tissue engineering treatment in osteomyelitis of the jaws.** J Tissue Eng Regen, 11:1–16, 2014.
- 19 KURKUM M, YILDIZ C, KOSE O et al., **Effect of alpha-tocopherol on bone formation during.** 2011.
- 20 LITTLE DG, PEAT RA, MCEVOY et al., **Zoledronic acid treatment results in retention of femoral head structure after traumatic osteonecrosis in young Wistar rats.** J Bone Miner Res. Nov;18(11):2016-22, 2003.
- 21 LYONS A, GHAZALI N, **Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of its pathophysiology and treatment.** Br J Oral Maxillofac Surg 46:653–660, 2008.
- 22 MAAHS, M. P., AZAMBUJA, A. A., CAMPOS, MM et al., **Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats.** Head & Neck, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2011.
- 23 MAGREMANNE M, REYCHLER H. **Pentoxifylline and tocopherol in the treatment of yearly zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaw in a corticosteroid-induced osteoporosis.** J Oral Maxillofac Surg. 72(2):334-7 2014.
- 24 MARX R.E. **Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology.** J Oral
25 Maxillofac Surg 41(5):283–288, 1983.
- 26 MARX R.E. **Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic.** J Oral Maxillofac Surg 61:1115, 2003.

- 27 MARX R.E., SAWATARI Y, FORTIN M. et al., **Bisphosphonate induced exposed bone osteonecrosis of the jaw: Risk factors. Recognition, prevention and treatment.** J Oral Maxillofac Surg 63:1567, 2005.
- 28 MARX RE, TURSUN R. **Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: a blinded histopathologic comparison and its implications for the mechanism of each disease.** Int J Oral Maxillofac Surg. Mar;41(3):283-9, 2012.
- 29 OLIVEIRA MA, MARTINS FM, ASAHIDA et al., **Osteonecrose induzida por bisfosfonatos: relato de caso clínico e protocolo de atendimento.** Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 59(1):438, 2014.
- 30 OWOSHO AA, ESTILO CL, HURYN JM, et al., **Pentoxifylline and tocopherol in the management of cancer patients with medication-related osteonecrosis of the jaw: an observational retrospective study of initial case series.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Oct;122(4):455-9, 2016.
- 31 POUBEL, V, et al. **Osteonecrose maxilo-mandibular induzida por bisfosfonato: revisão bibliográfica.** *Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac.* [online]. vol.12, n.1, pp. 33-42, 2012.
- 32 RESZKA, AA., RODAN, GA. **Bisphosphonate Mechanism of Action.** Curr Rheumatol Rep 5, 65-74, 2003.
- 33 RIBEIRO, G H. et al., **Osteonecrosis of the jaws: a review and update in etiology and treatment.** Braz. j. otorhinolaryngol. São Paulo, v. 84, n. 1, p. 102-108, Jan, 2018.
- 34 ROBARD L, LOUIS MY, BLANCHARD D, et al., **Medical treatment of osteoradionecrosis of the mandible by PENTOCLO: preliminary results.** Eur Ann otorhinolaryngol Head Neck Dis. 131(6):333-8, 2014.
- 35 ROTHWELL BR. **Prevention and treatment of the orofacial complications of radiotherapy.** J Am Dent Assoc. Mar;114(3):316-22, 1987.
- 36 RUGGIERO SL, FANTASIA J, CARLSO E. **Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Oct;102(4):433-41, 2006.
- 37 RUGGIERO SL, DODSON TB, ASSAEL LA et al., **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update.** J Oral Maxillofac Surg. May;67(5 Suppl):2-12, 2009.

- 38 RUGGIERO S et al., **Practical guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with câncer.** J Oncol 2:7-14, 2014.
- 39 SHIMIZU N, WATANABE T, ARAKAWA T, et al. **Pentoxifylline accelerates gastric ulcer healing in rats: Roles of tumor necrosis factor alpha and neutrophils during the early phase of ulcer healing.** Digestion 61:157–164, 2000.
- 40 SILVA P. et al. **Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis.** Archives of Oral Biology, v. 60, p. 1237 – 1245, 2015.
- 41 SONIS S.T., WATKINS B. A., LYANG G. D et al., **Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients.** Oral Oncology, v. 45, n. 2, p. 164-72, 2009.
- 42 VESCOVI P, MERIGO E, MELETI M et al., **Conservative surgical management of stage I bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.** Int J Dent 8: ID107690, 2014.
- 43 YILDIZ M, KOSE O, YURTTAS Y, et al. **Effect of alpha-tocopherol on bone formation during distraction osteogenesis: a rabbit model.** J Orthop Traumatol. 2011.

ANEXO A – Aspectos éticos



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 “AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO EFEITO DA PENTOXIFILINA E TOCOFEROL NA QUIMIONECROSE INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM MANDÍBULAS DE RATOS”, protocolo 47/17, sob responsabilidade de Profa. Dra. Delane Viana Gondim, 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 nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 27 de junho de 2017.

Vigência do projeto	29/06/2017 à 28/12/2018
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de Animais	64
Peso	200 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UFC

Alexandre Havt Bindá

Fortaleza, 29 de junho de 2017

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 ALEXANDRE HAVT BINDÁ
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFCE - MATRÍCULA SUAPE: 188882