



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

JOSÉ VITOR MOTA LEMOS

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DIGOXINA NA OSTEONECROSE
DOS MAXILARES ASSOCIADA AO USO DE BISFOSFONATOS

FORTALEZA

2023

JOSÉ VITOR MOTA LEMOS

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DIGOXINA NA OSTEONECROSE DOS
MAXILARES ASSOCIADA AO USO DE BISFOSFONATOS

Dissertação de mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia. Área de
Concentração: Clínica Odontológica;
Área temática: Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio
de Barros Silva

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L577i Lemos, José Vitor Mota.

Influência do tratamento com digoxina na osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos / José Vitor Mota Lemos. – 2023.
60 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Interleucina-17. 2. Receptores do Ácido Retinoico. 3. Osteonecrose da Arcada Dentária Associada ao uso de Bisfosfonatos. 4. Digoxina. I. Título.

CDD 617.6

JOSÉ VITOR MOTA LEMOS

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DIGOXINA NA OSTEONECROSE DOS
MAXILARES ASSOCIADA AO USO DE BISFOSFONATOS

Dissertação de mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia. Área de
Concentração: Clínica Odontológica;
Área temática: Estomatopatologia.

Aprovada em 06/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Profa. Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

AGRADECIMENTOS

Essa conquista, eu agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, **Maria Rosicleide e Veridiano Lemos**, que investiram, acreditaram e abdicaram muito para que eu pudesse colher os frutos desse momento especial e trilhar o meu futuro.

Ao meu orientador, Professor **Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva**, que é meu pai, amigo e conselheiro. Obrigado pela trajetória que você me ajudou a construir desde o início da faculdade de odontologia, onde me incentivou a participar de monitorias, iniciações científicas e projetos de extensão. Lembrarei e serei sempre grato por cada oportunidade que você me deu.

À minha amada, **Joyce Ohana**, você continua sendo uma peça fundamental para o meu futuro. Sempre serei grato por tudo que você fez e faz por mim.

Aos professores do Laboratório de Patologia Bucodental, **Prof. Dra. Ana Paula, Prof. Dr. Fabrício Bitu, Prof. Dr. Mário Rogério e Profa. Dra. Karuza Alvez**, grandes líderes e pilares fundamentais para a minha pós-graduação.

Aos integrantes do Laboratório de Patologia Bucodental, pós-graduandos e acadêmicos de odontologia, que formam uma equipe excepcional e fundamental para a conclusão dessa jornada.

Aos meus amigos **Prof. Dr. Jiovanne Neri, Prof. Dr. André Mattos, Lara Rabelo e Mateus Araújo**, obrigado pelos momentos únicos que vocês proporcionam na minha vida.

Aos meus amigos do Grupo de Microscopia e Patologia, **Caio, Alexandre, Giuliana, André, Marcela, Felipe, Anna Clara, Larissa, Thaynara e Milena**.

Obrigado a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a conclusão do meu mestrado na **Universidade Federal do Ceará**, aos professores, funcionários de clínicas, funcionários do biotério, funcionários das secretarias, funcionários de serviços gerais e toda a equipe que compõe a UFC.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFC-PPGO (UFC)** e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

*“O que eu penso, não muda nada além do meu pensamento,
o que eu faço a partir disso, muda tudo!”*

(Leandro Karnal)

RESUMO

Introdução: A Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB) apresenta patogênese relacionada ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-17 (IL-17), produzida pela resposta imune Th17 mediada pelo ROR γ t. A digoxina apresenta capacidade de bloqueio do ROR γ t, podendo apresentar vantagens no processo de reparo ósseo em casos de OMB. **Objetivo:** Avaliar a influência do tratamento com digoxina na severidade da OMB em mandíbula de ratos tratados com ácido zoledrônico (AZ). **Materiais e Métodos:** 40 ratos machos Wistar foram divididos em grupo controle negativo (GCN) (0,1ml/kg de salina), um grupo controle positivo (GCP) (AZ, 0,20 mg/kg) e três grupos testes tratados com AZ 0,20 mg/kg e digoxina 1 (GTD1), 2 (GTD2) ou 4 (GTD4) mg/kg por gavagem a cada três dias do início do protocolo até a eutanásia. Após três administrações semanais consecutivas (dias 0, 7 e 14) do AZ (i.v.), foi realizada exodontia do 1º molar inferior esquerdo (dia 42), administração de dose adicional de AZ (dia 49) e eutanásia após 28 dias da exodontia (dia 70). Foram removidas as hemimandíbulas para análise radiográfica, histomorfométrica (contagem de células e lacunas de osteócitos vazias) e imuno-histoquímica (Caspase-3, c-Fos, c-Jun, FoxP3, IL-2, IL-6, IL-17, NF κ B, OPG, RANK, RANK-L, TGF- β , TNF- α), gengivas para western blotting (ROR γ t) e fêmur para ensaios mecânicos. Teste ANOVA/Bonferroni foram utilizados ($p < 0,05$, GraphPad Prism 5.0). **Resultados:** A digoxina reduziu a área radiolúcida sugestiva de OMB ($p < 0,001$), reduziu o número de células inflamatórias polimorfonucleares ($p < 0,001$) e mononucleares, lacunas de osteócitos inviáveis ($p < 0,001$), osteoclastos apoptóticos ($p < 0,001$) e a imunoexpressão de osteócitos positivos para Caspase-3 ($p = 0,021$). O tratamento com AZ aumentou a imunoexpressão de todos os marcadores, exceto c-Fos, e o tratamento dos tratados com digoxina reduziu a imunoexpressão de IL-17, TNF- α , IL-6, IL-2, FOXP3, c-Jun, NF- κ B ($p < 0,001$), além de TGF- β ($p = 0,009$), RANKL ($p = 0,035$) e OPG ($p = 0,034$). O AZ também aumentou a expressão de ROR γ t e a maior dose de digoxina reverteu completamente esse parâmetro ($p < 0,001$). Sistemicamente, a digoxina aumentou os escores de diarreia ($p = 0,028$), índices renal e cardíaco ($p < 0,001$) e melhorou no fêmur a carga máxima ($p = 0,013$), de escoamento ($p = 0,011$), rigidez ($p = 0,007$), tensão máxima ($p = 0,007$) e módulo flexural ($p = 0,006$). **Conclusão:** A digoxina atenuou a OMB induzida por AZ através da redução dos níveis do ROR γ t e redução de citocinas associadas à resposta Th17.

Palavras-chave: Interleucina-17; Receptores do Ácido Retinoico; Osteonecrose da Arcada Dentária Associada ao uso de Bisfosfonatos; Digoxina.

ABSTRACT

Background: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) has a pathogenesis related to increased levels of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-17 (IL-17), produced by the Th17 immune response mediated by ROR γ t. Digoxin has the ability to block ROR γ t and it may have advantages under the bone repair process in cases of BRONJ. **Purpose:** to evaluate the digoxin treatment influence on the BRONJ severity in the jaw of rats treated with zoledronic acid (ZA). **Materials and Methods:** 40 male Wistar rats were allocated into a negative control group (NCG) (0.1ml/kg of saline), a positive control group (PCG) (ZA, 0.20 mg/kg) and three other groups treated with ZA 0.20 mg/kg associated to digoxin 1 (DG1), 2 (DG2) or 4 (DG4) mg/kg which was administrated by gavage every three days from the protocol beginning until the euthanasia. After three consecutive weekly ZA intravenous administrations (days 0, 7 and 14), it was performed the extraction of the lower left first molar (day 42), a ZA additional dose administration (day 49) and the euthanasia 28 days after the extraction (day 70). The jaws were removed for radiographic, histomorphometric (counting of cells and empty osteocyte gaps) and immunohistochemical (Caspase-3, c-Fos, c-Jun, FoxP3, IL-2, IL-6, IL-17, NF κ B, OPG, RANK, RANK-L, TGF- β TNF- α) analysis, gums were removed for western blotting (ROR γ) and the femur for mechanical trials. ANOVA/Bonferroni tests were used ($p < 0.05$, GraphPad Prism 5.0). **Results:** the highest dose of digoxin increased diarrhea scores ($p = 0.028$) and its use increased the kidney and heart index ($p < 0.001$). In the femur, ZA increased maximum load ($p = 0.013$), leak load ($p = 0.011$), stiffness ($p = 0.007$), maximum tension ($p = 0.007$) and flexural modulus ($p = 0.006$). Digoxin has reduced the suggestive area of BRONJ ($p < 0.001$), as well as the number of polymorphonuclear cells, mononuclear cells, non-viable osteocytes and apoptotic osteoclasts ($p < 0.001$). The two highest doses of digoxin reduced the immunoexpression for caspase-3 positive osteocytes ($p = 0.021$). Digoxin also reduced the immunoexpression of IL-17, TNF- α , IL-6, IL-2, FOXP3, c-Jun, NF κ B ($p < 0.001$), in addition to TGF- β ($p = 0.009$), RANKL ($p = 0.035$) and OPG ($p = 0.034$). ZA increased ROR γ t expression (0.799 ± 0.107) and the highest dose of digoxin (0.567 ± 0.093) reduced this expression ($p < 0.001$). **Conclusion:** Digoxin attenuated ZA-induced OMB by reducing ROR γ t levels and reducing Th17-associated cytokines.

Keywords: Interleukin-17; Receptors, Retinoic Acid; Osteonecrosis of the Dental Arch Associated with the use of Bisphosphonates; Digoxin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Perfil radiográfico e análise imaginológica em animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratado com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 46
- Figura 2:** Perfil histológico, análise histomorfométrica e Imuno-histoquímico das células imunopositivas para Caspase-3 em animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratado com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 47
- Figura 3:** Perfil Imuno-histoquímico das células imunopositivas para IL-17, TNF- α , IL-6, TGF- β em animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratado com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 48
- Figura 4:** Perfil Imuno-histoquímico das células imunopositivas para IL-2 e FOXP3 em animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratado com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 49
- Figura 5:** Perfil Imuno-histoquímico das células imunopositivas para c-Jun, c-Fos e NFkB p65 em animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratado com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 50
- Figura 6:** Perfil Imuno-histoquímico das células imunopositivas para RANK, RANKL e OPG em animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratado com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 51
- Figura 7:** Perfil de expressão para ROR γ t na gengiva de recobrimento do sítio de exodontia de animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratados com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da dificuldade cirúrgica e toxicidade sistêmica em animais submetidos a modelo experimental de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico e tratados com digoxina, um inibidor de ROR γ t. Página 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação temporomandibular
AZ	Ácido zoledrônico
BF	Bisfosfonato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	5,5'-diaminobenzidina tetra-hidrocloroeto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GCN	Grupo controle negativo tratado com solução salina estéril (0,1ml/kg)
GCP	Grupo controle positivo tratado com AZ (0,20mg/kg)
GTD1	Grupo tratado com AZ (0,20mg/kg) e digoxina (1mg/kg)
GTD2	Grupo tratado com AZ (0,20mg/kg) e digoxina (2mg/kg)
GTD4	Grupo tratado com AZ (0,20mg/kg) e digoxina (4mg/kg)
HE	Hematoxilina e Eosina
i.p	intraperitoneal
i.v	intravenosa
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
INF-y	Interferon gama
JPEG	Joint Photographic Experts Group
MN	Mononucleares
NFkB	Fator nuclear kappa B
OMB	Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMN	Polimorfonucleares

PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RANK	Receptor ativador de fator nuclear-kB
RANKL	Ligante do receptor ativador de fator nuclear-kB
ROR γ t	Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	T helper 1
Th17	T helper 17
Th2	T helper 2
TMA	Tissue microarray
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente a tartarato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos	14
1.2. OMB e a Resposta imune Th17	16
1.3. Digoxina, um inibidor do fator de transcrição ROR γ t.....	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. HIPÓTSES.....	23
3.1. Hipótese Nula	23
3.2. Hipótese Alternativa	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo Geral.....	24
4.2. Objetivos Específicos	24
5. CAPÍTULO	25
5.1. Capítulo 1: Digoxin attenuates bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws by ROR γ t-dependent Th17 response	26
INTRODUÇÃO	28
MATERIAIS E MÉTODOS	30
Animais, grupos e doses	30
Protocolo experimental de OMB	30
Eutanásia e Coleta de Materiais	31
Análise Radiográfica Digital.....	31
Confecção de lâminas histológicas e estudo histomorfométrico	32
Tissue micro array e imuno-histoquímica para citocinas da resposta Th17 e ósseas	32
Westernblot para ROR γ t (Related Orphan Receptor gamma T)	33
Ensaio mecânico do fêmur	33
Análise estatística	34
RESULTADOS	35
O tratamento com digoxina melhorou os parâmetros ósseos locais e sistêmicos em ratos tratados com AZ	35
O tratamento com digoxina reduziu o infiltrado inflamatório e a apoptose de células ósseas	35
O tratamento com digoxina reduz mediadores inflamatórios associados à resposta Th17 e a IL-17	36
O tratamento com digoxina reduz mediadores reguladores da osteoclastogênese	37

<i>Digoxina reduziu a expressão do receptor RORγt</i>	37
<i>O tratamento com digoxina apresenta toxicidade sistêmica dose-dependente</i>	37
DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO GERAL	43
7. TABELAS.....	44
8. FIGURAS	46
9. REFERÊNCIAS	53
10. ANEXOS	59
<i>10.1. Anexo A: Segmento do regimento interno artigo 46</i>	59
<i>10.2. Anexo B: Aprovação do comitê de ética em pesquisa animal</i>	60