



UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARIANA VASCONCELOS GUIMARÃES

**A INFLUÊNCIA DO DIABETES EXPERIMENTAL E DA
METFORMINA NA EVOLUÇÃO DA OSTEONECROSE MANDIBULAR
INDUZIDA POR BISFOSFONATO EM RATOS**

FORTALEZA

2023

MARIANA VASCONCELOS GUIMARÃES

A INFLUÊNCIA DO DIABETES EXPERIMENTAL E DA METFORMINA
NA EVOLUÇÃO DA OSTEONECROSE MANDIBULAR INDUZIDA POR
BISFOSFONATO EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

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)

- G979i Guimaraes, Mariana Vasconcelos.
A influência do diabetes experimental e da metformina na evolução da osteonecrose mandibular induzida por bisfosfonato em ratos / Mariana Vasconcelos Guimaraes. – 2023.
121 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. Ácido zoledrônico; . 2. Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Difosfonatos; . 3. Metformina; . 4. Diabetes insípido. I. Título.

CDD 615.1

MARIANA VASCONCELOS GUIMARÃES

A INFLUÊNCIA DO DIABETES EXPERIMENTAL E DA METFORMINA
NA EVOLUÇÃO DA OSTEONECROSE MANDIBULAR INDUZIDA POR
BISFOSFONATO EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof Roberto Cesar Pereira Lima Júnior
Orientador

Profa Nylane Maria Nunes de Alencar

Profa. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Profa. Saulo Ellery Santos

Prof. Luiz Carlos Oliveira dos Santos

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo e à Maria por estarem sempre à frente providenciando tudo aquilo que eu não posso ter controle.

Ao meu tão desejado filho, Ariel Lucca, por ter me escolhido como sua mãe e me fazer entender que tudo é no tempo de Deus.

Ao meu marido, Júnior, pelo apoio e amor essenciais no dia a dia, acreditando em meu potencial mais que eu mesmo.

Aos meus pais, Carlos e Fátima, por não medirem esforços para meu sucesso no futuro e por acreditarem que o estudo muda vidas.

Às minhas irmãs, Tatiana e Lidiana, por estarem presentes em todas as fases da minha vida, sendo um apoio certo em todas as minhas dificuldades.

A toda minha família, representada por tias, primos, sobrinhos, sogros, cunhados, etc, por deixarem minha caminhada mais leve.

Às minhas amigas Andréa, Naara, Lília, Amanda, Vittoria, Karine Moura, Karine, Mariana, dentre outras, por me escutarem quando mais precisei e por me aproximarem de Deus.

Ao meu orientador, professor Roberto César, por ser exemplo de ser humano, por me confiar uma pesquisa tão intensa, por não me deixar desistir quando intercorrências surgiram e, principalmente, por mostrar que ser grande é desenvolver o melhor trabalho possível com humildade.

Ao professor Paulo Goberlânio e à professora Ana Paula Negreiros por me darem todo o suporte indispensável no desenvolvimento de protocolos experimentais e com tanta gentileza.

À professora Nylane pela doçura e delicadeza de sempre, e por ter me ajudado imensamente no desenvolvimento do estudo in vitro, tornando o mesmo possível.

À professora Vilma pelos quase 10 anos de orientação prévia ao doutorado e por ter contribuído intensamente para minha formação profissional.

Aos professores do Lafica, aqui representados especialmente pela profa Deysi Viviana, que sempre me tirou dúvidas de uma forma muito atenciosa.

À Aurilene Cajado, aluna de doutorado contemporânea, que foi o meu braço direito no desenvolvimento de estudos in vivo, nos cuidados com os animais, nas análises, sempre com muita presteza e vontade, me incentivando e me colocando para frente.

À Liviane Rabelo e a Felipe Sousa, os quais foram cruciais no desenvolvimento do trabalho com células, demonstrando competência e me fazendo aprender mais.

Aos alunos José Vitor, David, Jussara, Gisele, Isabelle, Fernanda e Vanessa, que me acompanharam em alguns momentos cruciais do meu estudo, sempre com muito cuidado e alegria, e com apoio ilimitado.

Aos veterinários do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Wesley e Augusto, bem como os técnicos Haroldo, Adauto e Moreira, os quais se preocupavam com meus animais quando eu não estava presente e que sempre me apoiaram quando eu necessitava de suas ajudas.

Aos alunos em geral do laboratório Lafica e de Farmacologia Bioquímica, ICs e pós graduandos, que estiveram presentes e me ajudaram com uma boa mão de obra, demonstrando sempre riso fácil.

Não menos importantes, aos animais que fizeram esse estudo possível.

A todos que, de alguma forma, se fizeram presentes e contribuíram para realização deste estudo.

Tenho-vos dito isto, para que em mim
tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas
tende bom ânimo, eu venci o mundo.

Jesus Cristo em João 16:33

A INFLUÊNCIA DO DIABETES EXPERIMENTAL E DA METFORMINA NA EVOLUÇÃO DA OSTEONECROSE MANDIBULAR INDUZIDA POR BISFOSFONATO EM RATOS

RESUMO

O ácido zoledrônico (AZ) tem frequente uso na terapêutica de alguns cânceres visando prevenir metástases ósseas. Contudo, este fármaco associa-se imensuravelmente à Osteonecrose mandibular (ONMB), interferindo na qualidade de vida dos pacientes. Considerando que a concentração de mediadores pró-inflamatórios e as condições de microcirculação local são fatores possivelmente envolvidos na patogênese da ONMB, nosso estudo avaliou a influência da inflamação causada pela hiperglicemia, que caracteriza o Diabetes Mellitus (DM), bem como da administração de metformina (MET), um fármaco com possíveis potenciais imunomoduladores, no perfil celular e na expressão de marcadores osteoclásticos e inflamatórios na ONMB induzida por AZ (0,2 mg/kg por via oral). Para isso, 50 ratos *Wistar* foram submetidos aos protocolos de indução de DM e/ou ONMB. Estes tiveram suas massas corpóreas e glicemias em jejum aferidas rotineiramente. Os animais tratados com MET receberam este fármaco (250 mg/kg) diariamente por gavagem. Após eutanásia, hemiarcadas mandibulares submetidas à exodontia e suas gengivas foram obtidas para as análises. Além disso, células RAW 264.7 foram incubadas com AZ e/ou MET para os testes de viabilidade celular e análise da expressão IL-1 β . A ONMB não causou alterações significantes na glicemia em jejum e na variação de massa corpórea dos animais. O protocolo de indução do DM foi satisfatório, pois induziu hiperglicemia de forma satisfatória, com discrepantes valores reduzidos de massa corpórea em comparação aos animais não diabéticos. O tratamento com MET induziu menores valores glicêmicos e de peso corporal em comparação aos grupos *Naive* e ONMB. No alveolo pós exodontia, a ONMB foi caracterizada aumento do número de lacunas vazias de osteócitos, da quantidade total de osteoclastos e de osteoclastos apoptóticos, da expressão de TRAP e de F4/80, bem como aumento no número total de leucócitos. Na avaliação inflamatória no tecido gengival, observou-se aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO). Na cultura celular, o tratamento com AZ aumentou a expressão de IL-1 β . O DM, por si, induziu osteonecrose e aumentou os parâmetros inflamatórios avaliados *in vivo*. Contudo, quando associado à ONMB, a hiperglicemia potencializou os efeitos inflamatórios, mas não ósseos, do AZ nos espécimes animais. O uso da MET reduziu a porcentagem de lacunas vazias de osteócitos e de OCs apoptóticos, sem influenciar no aumento compensatório de OCs, e intensificou a expressão de TRAP causada pelo AZ. Além disso, a MET reduziu tanto a expressão de F4/80 e o número de leucócitos no osso alveolar, como a atividade da MPO nas amostras gengivais de animais com ONMB. De fato, a MET também preveniu o aumento da expressão de IL-1 β causada pelo AZ *in vitro*. Assim, o DM potencializou os parâmetros inflamatórios da ONMB, sem influenciar significativamente no osso alveolar. Enquanto isso, o tratamento com MET amenizou a ONMB, com influências nas expressões de marcadores osteoclásticos. Sugere-se que tais efeitos provavelmente decorreram do potencial anti-inflamatório deste fármaco apresentado em nosso estudo.

Palavras chaves: Ácido zoledrônico; Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Difosfonatos; Metformina; Diabetes insípido.

THE INFLUENCE OF EXPERIMENTAL DIABETES AND METFORMIN ON THE EVOLUTION OF BISPHOSPHONATE-INDUCED MANDIBULAR OSTEONECROSIS IN RATS

ABSTRACT

Zoledronic acid (AZ) is frequently used in the treatment of some cancers to prevent bone metastases. However, this drug is immeasurably associated with mandibular osteonecrosis (BRONJ), interfering with quality of life of patients. Considering that the concentration of pro-inflammatory mediators and local microcirculation conditions are factors possibly involved in the pathogenesis of BRONJ, our study evaluated the influence of inflammation caused by hyperglycemia, which characterizes Diabetes Mellitus (DM), as well as the administration of metformin (MET), a drug with possible immunomodulatory potential, on the cellular profile and expression of osteoclastic and inflammatory markers in BRONJ induced by AZ (0.2 mg/kg orally). For this, 50 Wistar rats were subjected to DM and/or BRONJ induction protocols. They had their body mass and fasting blood glucose levels routinely measured. Animals treated with MET received this drug (250 mg/kg) daily by gavage. After euthanasia, mandibular arches subjected to extraction and their gums were obtained for analysis. Furthermore, RAW 264.7 cells were incubated with AZ and/or MET for cell viability tests and analysis of IL-1 β expression. BRONJ did not cause significant changes in fasting blood glucose or body mass variation in the animals. The DM induction protocol was satisfactory, as it induced hyperglycemia satisfactorily, with discrepant reduced values of body mass compared to non-diabetic animals. Treatment with MET induced lower glycemic and body weight values compared to the Naive and BRONJ groups. In the post-extraction socket, BRONJ was characterized by an increase in the number of empty osteocyte lacunae, the total number of osteoclasts and apoptotic osteoclasts, the expression of TRAP and F4/80, as well as an increase in the total number of leukocytes. In the inflammatory evaluation of the gingival tissue, an increase in myeloperoxidase activity (MPO) was observed. In cell culture, AZ treatment increased IL-1 β expression. DM, in itself, induced osteonecrosis and increased inflammatory parameters evaluated *in vivo*. However, when associated with BRONJ, hyperglycemia potentiated the inflammatory, but not bone, effects of AZ in animal specimens. The use of MET reduced the percentage of empty osteocyte lacunae and apoptotic OCs, without influencing the compensatory increase in OCs, and intensified the expression of TRAP caused by AZ. Furthermore, MET reduced both the expression of F4/80 and the number of leukocytes in alveolar bone, as well as MPO activity in gingival samples from animals with BRONJ. In fact, MET also prevented the increase in IL-1 β expression caused by AZ *in vitro*. Thus, DM potentiated the inflammatory parameters of BRONJ, without significantly influencing the alveolar bone. Meanwhile, MET treatment alleviated BRONJ, with influences on the expressions of osteoclastic markers. It is suggested that such effects probably resulted from the anti-inflammatory potential of this drug presented in our study.

Key words: Zoledronic acid; Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw; Metformin; Diabetes insipidus.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Tabela 1 Resumo dos grupos experimentais.
- Figura 1: Protocolo experimental de indução do DM e/ou ONMB
- Figura 2: Imagem representativa de osteoclastos considerados viáveis e apoptóticos no presente estudo.
- Figura 3: Glicemia em Jejum dos animais no decorrer do protocolo experimental.
- Figura 4: Variação de massa corpórea dos animais no decorrer do protocolo experimental.
- Figura 5: Fotografias de lâminas histológicas coradas em HE dos grupos *Naive*, ONMB, DM e DM+ONMB.
- Figura 6: Porcentagem de lacunas vazias de osteócitos nos grupos *Naive*, ONMB, DM e DM+ONMB.
- Figura 7: Fotografias de lâminas histológicas coradas em HE dos grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET.
- Figura 8: Porcentagem de lacunas vazias de osteócitos nos grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET.
- Figura 9: Efeitos dos protocolos experimentais de ONMB e DM no número de Osteoclastos para os grupos *Naive*, ONMB, DM e DM+ONMB.
- Figura 10: Efeitos dos protocolos experimentais de ONMB e DM no número de Osteoclastos para os grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET.
- Figura 11: Imagens representativas da expressão de TRAP por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB, DM, DM+ONMB.
- Figura 12: Efeito da indução da ONM e de DM na expressão de TRAP por imunofluorescência.
- Figura 13: Imagens representativas da expressão de TRAP por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET.
- Figura 14: Efeito da administração de MET na expressão de TRAP por imunofluorescência em animais com ONMB.
- Figura 15: Efeito da indução da ONM e de DM no número de leucócitos no tecido ósseo alveolar pós exodontia.
- Figura 16: Efeito da administração de MET no número de leucócitos no tecido ósseo alveolar pós exodontia, em animais com ONMB
- Figura 17: Porcentagem de polimorfonucleares e mononucleares no tecido ósseo alveolar pós exodontia.
- Figura 18: Imagens representativas da expressão de F4/80 por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB, DM, DM+ONMB.
- Figura 19: Efeito da indução da ONMB e de DM na expressão de F4/80 por imunofluorescência.

- Figura 20: Imagens representativas da expressão de F4/80 por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB, ONMB+MET.
- Figura 21: Efeito da administração de MET em animais *Naive* e submetidos à ONMB na expressão de F4/80 por imunofluorescência.
- Figura 22: Efeito da indução de ONMB e DM na atividade de MPO no tecido gengival.
- Figura 23: Efeito da indução de ONMB e administração de MET na atividade de MPO no tecido gengival.
- Figura 24: Efeito de diferentes concentrações do AZ na viabilidade de RAW 264.7.
- Figura 25: Efeito de diferentes concentrações de MET na viabilidade de RAW 264.7.
- Figura 26: Efeito do tratamento de AZ (10 uM) e/ou MET (4mM) na concentração de IL-1 β no sobrenadante de cultura celular RAW 2647.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OCs	Osteoclastos
OBs	Osteoblastos
BFs	Bisfosfonatos
ON	Osteonecrose
ONMB	Osteonecrose da arcada dentária associada ao uso de Bisfosfonatos
DM	Diabetes Mellitus
MET	Metformina
CFU-M	Monócito formador de colônia
M-CSF	Fator estimulador de colônias de monócitos
RANK-L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
TRAF6	Fator associado ao receptor de TNF
NFATc1	Fator Nuclear de Células T Ativadas 1
TNF	Fator de necrose tumoral
IL	Interleucina
IFN	Interferon
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
DC-STAMP	Proteína transmembrana específica de células dendríticas
BCL6	Linfoma de células B 6
BLIMP 1	Proteína de maturação induzida por linfócitos B 1
CSTK	Catepsina K
MMP	Metaloproteinase de matriz
TGF	Fator de crescimento transformador
BMP-2	Proteína morfogenética óssea-2
FGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
AZ	Ácido zoledrônico
FPP	Enzima farnesil pirofosfato sintetase
PAMPs	Padrão molecular Associado à Patógenos
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
HE	Hematoxilina – eosina
MPO	Mieloperoxidase
NET	Rede extracelular de neutrófilos

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
B	Beta
K	Kappa
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
g	Gramma
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
Ph	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	O Metabolismo ósseo: reguladores e marcadores	17
2.2.	Osteonecrose da arcada dentária associada ao uso de Bisfosfonatos (ONMB)	20
2.3.	Sobre os BFs e o processo da necrose óssea	22
2.4.	Diabetes Mellitus	26
2.5.	Metformina: um fármaco de múltiplos potenciais?	28
3.	JUSTIFICATIVA	30
4.	OBJETIVOS	32
4.1.	Objetivo Geral	32
4.2.	Objetivos Específicos	32
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1.	Seleção de animais	33
5.2.	Modelo experimental de indução da ONMB por BFs	33
5.3.	Protocolo experimental de indução da ONM por BFs	34
5.4.	Modelo experimental de indução do DM	34
5.5.	Protocolo experimental de indução do DM	35
5.6.	Abordagem Farmacológica: Metformina	36
5.7.	Grupos experimentais	36
5.8.	Análise da variação de massa corpórea e da glicemia em jejum	38
5.9.	Obtenção das amostras após eutanásia dos animais	38
5.10.	Procedimentos Histológicos	38
	<i>Avaliação histológica: análise do perfil celular</i>	38
	<i>Expressão de F4/80 e TRAP por Imunofluorescência</i>	40
5.11.	Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase no tecido gengival	41
5.12.	Cultivo das linhagens de Raw 264.	41
5.13.	Ensaio de toxicidade em Macrófagos murinos pelo método do Alamar Blue (Resazurina)	42
5.14.	Dosagem de IL-1 β no sobrenadante da cultura de células	42
5.15.	Análise estatística	43

5.16.	Aspectos éticos	43
6.	RESULTADOS	44
6.1.	Glicemia em jejum e variação de massa corpórea dos animais	44
6.2.	Análise de parâmetros ósseos no osso alveolar de espécimes mandibulares submetidos à exodontia	45
	<i>Lacunas de osteócitos</i>	45
	<i>Número de Osteoclastos</i>	47
	<i>Expressão de TRAP por imunofluorescência</i>	49
6.3.	Análise inflamatória no osso alveolar de espécimes mandibulares submetidos à exodontia	51
	<i>Número de células inflamatórias</i>	51
	<i>Expressão de F4-80 por imunofluorescência</i>	53
6.4.	Análise da atividade de MPO no tecido gengival adjacente à área de exodontia de espécimes mandibulares submetidos à exodontia	55
6.5.	Análise inflamatória em macrófagos <i>in vitro</i> tratados com AZ e/ou MET	56
	<i>Efeito do AZ e da MET na viabilidade celular em cultura de RAW 267.4</i>	57
	<i>Dosagem de IL-1β no sobrenadante da cultura de RAW 267.4</i>	58
7.	DISCUSSÃO	60
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
9.	CONCLUSÃO	71
10.	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICES	87
	Apêndice 1: Dados experimentais com inclusão dos grupos DM+MET e DM+ONMB+MET	87
	Apêndice 2: Artigo científico para publicação em BONE Journals & Books (IF 4.1)	90

1. INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo contínuo realizado na intenção de renovação da massa óssea e essencial à manutenção da homeostase, que envolve as atividades articuladas entre osteoclastos (OCs) e osteoblastos (OBs), células responsáveis pela reabsorção e formação de tecido ósseo, respectivamente (AMARASEKARA et al., 2018; DELAISSE et al., 2020; OMI & MISHINA, 2022). Qualquer fator que altere essa dinâmica interfere no saldo líquido final de todo processo e, de fato, distúrbios metabólicos ósseos, como osteoporose (AIT OUMGHAR, BARKAOUI & CHABRAND, 2020; OMI & MISHINA, 2022), ou doenças inflamatórias crônicas, como a periodontite e artrite reumatóide (DE MOLON et al., 2019; OMI & MISHINA, 2022), além de neoplasias ou metástases em tecido ósseo (MAURIZI & RUCCI, 2018), são doenças caracterizadas pelo aumento da atividade osteoclástica.

Nesse contexto, fármacos antirreabsortivos têm sido alvos de pesquisas científicas pelo potencial de inibição dos OCs (KHAN et al., 2015; ROSINI, BERTOLDI & FREDIANI, 2015; SINGH & GONEGANDLA, 2020). Dentre estes, destacam-se os Bisfosfonatos (BFs), análogos do pirofosfato endógeno, com substituição do átomo central de oxigênio por um átomo de carbono (FLEISCH, 2002). Entretanto, percebe-se que os mecanismos subjacentes aos potenciais terapêuticos dos BFs fazem com que tais fármacos também demonstrem efeitos adversos, sendo estes substancialmente representados pela osteonecrose (ON), especialmente nos ossos maxilo-mandibular, referindo-se ao termo Osteonecrose da arcada dentária associada ao uso de Bisfosfonatos (ONMB), o qual é comumente mencionado na literatura científica.

A ONMB é uma importante condição clínica representada por dor e exposição óssea, apresentando semelhanças à ON oriunda de osteomielite, irradiação ou, até mesmo, outras medicações antirreabsortivas (KHAN et al., 2015; ROSINI, BERTOLDI & FREDIANI, 2015; SINGH & GONEGANDLA, 2020). Além das alterações no metabolismo ósseo que estão envolvidas na etiologia da ONMB, observa-se uma importante associação da concentração local de mediadores pró-inflamatórios e da microcirculação tecidual no desenvolvimento e na gravidade clínica desta doença (MARX, 2003; KANEKO et al., 2018), de tal forma que condições inflamatórias crônicas ou o uso de fármacos anti-inflamatórios podem, eventualmente, interferir na sua patogênese.

Desta forma, Diabetes Mellitus (DM) e o fármaco Metformina (MET) nos chamam atenção. DM é uma doença caracterizada, de maneira clássica, pela

hiperglicemia, e que tem sido associada à exacerbação de processos inflamatórios crônicos e/ou de situações de hipóxia tecidual (LI et al., 2023; WADA & MAKINO, 2016). Enquanto isso, a MET, por sua vez, além de ser reconhecida especialmente por seu efeito antidiabético, sendo um dos fármacos mais utilizados mundialmente de forma crônica sem inferir efeitos adversos importantes (ANDRZEJEWSKI et al., 2014; BAHRAMBEIGI et al., 2019; THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019), paralelamente tem demonstrado capacidade de modular sinalizações intracelulares de diversos tipos de células, como OCs (BAHRAMBEIGI et al., 2019) e macrófagos (KRISTÓFI & ERIKSSON, 2021), bem como de apresentar potencial anticancerígeno (THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019) e anti-inflamatório (KRISTÓFI & ERIKSSON, 2021).

Com isso, o presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos, no tecido ósseo mandibular, após administração sistêmica crônica dos BFs associada à trauma ósseo, bem como analisar a influência do DM e os resultados do uso crônico de MET no desenvolvimento da ONMB.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Metabolismo ósseo: reguladores e marcadores

OCs são células de reabsorção óssea que pertencem à linhagem de monócitos/macrófagos e são produzidos através de um processo de diferenciação chamado osteoclastogênese. A primeira célula que aparece durante a osteoclastogênese é representada pelo monócito formador de colônia (CFU-M), um progenitor que reside na medula óssea e se origina de células pluripotentes do tronco hematopoiético. O CFU-M dá origem a precursores mais diferenciados chamados monoblastos, que por sua vez se diferenciam para monócitos (AMARASEKARA et al., 2018; KIM et al., 2020; OMI & MISHINA, 2022).

Essa fase inicial da osteoclastogênese também é chamada de diferenciação de monócitos ou monocitopoese. Após sua liberação na corrente sanguínea, os monócitos migram para o tecido ósseo e são transformados em OCs mononucleares, reconhecidos como macrófagos do tecido ósseo. Estas células tendem naturalmente a se fundir, formando OCs multinucleados. A diferença funcional entre OCs mononucleares e multinucleados não é exatamente clara, mas sabe-se que estes últimos são caracterizados

por uma capacidade mais pronunciada de induzir reabsorção óssea em comparação aos primeiros (AMARASEKARA et al., 2018; KIM et al., 2020; OMI & MISHINA, 2022).

O cumprimento correto da osteoclastogênese requer a presença de algumas importantes moléculas de sinalização. Uma delas é representada pelo fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF), produzido por OBs e células da medula óssea, exercendo um efeito de proliferação na fase pré-monócito inicial e um efeito de sobrevivência em todo o processo. Outra molécula muito importante é representada pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa b (RANK-L), sendo esta presente na superfície de inúmeros tipos celulares, incluindo OBs, linfócitos e fibroblastos, responsável pelo efeito de diferenciação que ocorre na fase pós-monócito tardia do processo e necessária para transformar monócitos em OCs (AIT OUMGHAR, BARKAOUI & CHABRAND, 2020; KIM et al., 2020; OMI & MISHINA, 2022).

A ligação do M-CSF ao seu receptor c-fms estimula a via relacionada à PI3k/Akt/mTOR, que culmina no favorecimento à atividade osteoclástica (YAVROPOULOU & YOVOS, 2008; AMARASEKARA et al., 2018). Já a via envolvendo a atividade de RANKL se inicia com a sua ligação ao receptor RANK, este presente na superfície de pré-osteoclastos. Tal ligação envolve primariamente a atuação de moléculas adaptadoras, como TRAF6, a ativação de MAPK e de NFκB, que induz a expressão de NFATc1, considerado o principal regulador da osteoclastogênese. É importante frisar que ambas as vias se relacionam, e não trabalham isoladas, havendo, inclusive, relatos de que o M-CSF induz a expressão de RANK e, assim, facilita a sinalização RANKL/RANK (YAVROPOULOU & YOVOS, 2008; AMARASEKARA et al., 2018; OMI & MISHINA, 2022).

Além do M-CSF e RANKL, inúmeras outras moléculas de sinalização, dentre elas aquelas classificadas na família de citocinas, regulam a diferenciação osteoclástica favorecendo ou inibindo o processo. De fato, osteoclastogênese também é influenciada por um fenômeno conhecido como polarização de macrófagos, em que os macrófagos podem sofrer ativação funcional inflamatória (M1) ou reparativa (M2), dependendo do contexto inflamatório representado pela presença de determinadas citocinas inflamatórias ou anti-inflamatórias locais. Nesse sentido, foi demonstrado que um aumento da razão M1/M2 favorece a diferenciação osteoclástica (AMARASEKARA et al., 2018).

Assim, com relação aos *Reguladores da Osteoclastogênese*, as citocinas osteoclastogênicas são representadas por citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-8 e outras interleucinas como IL-7, IL-

11, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-34. As citocinas anti-osteoclastogênicas são representadas por interferons (IFN) e interleucinas como IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-27 e IL-33. Enquanto isso, dentre os fatores químicos capazes de modular a osteoclastogênese, os mais importantes estão representados pelo aumento das concentrações extracelulares de H^+ (acidose) e Mg^{2+} , ambos capazes de potencializar notavelmente diferenciação osteoclástica (AMARASEKARA et al., 2018; KITAURA et al., 2020).

Já os considerados *Marcadores da Osteoclastogênese* são aqueles responsáveis pela aquisição de todas as propriedades fenotípicas e funcionais típicas dos OCs. Mais precisamente, o DC-STAMP medeia a fusão celular, e, portanto, a formação de OCs multinucleados. Enquanto isso, NFATc1, conforme mencionado anteriormente, é considerado gene ativador da atividade osteoclástica, ao passo que linfoma de células B 6 (BCL6) e proteína de maturação induzida por linfócitos B 1 (Blimp1) são considerados genes supressores da mesma (AMARASEKARA et al., 2018; MIYAMOTO, 2011). Já as moléculas H^+ , ATPase e TRAP são responsáveis pela degradação do componente mineral (inorgânico) do osso, e juntamente com CSTK e MMP-9, que são responsáveis pela degradação do componente proteico (orgânico) do osso, representam a atividade dos OCS (AMARASEKARA et al., 2018).

Por outro lado, os OBs são células de linhagem mesenquimal que residem no tecido ósseo onde orquestram a função de OCs. Desta forma, a interação entre OCs e OBs é regulada por uma complexa rede de estímulos e bem organizada: os OBs produzem ou expressam ligantes que se ligam a receptores em pré-osteoclastos e estimular a osteoclastogênese, conforme dito anteriormente. Contrariamente, os próprios OBs também produzem osteoprotegerina (OPG), uma proteína solúvel presente no plasma que tem alta afinidade por RANKL, impedindo a ligação deste ao receptor RANK e, portanto, paralisando o processo de diferenciação osteoclástica (OMI & MISHINA, 2022).

Atuando de uma maneira organizada, OCs e OBs participam do ciclo de remodelação óssea, substituindo continuamente o osso velho e danificado por um novo e saudável, o que ocorre no reparo ósseo, reconhecido amplamente como *turnover* ósseo. Esta atividade é dividida em etapas. O primeiro passo é caracterizado pela atividade proeminente dos OCS, levando à reabsorção óssea, culminando na formação de uma lacuna de reabsorção óssea primária. Em seguida, ocorre a fase reversa do ciclo de remodelação óssea (KENKRE & BASSETT, 2018; KIM et al., 2020). Nesta, células osteoprogenitoras povoam a superfície de reversão, onde, na evolução do processo, verifica-se alterações fenotípicas e de densidade da população celular, partindo da

predominância de um fenótipo pró-reabsortivo para um pró-osteogênico, até se atingir um limiar de densidade celular permissivo para a formação óssea (DELAISSE et al., 2020). Este é um momento chave do processo mediado por quimiotaxia.

A saber, moléculas osteoclastogênicas, como osteopontina (LUUKKONEN et al., 2019), são secretadas por OCs na lacuna de reabsorção e funcionam como quimioatrativas para células osteoprogenitoras. Inclusive, a própria superfície erodida após a atividade reabsortiva osteoclástica, contendo colágeno desmineralizado (ABDELGAWAD et al., 2014; DELAISSE et al., 2020), é importante no início dessa atração quimiotática, sendo a principal responsável pela expansão da densidade celular. Adicionalmente, fatores não osteoclastogênicos oriundos da matriz óssea, como efrinas, fator de crescimento transformador (TGF) e proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) são importantes na maturação das células osteoprogenitoras em OBs e na produção da matriz óssea (DELAISSE et al., 2020; OMI & MISHINA, 2022).

Vários distúrbios ósseos podem ser caracterizados por alterações no equilíbrio das atividades de OCs e OBs. Por exemplo, as doenças metabólicas osteoporose e a doença de Paget ou o câncer ósseo, decorrente de metástase e mieloma múltiplo neoplásico, são favorecidos por um mecanismo de supra-ativação osteoclástica, levando a uma condição de aumento deste *turnover ósseo* (AIT OUMGHAR, BARKAOUI & CHABRAND, 2020). Além disso, em doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide e periodontite, também se verifica um desvio do equilíbrio orquestrado do *turnover ósseo* em favor da reabsorção óssea (DE MOLON et al., 2019). Nestas patologias, o aumento de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, induz direta ou indiretamente a osteoclastogênese, seja por ligação destes em receptores localizados na superfície de osteoclastos ou através do aumento da razão RANKL/OPG (DE MOLON et al., 2019; AIT OUMGHAR, BARKAOUI & CHABRAND, 2020; KITAURA et al., 2020). Nestas circunstâncias, a inibição da diferenciação dos OCs pode ser considerada uma ferramenta poderosa para curar essas doenças.

Os fármacos utilizados para inibir a atividade dos OCs são definidos como agentes antirreabsortivos devido à capacidade de contrastar a reabsorção óssea. Entre os medicamentos, consideramos que os mais importantes, utilizados e debatidos na literatura científica são representados por BFs.

2.2. Osteonecrose da arcada dentária associada ao uso de Bisfosfonatos (ONMB)

O osso alveolar dos maxilares, que sofre ossificação especialmente intramembranosa, apresenta características morfológicas e funcionais únicas em comparação a outros ossos de ossificação endocondral, além de reter os dentes através de fibras periodontais do ligamento periodontal, sendo constantemente submetido a tensões com forças oclusais mastigatórias, havendo uma alta demanda de renovação óssea. Assim, o osso alveolar dos maxilares tem maior captação de BFs e o fármaco se acumula em maior concentração (SINGH & GONEGANDLA, 2020; OMI & MISHINA, 2022). De fato, o osso mandibular é um dos ossos em que mais frequentemente ocorre a ON associada ao uso de BFs, especialmente após trauma ou injúria óssea, provavelmente em decorrência de seu alto *turnover* ósseo e do reduzido grau de porosidade.

Desde o ano de 2003, vários casos têm sido descritos associando a ocorrência da ON ao uso de BFs, e tal efeito adverso, por suas importantes sequelas, tem sido estudado frequentemente (MARX, 2003). A saber, a ONMB é uma condição caracterizada clinicamente por dor intensa e necrose seguida de exposição óssea do osso maxilo-mandibular, em pacientes fazendo uso de BFs com tempo indeterminado pós-administração. Uma das mais importantes características desta condição está relacionada à ampla meia vida dos BFs, em decorrência de sua alta afinidade pelos íons de cálcio e a uma recaptção constante por novos OCs. Nesse contexto, mesmo que o paciente interrompa seu uso, o risco de desenvolvimento de ON permanece, sendo praticamente irreversível (SINGH & GONEGANDLA, 2020). Entretanto, alguns elementos devem ser levados em consideração para avaliar o risco do desenvolvimento de ONMB em paciente que fez ou faz o uso de BFs, como por exemplo, o tipo de BFs, que influencia na via de administração, bem como a duração do tratamento, a presença de comorbidades, de doenças inflamatórias pré-existentes, dentre outros fatores de risco (ROSINI, BERTOLDI & FREDIANI, 2015).

Assim, apesar das vantagens terapêuticas relacionadas ao uso de BFs mencionadas anteriormente, os próprios mecanismos subjacentes ao efeito antirreabsortivo fazem com que os mesmos demonstrem efeitos adversos, estes representados especialmente pela indução da ONMB. Considerando o contexto estruturado e em cascata do processo de remodelação óssea e que a formação da lacuna de reabsorção óssea primária é o passo inicial e primordial do *turnover* ósseo, qualquer fator que influencie na ativação e sobrevivência dos OCs poderá interferir no resultado deste processo, de forma que a inibição de OCs, provocada pelos BFs, pode intervir

negativamente no processo fisiológico da remodelação e conseqüentemente no reparo ósseo após dano ou trauma.

Adicionalmente, a literatura tem relatado o potencial antiangiogênico de BFs, como a capacidade do zoledronato em inibir, *in vitro*, a proliferação de células endoteliais humanas, o fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (WOOD et al., 2002). Em modelos animais de implantes subcutâneos impregnados com FGF, o zoledronato também interferiu com a angiogênese local após administração endovenosa (WOOD et al., 2002). Tal propriedade antiangiogênica, por sua vez, pode ser útil no tratamento de doenças ósseas malignas, prevenindo metástases (SCAVELLI et al., 2007), porém aumenta ainda mais o risco ao desenvolvimento de ON, uma vez que está associada à redução de suprimento sanguíneo ao tecido ósseo (AGHALOO, HAZBOUN & TETRADIS, 2015; GONG et al., 2017).

Atualmente, não existe uma abordagem terapêutica ou, até mesmo, paliativa mediante um quadro de ONMB. Para pacientes que fazem o uso crônico oral, como é o caso de pacientes osteoporóticos, por menos de três anos após a última administração de BFs e sem fatores de risco particulares, a possibilidade de desenvolvimento de uma ONMB é baixa, considerando-se uma higiene bucal adequada e tomada de hábitos preventivos (ROSINI, BERTOLDI & FREDIANI, 2015). Já para os pacientes que fizeram uso endovenoso destes fármacos, como é o caso daqueles que se submetem à terapia contra o câncer, o risco permanece de forma indeterminada e, neste caso, previamente ao tratamento anticâncer, recomenda-se a adequação bucal do paciente.

2.3. Sobre os BFs e o processo da necrose óssea

BFs são fármacos análogos do pirofosfato endógeno e são assim chamados por possuírem, em sua estrutura, dois fosfonatos. A diferença química é que a ponte de oxigênio (O) entre os grupos fosfatos (P) é substituída por carbono (C) nestes fármacos. Interessantemente, os BFs surgiram há mais de um século e foram usados inicialmente na intenção de prevenir incrustações de carbonato de cálcio em diversos setores industriais (FLEISH, 2002). Biologicamente, em nível tecidual, o efeito destes fármacos tem sido observado há algumas décadas e se caracteriza especialmente pela redução da reabsorção óssea de forma dose-dependente à custa da inibição do recrutamento e da indução da apoptose dos OCs, agindo de forma praticamente seletiva nestas células (FLEISCH, 2002; RODAN & RESZKA, 2002).

A estrutura química P-C-P, por sua vez, permite que haja uma variabilidade de modificações em ambas as cadeias laterais P, fazendo que surjam BFs diferentes entre si quanto às propriedades físicoquímicas, biológicas, terapêuticas e tóxicas (FLEISCH, 2002; DRAKE, CLARKE & KHOSLA, 2009). Os BFs não nitrogenados podem ser representados por clodronato, etidronato e tiludronato. Esses compostos foram descobertos inicialmente e são menos ativos, sendo utilizados em altas doses para que sejam observados os seus efeitos terapêuticos. Portanto, o uso deste tipo de BFs é restrito a distúrbios ósseos metabólicos, como a própria osteoporose. Eles exercem seu efeito competindo com o recrutamento de ATP intracelular em OCs, bloqueando, assim, a reserva energética dessas células, induzindo, por consequência, a apoptose destas células (RODAN & FLEISH, 1996; PAPAPETROU, 2009).

Já os BFs contendo nitrogênio, como zoledronato (AZ), pamidronato, alendronato, dentre outros, foram desenvolvidos posteriormente e exibem atividade pronunciada, sendo úteis em necessidades mais extremas, como doenças neoplásicas. Os mecanismos antirreabsortivos desses medicamentos vão além da inibição da apoptose celular, atuando na via do mevalonato através da inibição da enzima farnesil pirofosfato sintetase (FPP) e, por consequência, impedindo a farnesilação de Ras necessária para permitir a sua ancoragem à membrana celular dos OCs e a consequente ativação do receptor do M-CSF, bloqueando, assim, a cascata envolvendo o receptor M-CSF em OCs (PAPAPETROU, 2009). É importante salientar que as modificações no comprimento da cadeia lateral e a adição de outros grupos ao nitrogênio pode aumentar a potência do BFs (RODAN & FLEISH, 1996).

No âmbito da pesquisa científica, os efeitos dos BFs sobre o metabolismo ósseo fizeram com que tais fármacos também fossem alvos como adjuvantes terapêuticos de condições inflamatórias crônicas caracterizadas por reabsorção óssea (MUNIZ et al., 2021; PERIS, MONEGAL & GUAÑABENS, 2021), ademais de outras indicações anteriormente mencionadas. Porém, em decorrência de seus efeitos consideráveis *no turnover* ósseo, modificando o saldo líquido final da remodelação óssea, o uso terapêutico destes fármacos para tais fins tem se tornado limitado, uma vez que os mesmos são bastante associados à ONMB (JENSEN et al., 2021; PAPAPETROU, 2009; SINGH & GONEGANDLA, 2020).

O efeito final entre os BFs não nitrogenados ou nitrogenados é semelhante e é bem estabelecido que o alvo principal destes fármacos seja os OCs, embora estudos tenham comprovado, também, a influência destes fármacos em OBs (SINGH &

GONEGANDLA, 2020; JENSEN et al., 2021). Os BFs reduzem o número de OCs por inibirem o recrutamento de tais células para a superfície óssea e reduzirem a formação de OCs funcionais e maduros, já que interferem na fusão destas células, além de suprimir a atividade osteoclástica propriamente dita e de reduzirem a taxa de dissolução do tecido ósseo (RODAN & RESZKA, 2002; PAPAPETROU, 2009; SINGH & GONEGANDLA, 2020; JENSEN et al., 2021)

No entanto, tem sido descrito que estes efeitos precisamente sobre OCs não acontecem de forma aguda. Do contrário, inicialmente após a administração do BF, o número de OCs multinucleados na superfície óssea tende a aumentar e somente após um período de administração crônica é que o número de OCs diminui (KUROSHIMA, GO & YAMASHITA, 2012; GROSS et al., 2017).

Em alguns estudos clínicos, além de ter sido observado um número maior de OCs em amostras de espécimes com ONMB causada por BFs, em comparação a outras etiologias de ON, como radiação ou osteomielite, morfológicamente tais células também demonstraram características apoptóticas, ou seja, hipernucleadas e com núcleos mais picnóticos e arredondados (GROSS et al., 2017). Adicionalmente, com relação ao perfil imunohistoquímico, a quantidade de células TRAP⁺ foi significativamente menor, ao passo que a proporção de células DC-STAMP⁺ (GROSS et al., 2017) e BCL6 foi maior (WEHRHAN et al., 2019), em amostras de ON causada por BFs e radiação, em comparação aos espécimes controles ou com ON causada por inflamação. Esses estudos corroboram relatos ainda mais atuais, em que os BFs pareceram regular negativamente a expressão de TRAP e MMP-9 em células RAW264.7 através da inibição de RANK, reduzindo a ativação da via RANKL/RANK e culminando na inibição da diferenciação e da maturação dos OCs, representada pela baixa função de reabsorção óssea (ZHAO et al., 2021). Curiosamente, a razão RANKL/OPG também parece ser aumentada com o uso de determinados BFs (KOCH et al., 2012), a qual pode estar associada a um efeito secundário de BFs em OBs.

Assim, no estudo em questão, notou-se que a alta quantidade de OCS com morfologia celular especial, caracterizada por células gigantes arredondadas, hipernucleadas e núcleos picnóticos (GROSS et al., 2017), tende a ser acompanhada por uma inatividade reabsortiva, caracterizada pela baixa expressão de TRAP (GROSS et al., 2017; ZHAO et al., 2021), e um aumento da taxa de fusão célula-célula, representada pela maior expressão de DC-STAMP (GROSS et al., 2017a) e BCL6 (WEHRHAN et al., 2019). Entretanto, apesar dos BFs reconhecidamente induzirem apoptose de OCs, mais

estudos dos efeitos dos BFs na expressão de TRAP devem ser realizados, uma vez que outros estudos também tem demonstrado que células apoptóticas expressam fortemente TRAP (SOYSA; ALLES, 2019) e que este marcador esteve aumentado no contexto da ONMB (NAKAGAWA et al., 2021).

Com relação ao NFATc1, o qual possui atividade paradoxal em relação à BCL6, a literatura se diverge quanto ao efeito dos BFs sobre a expressão deste marcador. No estudo de *in vitro* de ZHAO et al., 2021, utilizando células RAW264.7, o tratamento destas com AZ reduziu a expressão de NFATc1, o que já poderia ser esperado tendo em vista a reduzida atividade de OCs. Enquanto isso, no estudo clínico de WEHRHAN et al., 2019, tal marcador de atividade osteoclástica foi elevado após administração crônica com AZ. Estes autores, por sua vez, justificaram o aumento da expressão de NFATc1 como parte de uma reação compensatória ao efeito induzido pelo BFs, caracterizado pela inibição da capacidade reabsortiva dos OCs e baixa expressão de TRAP. Desta forma, mais estudos são necessários para esclarecer o efeito dos BFs sobre a expressão de marcadores da atividade osteoclástica.

Por outro lado, apesar de por muito tempo ter se considerado o efeito direto dos BFs de forma seletiva em OCs, ao se refletir a dinâmica acoplada do *turnover* ósseo, em que uma lacuna de reabsorção óssea deve acontecer pela atividade de OCs previamente à formação óssea, formando a superfície de reversão, é importante salientar que a formação óssea e a atividade de OBs também pode ser influenciada pelo uso de BFs (JENSEN et al., 2021). Ou seja, mesmo que inicialmente possa-se imaginar que a formação óssea reduzida, observada como efeito do uso de BFs, seja apenas consequência da redução de reabsorção, essa explicação parece ser bastante limitada, e sugere mecanismos adicionais de inibição da formação a partir da administração de BFs em OBs. A saber, a extensão da superfície óssea reabsorvida depende não somente da magnitude da reabsorção, mas especialmente do tempo decorrido para o início da formação óssea (DELAISSE et al., 2020), e ambos os fatores parecem ser influenciados pela administração de BFs (JENSEN et al., 2021).

Após a formação da superfície erodida e da lacuna de reabsorção óssea primária, a formação óssea é iniciada somente se as células de reversão, consideradas osteoprogenitoras, forem recrutadas na superfície erodida em uma determinada densidade. Inicialmente, tal recrutamento ocorre em grande parte pela liberação de fatores osteoclastogênicos (LUUKKONEN et al., 2019) ou pela própria superfície erodida (ABDELGAWAD et al., 2014; DELAISSE et al., 2020), conforme mencionado

anteriormente. Em um momento inicial, as células recém-chegadas são caracterizadas por terem baixa densidade e baixos índices de marcadores de diferenciação osteoblástica, mas essas características se modificam em momento mais posterior, especialmente após a influência de fatores não osteoclastogênicos (DELAISSE et al., 2020; OMI & MISHINA, 2022), quando, então, o perfil celular passa a ter alta densidade e altos índices de marcadores de diferenciação osteoblástica (DELAISSE et al., 2020). A permanência no momento inicial do ciclo indica que, por falta de progenitor, não ocorre a evolução do ciclo e, conseqüentemente, a superfície torna-se uma superfície de reversão interrompida (JENSEN et al., 2021).

Neste contexto, estudos tem demonstrado que os BFs possam reduzir tal recrutamento, retardando ou prevenindo o início da formação óssea, estendendo a área no tempo de “*reversão interrompida*”. Inclusive, os BFs já provaram inibir a proliferação e a migração de células da linhagem de OBs *in vitro*, reduzindo fatores que favoreceriam a expansão e a proliferação de células pré-osteoblásticas, atividades necessárias para atingir a densidade celular permissiva na superfície óssea erodida para o início da formação óssea (LOTZ et al., 2020), ao passo que estimulam a liberação de mediadores inibidores de osteoblastogênese, como TNF- α e IL-1, além de esclerostina e DKK (GIANNASI et al., 2019).

Além disso, considerando-se que o controle da atividade de OCs na remodelação óssea advém, especialmente, de OBs, estudos indicam que quando células osteoblásticas são expostas continuamente por baixas concentrações de BFs, estas produzem fatores que reduzem atividade de reabsorção óssea nos OCs por inibirem o recrutamento e sobrevivência destas células (VITTI, FLEISCH & GUENTHER, 1996).

2.4. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia (BALTZIS, ELEFThERIADOU & VEVES, 2014). A hiperglicemia pode ser resultado da destruição direta de células β -pancreáticas ou do aumento da resistência de células periféricas à insulina, caracterizando os tipos 1 e 2 de DM, respectivamente. Independentemente da etiologia, o acúmulo sérico de glicose ocorre de forma crônica e acarreta os danos celulares e teciduais observados nessa doença, a qual é caracterizada por uma inflamação sistêmica decorrente da hiperglicemia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A saber, a inflamação é uma resposta instalada primariamente com função de defesa, necessária para qualquer reparo tecidual. Porém, contrariamente, a exacerbação crônica da resposta inflamatória do hospedeiro, como nos casos de persistência do antígeno em questão, está associada à destruição tecidual e aos processos patológicos em doenças inflamatórias crônicas, como pode ser observado na fisiopatologia da artrite reumatoide, de doenças autoimunes e da periodontite (BARTOLD & LOPEZ-OLIVA, 2020; WEYAND & GORONZY, 2021). A primeira etapa para ativação do sistema imune inato envolve o reconhecimento de patógenos invasores (PAMPs) ou de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), estes últimos considerados como alterações endógenas. Em relação à patogênese do DM, alguns eventos típicos da doença podem ser considerados DAMPs, dentre eles a toxicidade proporcionada pela hiperglicemia, elevada concentração de intermediários lipídicos, excesso de ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio (LAND, 2015; WADA & MAKINO, 2016), os quais estão presentes de forma crônica nesta doença.

Dentre as famílias de receptores de reconhecimento, destacam-se aqueles que contêm repetições ricas em leucina, como o receptor de domínio de oligomerização de ligação ao nucleotídeo (receptores do tipo NOD ou NRL). A ativação de receptores NRL por DAMPs gera a formação de complexos proteicos de alto peso molecular, denominados inflamassomos, responsáveis pelas ativações subsequentes de caspases e apresentando funções chaves na resposta inflamatória inata (LAND, 2015; WADA & MAKINO, 2016). Caspases são tipos variados de proteases com base em cisteína e ácido aspártico organizadas em cascata intracelular e importantes na clivagem de proteínas. Elas têm sido associadas às funções celulares de apoptose, bem como à fisiopatologia de doenças inflamatórias, uma vez que são relacionadas à maturação de citocinas pró-inflamatórias (LAND, 2015; WADA & MAKINO, 2016).

Portanto, tem sido descrito que a hiperglicemia promove aumento da expressão tecidual de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , dentre outros, além do estresse oxidativo. Como consequência, DM é uma das principais doenças sistêmicas que favorecem processos inflamatórios crônicos, com exacerbação da resposta inflamatória (WADA & MAKINO, 2016; LI et al., 2023).

Além disso, os altos níveis séricos de citocinas inflamatórias, no DM, por sua vez, levam ao aumento da resistência à insulina e às alterações no metabolismo da glicose, incluindo dano ao pâncreas (WADA & MAKINO, 2016; LI et al., 2023). Adicionalmente, a hiperglicemia crônica também culmina em espessamento vascular. A oxigenação

insuficiente de tecidos periféricos no DM, por sua vez, culmina em lesões necróticas teciduais e cicatrização prejudicada de feridas (LI et al., 2023).

2.5. Metformina: um fármaco de múltiplos potenciais?

A MET é um dos fármacos mais prescritos mundialmente, sendo a primeira linha de tratamento farmacológico contra DM-2 (BAHRAMBEIGI et al., 2019; FLORY & LIPSKA, 2019; KRISTÓFI & ERIKSSON, 2021), tendo base de origem na fitoterapia (KRISTÓFI & ERIKSSON, 2021). Sua descoberta primordial teve início em meados anos 1900, no continente europeu, quando a galegina, um produto natural da planta *Galega officinalis*, demonstrou efeito antiglicêmico, porém apresentando certa toxicidade e não sendo útil clinicamente. Entretanto, sua estrutura química contendo guanidina serviu como base na produção de derivados sintéticos, incluindo a MET. Esta, por sua vez é biguanida, contendo duas moléculas acopladas de guanidina e com substituições adicionais (RENA, HARDIE & PEARSON, 2017).

Acredita-se que o efeito antidiabético decorre de sua ação inibidora da gliconeogênese hepática, impedindo a elevação dos níveis séricos glicêmicos, bem como de seu possível potencial sensibilizador da ação da insulina periféricamente. Com relação à sua farmacocinética, sabe-se que após sua administração oral, fígado, rins e intestinos são os principais órgãos alvos, refletindo a sua metabolização hepática e excreção renal. Nesses órgãos, observa-se maiores concentrações de MET até mesmo em relação ao plasma (GONG et al., 2012).

Considerando o efeito deste fármaco especialmente na gliconeogênese e na resistência à insulina, vale salientar alguns mecanismos intracelulares. A MET é conduzida através de potenciais de membrana para o interior das mitocôndrias, onde suprime a produção de ATP, aumentando a razão ADP:ATP. Como consequência, ocorre prontamente a redução da ativação da adenilato ciclase e da produção do cAMP. Tais modificações ativam AMPK como forma compensatória, com finalidade de retomar a homeostase energética da célula (BAHRAMBEIGI et al., 2019; RENA, HARDIE & PEARSON, 2017; THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019).

A saber, o AMPK é uma enzima altamente associada ao metabolismo energético em todos os tipos celulares, podendo estimular ou desligar as vias metabólicas que consumam ou produzam ATP de acordo com a produção do conteúdo energético celular, ou seja, da relação ADP:ATP. De fato, apresenta total influência no metabolismo celular e lipídico. Em hepatócitos, todas essas modificações culminam, ainda, em uma redução

da produção de glicose através da gliconeogênese, bem como da síntese de lipídeos. Nas células beta-pancreáticas, o AMPK é importante no aumento da secreção de insulina. Já nos tecidos musculares, além dos hepáticos, ocorre um aprimoramento à sensibilidade da insulina (RENA, HARDIE & PEARSON, 2017; VILLANUEVA-PAZ et al., 2016). Enquanto isso, no tecido ósseo, o AMPK induz a osteoblastogênese, através da ativação do fator de transcrição específico de OB, Runx-2, e inibe a osteoclastogênese, uma vez que suprime RANKL (BAHRAMBEIGI et al., 2019).

Nos últimos anos, o crescente uso da MET resultou em pesquisas científicas que estudaram potenciais adicionais deste fármaco. As evidências mostraram que pacientes com DM-2 e sob exposição crônica à MET apresentavam uma menor incidência de câncer ou uma melhor resposta à terapia do câncer de forma geral (ANDRZEJEWSKI et al., 2014; BAHRAMBEIGI et al., 2019; THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019), de tal forma que o potencial anticancerígeno da MET foi observado primariamente em pacientes diabéticos (THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019), despertando o interesse da comunidade científica em investigar esse papel.

Sobre o efeito anticancerígeno da MET, estudos pré-clínicos relatam que há uma dupla supressão de mTOR, resultando em menor síntese proteica e diminuição da proliferação celular. A saber, a ativação do AMPK, mediante redução do ATP, além de suprimir diretamente mTOR, também culmina em inibição da fosforilação do substrato-1 do receptor de insulina (THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019; VILLANUEVA-PAZ et al., 2016). Este, por sua vez, transmite sinais do fator de crescimento de insulina via PI3K/AKT e, portanto, seu bloqueio reduz a sinalização de AKT, cujo alvo é mTOR (BAHRAMBEIGI et al., 2019; THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019). Adicionalmente, alguns efeitos anticancerígenos da MET independem da conexão com AMPK, e estes se caracterizam por ações antioxidativa, com redução da fosforilação oxidativa mitocondrial e consequente diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio, e anti-inflamatória contra células cancerígenas, com o bloqueio da atividade do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) e, por conseguinte, redução na secreção de mediadores pró-inflamatórios (PODHORECKA, IBANEZ & DMOSZYŃSKA, 2017).

De fato, a MET também tem sido promissora quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios. Estudos demonstraram que a MET reduziu a expressão do inflamassoma NLRP3 e de citocinas como IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α induzida por LPS de *P. gingivalis* em células do ligamento periodontal, indicando um possível potencial protetor contra a

periodontite, uma doença de etiologia bacteriana (KANG et al., 2017; TAN et al., 2020). Ademais, em patologias associadas a outras causas, tal como a artrite reumatoide, a MET também se mostrou com potencial anti-inflamatório efetivo. Interessantemente, em um estudo clínico, observou-se uma redução dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17 e NF-K β em pacientes acometidos por essa doença e tratados com MET, o que se traduziu em eficácia clínica deste fármaco (ABDALLAH et al., 2021).

3. JUSTIFICATIVA

BFs são fármacos com potencial antirreabsortivo promissor e têm sido utilizados para reduzir a reabsorção óssea na osteoporose, por exemplo, em mulheres na idade pós-menopáusia, bem como para prevenir metástases ósseas em casos oncológicos de alto risco. Além disso, várias pesquisas têm avaliado o potencial antirreabsortivo destes fármacos no tratamento de desordens inflamatórias crônicas caracterizadas por reabsorção óssea, como na artrite reumatoide e na periodontite. Apesar desta grande vantagem, relatos de casos de ON após lesões traumáticas no tecido ósseo, como exodontia, em pacientes fazendo uso crônico destes fármacos não têm sido raros, especialmente em se tratando do uso endovenoso dos mesmos, tal como ocorre para o AZ.

Assim, nas últimas décadas, o foco de pesquisas científicas também tem se direcionado ao estudo da patogênese e da terapêutica da ON associada ao uso destes fármacos, a qual é caracterizada por dor intensa e necrose seguida de exposição óssea maxilo-mandibular, especialmente na região mandibular. A ONMB reconhecidamente está associada a alterações não apenas no processo natural de remodelação e renovação óssea, mas também na alteração da concentração local de mediadores pró-inflamatórios e microcirculação tecidual e, portanto, algumas situações sistêmicas inflamatórias crônicas podem interferir na sua patogênese.

Dentre estas, destaca-se o DM, o qual, por sua vez, tem como característica principal a hiperglicemia, de tal forma que os processos patológicos decorrentes dessa doença estão diretamente ou indiretamente relacionados à toxicidade do aumento sérico da glicose. Independentemente da sua etiologia, a literatura científica tem indicado que DM está fortemente associado às alterações imunológicas e à liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Assim, considerando que a ONMB induzida por BFs e o DM são situações relacionadas às alterações na microcirculação e na expressão de mediadores inflamatórios, de tal forma que se torna interessante estudar a influência da hiperglicemia na gravidade de ONMB.

Além disso, a MET é um dos fármacos antidiabéticos mais importantes no tratamento do DM e, nas últimas décadas, tem demonstrado apresentar múltiplos potenciais, como anticancerígeno e anti-inflamatório. Reconhecida por ser um agonista AMPK, o que está relacionado ao seu efeito hipoglicêmico, a MET é capaz de modular a ativação de mTOR, o qual, por sua vez, influencia no direcionamento da célula para sobrevivência ou apoptose. Por isso, é relevante avaliar o efeito da MET na ONMB.

Vale, ainda, salientar que com o envelhecimento da população mundial, o câncer de mama, uma situação de risco para metástases ósseas e que, muitas vezes, torna necessário o uso de fármacos como BFs, além da osteoporose, outra situação também tratada rotineiramente com BFs, são comorbidades bastante prevalentes, ademais do DB e da necessidade do tratamento crônico com MET. Esse fato inegavelmente contribui para valorizar a importância do nosso estudo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto do diabetes experimental e da MET na ONMB induzida por AZ.

4.2. Objetivos Específicos

Em animais submetidos ao protocolo experimental de ONMB, analisar o efeito do diabetes experimental e da administração crônica da MET:

- Na proporção de células ósseas osteócitos e osteoclastos, bem como na expressão de TRAP na área de tecido ósseo mandibular submetida à exodontia.
- Na população de células inflamatórias e na expressão de F4/80 na área de tecido ósseo mandibular submetida à exodontia.
- Na atividade de neutrófilos na gengiva subjacente ao de tecido ósseo mandibular submetido à exodontia.

Em sobrenadante de cultura de células RAW 267.4:

- Averiguar a ativação do inflamassoma de forma indireta através da produção de IL-1 β em células submetidas ao tratamento com AZ.
- Avaliar o efeito do tratamento com MET sobre a produção de IL-1 β em células submetidas ao tratamento com AZ

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Seleção de animais

Foram utilizados 50 ratos *Wistar* machos, com massa corpórea de 180 a 300 gramas para as análises no presente estudo. Esses animais foram provenientes do Biotério central da Universidade Federal do Ceará e mantidos em gaiolas apropriadas, em um ambiente com temperatura controlada (22-25 °C), exaustão de ar, ciclo de 12 h claro/escuro cada, com livre acesso a água potável e ração padrão, respeitando o número máximo de 03 animais por caixa.

Os estudos foram iniciados apenas após aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, com número de protocolo 5649020519.

5.2. Modelo experimental de indução da ONMB por BFs

Embora muitos modelos experimentais de desenvolvimento da ONM associada ao uso de BFs tenham sido descritos envolvendo a indução de infecção ou inflamação, bem como alguma comorbidade sistêmica (SONIS et al., 2009), o modelo experimental de indução de ON envolvendo o trauma ósseo mandibular combinado ao uso crônico de BFs (ONMB) tem sido bem recorrido na literatura científica (SILVA et al., 2015; HOWIE et al., 2015; KOLPAKOVA et al., 2017).

Em grande parte dos estudos, a espécie animal escolhida para o referido modelo experimental de ON induzida por BFs é o rato *Wistar*. Os animais desta espécie apresentam cavidade oral de tamanho e resistência tecidual ideais para fornecer amostras satisfatórias às diversas análises, bem como se reproduzem com facilidade, além de serem animais versáteis e fáceis de manusear e apresentarem anatomia alveolar óssea da região molar semelhante à dos humanos. Com relação ao BFs, embora alguns autores tenham recorrido ao uso do alendronato (CONTE NETO et al., 2016), o zoledronato ou ácido zoledrônico (AZ) tem sido bastante utilizado através da via de administração endovenosa e parece ser eficiente no desenvolvimento da lesão de ONMB associada à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (SILVA et al., 2015; HOWIE et al., 2015; KOLPAKOVA et al., 2017). A via de administração influencia diretamente na ocorrência de ON, de tal forma que a via endovenosa, por propiciar maior biodisponibilidade do fármaco, tornou-se mais útil ao nosso estudo.

5.3. Protocolo experimental de indução da ONM por BFs

Para indução da ONMB, foi utilizado o modelo experimental preconizado por Silva e colaboradores (2015). O AZ (SUN pharma) foi dissolvido em solução salina 0,9% estéril e foi administrado na dose de 0,2 mg/kg semanalmente por via endovenosa, durante 3 semanas consecutivas (dias 0, 7 e 14). Ao 42º dia após a primeira administração, foi realizada exodontia do primeiro molar inferior esquerdo.

Neste procedimento, o animal foi previamente anestesiado com a combinação de xilazina e quetamina (90 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente). Foram, então, realizados procedimentos de sindesmotomia e de luxação, com auxílios de sonda exploradora número 05 e espátula 3S, seguidos da extração do primeiro molar inferior esquerdo, com auxílio de espátula Lecron ou de porta agulha de Mayo. Uma semana após a referida exodontia, correspondente aos 49 dias após a primeira administração de AZ, os animais receberam dose adicional de AZ, de forma semelhante às anteriores, e foram eutanasiados por meio de exsanguinação sob prévia anestesia, ao 70º dia experimental.

Os demais animais, que não foram submetidos à ONMB por AZ, receberam, nos respectivos dias, a administração de solução salina 0,9%.

5.4. Modelo experimental de indução do DM

O DM pode ser induzido experimentalmente através de destruição química de células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001), remoção cirúrgica do pâncreas (KUMAR et al., 2012), dietas hiperglicêmicas ou hiperlipídicas (MUNSHI, JOSHI & RANE, 2014) e altas doses de hormônios hiperglicemiantes, como corticoides (MARTÍNEZ et al., 2016). Porém, o método mais útil para indução de DM em laboratório, dada à sua facilidade e rapidez, é a administração de determinadas substâncias químicas de toxicidade seletiva para células β pancreáticas (KING, 2012).

Dentre estas substâncias químicas, destacam-se o aloxano e a estreptozotocina, ambos capazes de induzir destruição de células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008). Nos casos de animais que devem sobreviver por longos períodos de tempo, a administração de estreptozotocina pode ser inviável, em decorrência de seus efeitos hepatotóxicos e renais, além do fato de que tal fármaco produz sinais clínicos mais severos da doença, requerendo a administração de insulina nesses casos. Logo, em protocolos experimentais extensos, a administração de aloxano pode ser preferível quando se pretende induzir DM nos animais em modelos experimentais longos (SILVA & NOGUEIRA, 2015).

De fato, observa-se que aloxano provoca sinais clínicos semelhantes àqueles em pacientes diabéticos, tais como perda de peso corporal, glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, cetonúria, cetonemia, além de possuir pequena ação oncogênica e menor custo comparada à estreptozotocina (SILVA & NOGUEIRA, 2015). Além disso, tem sido observada hiperglicemia sustentada por até 60 dias após uma única administração de aloxano seguida de jejum de 12 ou 18 horas (PEREIRA, 2017).

5.5. Protocolo experimental de indução do DM

Foi utilizado o modelo de DM induzido pelo aloxano (Sigma-USA) em ratos, conforme já preconizado pela literatura científica (ORIDUPA, OVWIGHOSE & SABA, 2017; IGHODARO, ADEOSUN & AKINLOYE, 2018; MIRANDA PEDROSO et al., 2019). Este modelo experimental consiste em uma única administração endovenosa desse referido fármaco nos animais previamente pesados e anestesiados com xilazina e quetamina (90 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), em ambiente com pouca luminosidade, após jejum para sólidos de 12 horas.

Para tal administração, o aloxano foi pesado em balança de precisão, em sala com pouca luminosidade, dissolvido em solução salina 0,9% estéril e acondicionado em tubo de fundo cônico 10 cc (Tubo de Falcon) envolvido com papel alumínio, dada a elevada fotosensibilidade deste composto.

Este protocolo experimental foi previamente realizado por nosso grupo de pesquisadores (PEREIRA, 2017), em camundongos, que o aloxano foi administrado endovenosamente nas doses de 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg e 125 mg/kg. A glicemia em jejum de 6 horas foi avaliada 15 dias após tal administração. Foi observada hiperglicemia associada a boa taxa de sobrevivência dos animais após a utilização de doses a partir de 50 mg/kg e, portanto, esta foi a dose de aloxano escolhida para ser utilizada na presente pesquisa científica. Tal dose de 50 mg/kg está de acordo com a literatura científica para ratos, que indica doses de 40 a 200 mg/kg de aloxano para indução de hiperglicemia nestes animais (KING, 2012).

Alguns estudos relatam que a administração de aloxano promove um aumento nos níveis séricos de insulina provavelmente em decorrência de influxo de íons cálcio ao citosol das células β . Porém, trata-se de uma liberação de curta duração e inicial, seguida por completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, em decorrência de necrose das células β (SILVA & NOGUEIRA, 2015). Em decorrência desse efeito, para evitar morte por hipoglicemia súbita, os animais receberam glicose a 10% em água por

12 horas e os alimentos sólidos foram incluídos uma hora após a injeção de aloxano (CHAGAS et al., 2019).

Assim, em nosso estudo, os animais pertencentes aos grupos em que DM foi induzida receberam a única administração endovenosa de 50 mg de aloxano 7 dias previamente ao início da indução de ONM por AZ. Os demais animais receberam, nesse mesmo período experimental, a administração apenas de solução salina 0,9%. Todos os animais tiveram o controle de suas glicemias em jejum do início ao término do protocolo experimental.

5.6. Abordagem Farmacológica: Metformina

A MET (Prati donaduzzi, comprimido de 500 mg) foi dissolvida em solução salina 0,9% e administrada diariamente na dose de 250 mg/kg aos animais por gavagem, desde o dia experimental -7 até a eutanásia. Essa dose foi escolhida com base em protocolos experimentais publicados anteriormente na literatura científica, em que a MET apresentou atividade anti-inflamatória em ratos *Wistar*, sem demonstrar efeitos tóxicos subjacentes (NAKAGAWA et al., 2021; AL ZA'ABI et al., 2021).

5.7. Grupos experimentais

Na presente pesquisa científica, os animais foram divididos em 5 grupos experimentais:

- Grupo 1 (Grupo *naive*): Os animais não foram submetidos à indução de DM ou de ONM e não receberam administração de alguma substância. Esses animais forneceram dados de controle basal para os protocolos experimentais desta presente pesquisa.
- Grupo 2 (Grupo ONMB): Os animais foram submetidos apenas à administração semanal de AZ nos dias 0, 7, 14 e 49, seguindo recomendações ditas anteriormente, para indução da ONM.
- Grupo 3 (Grupo DM): Os animais foram submetidos à administração única de aloxano no dia -7, seguindo recomendações ditas anteriormente, para indução do DM, e não foram submetidos à indução de ONM.
- Grupo 4 (Grupo DM + ONMB): Os animais foram submetidos à administração de aloxano no dia -7, bem como às administrações de AZ nos dias 0, 7, 14 e 49, visando indução do DM e da ONM.

- Grupo 5 (Grupo ONMB + MET): Os animais receberam a administração de MET, por gavagem, do dia -7 ao 70º dia experimental, bem como a administração semanal de AZ nos dias 0, 7, 14 e 49.

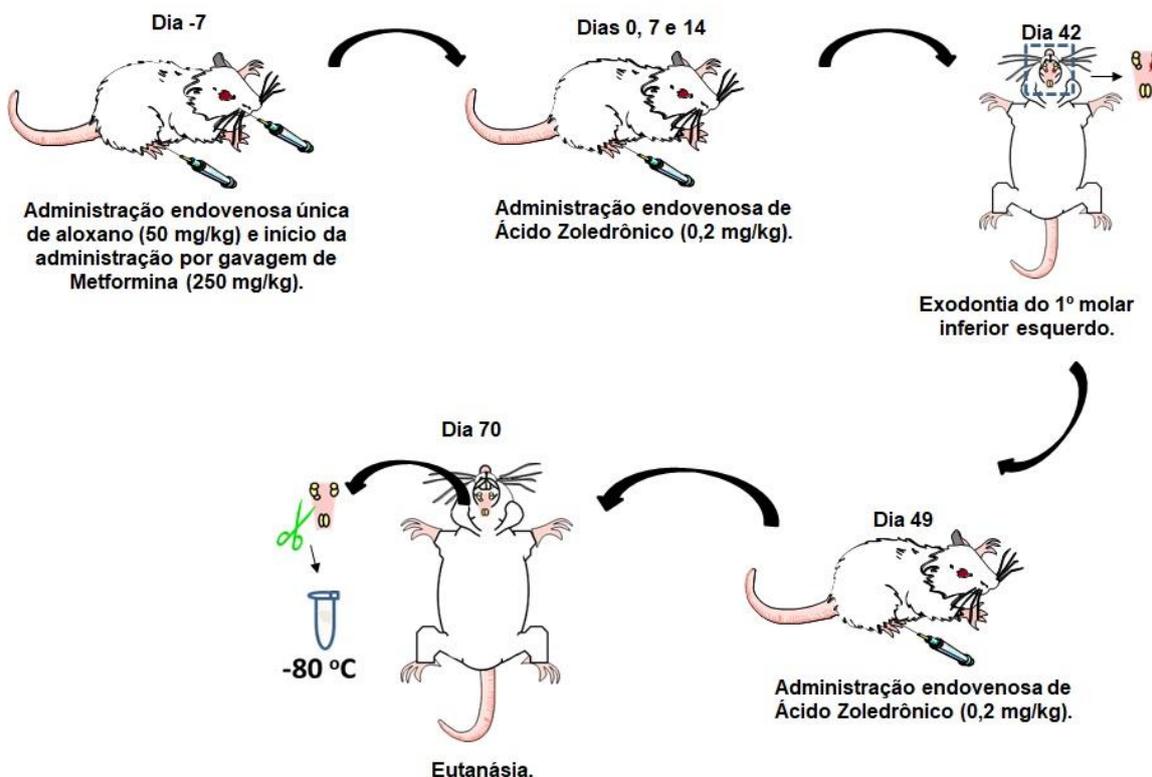
Essa tabela representa adequadamente a distribuição dos grupos experimentais:

Tabela 1: Resumo dos grupos experimentais.

Protocolo/ Grupo	Naive	ONMB	DM	DM+ONMB	ONMB+MET
Aloxano	✗	✗	✓	✓	✗
AZ	✗	✓	✗	✓	✓
MET	✗	✗	✗	✗	✓
EXODONTIA	✓	✓	✓	✓	✓

O protocolo experimental, de modo geral, seguiu-se conforme ilustrado na figura

1:



Arquivo próprio

Figura 1: Protocolo experimental de indução do DM e/ou ONMB. Os animais receberam, por gavagem, a administração de MET ou solução salina 0,9% diariamente durante todo o protocolo experimental, desde o dia -7 ao dia da eutanásia. A administração única endovenosa de aloxano ocorreu no dia -7. A Administração endovenosa de AZ ocorreu nos dias 0, 7, 14 e 49. Após eutanásia dos animais no 70º dia experimental, foram removidas as hemiarquadas submetidas à exodontia e o tecido gengival subjacente para as análises do presente estudo.

5.8. Análise da variação de massa corpórea e da glicemia em jejum

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas diariamente, durante todo o período experimental. Para fins ilustrativos, os valores foram considerados semanalmente na análise estatística e estão expressos como a variação de massa corpórea (g), em relação à massa inicial, a qual foi aferida no dia -7.

Além disso, nos dias -7, 0, 14, 28, 42, 56 e 70 os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e tiveram suas glicemias aferidas.

5.9. Obtenção das amostras após eutanásia dos animais

No dia experimental 70, conforme protocolos acima, os animais foram eutanasiados por exsanguinação, após anestesia com xilazina e quetamina (90 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente).

Depois de constatado o óbito, foi removida a hemiarcada mandibular esquerda e o tecido gengival subjacente à área de interesse (primeiro molar inferior esquerdo) de cada animal, sendo armazenadas em formol tamponado a 4% e em freezer a -80° C, respectivamente.

Em seguida, os corpos dos animais foram destinados a freezer a -20°C, presente no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, para posterior incineração por empresa responsável.

5.10. Procedimentos Histológicos

As análises microscópicas foram avaliadas em cortes seriados das hemiarcadas mandibulares submetidas à exodontia. Para tanto, após eutanásia dos animais ao 70° dia experimental, as hemiarcadas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. A seguir, os referidos espécimes foram submetidos à desmineralização com EDTA a 10% tamponado com fosfato 0,1M, pH 7,0, por aproximadamente 25 dias. Posteriormente, as hemiarcadas foram neutralizadas em banho de água corrente por 24 horas para serem processadas em parafina, sendo então destinadas para avaliação histológica em hematoxilina – eosina (HE) e análise por imunofluorescência.

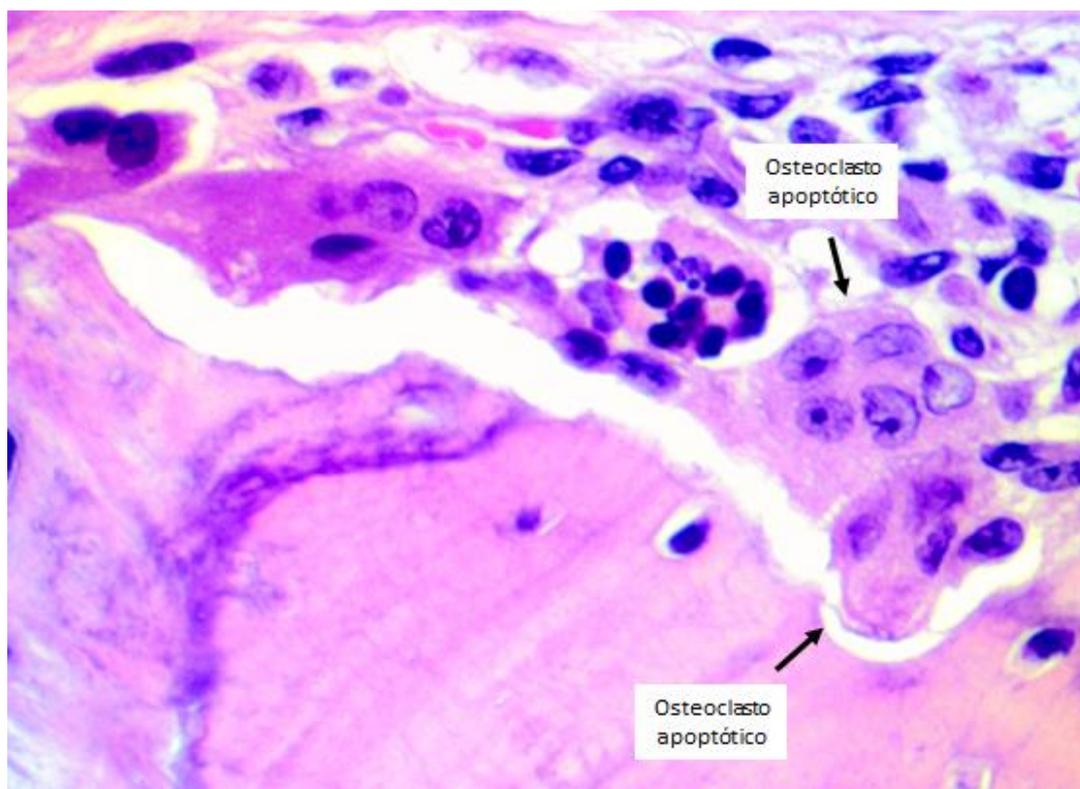
Em tais análises, foi considerada a região óssea referente à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo.

Avaliação histológica: análise do perfil celular

Dos espécimes processados em parafina, foram feitos cortes seriados de 3-4 μm em micrótomo e as lâminas obtidas foram coradas pelo método HE, montadas com bálsamo do Canadá, para posterior análise microscópica em microscopia de luz convencional.

A contagem de lacunas de osteócitos (viáveis e vazias) e OCs (viáveis e apoptóticos), bem como de neutrófilos e de mononucleares, foi considerada nesta avaliação. Para isso, foram obtidas fotografias de diferentes campos microscópicos de grande aumento (400x) no sítio de análise.

A saber, foram considerados OCs células multinucleadas adjacentes ao tecido ósseo. Os OCs foram considerados apoptóticos e sob efeito do AZ quando apresentavam características peculiares, como aumento do tamanho, bem como núcleos mais numerosos e picnóticos, com condensação de cromatina nuclear, além de vacuolização intracitoplasmática, conforme literatura científica (GROSS et al., 2017; SILVA et al., 2015) (Figura 2).



Arquivo próprio

Figura 2: Imagem representativa de osteoclastos considerados viáveis e apoptóticos no presente estudo.

A referida análise foi realizada com auxílio do software Image J[®] (YAMASHITA et al., 2011).

Expressão de F4/80 e TRAP por Imunofluorescência

Para tal análise, os mesmos blocos utilizados na análise histológica foram cortados em cortes seriados (4µm) em lâminas com poli L-lisina (Probe on Plus®) adequadas para a técnica de imunofluorescência. Foram obtidos cortes a partir dos tecidos fixados em parafina. As lâminas contendo os cortes foram mantidas em estufa por 1 hora a 60°C, seguido por dois banhos em Xilol por 10 minutos para desparafinação dos tecidos. O excesso de Xilol e hidratação dos tecidos foi feito por banhos sucessivos de Etanol em concentrações decrescente de, a saber: 2 banhos de 10 min de Etanol absoluto; 1 banho de Etanol a 90%, 70%, 50% por 5 minutos, nessa ordem. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente por 10 min, seguido por 3 banhos de PBS por 5 min, cada. A recuperação antigênica foi feita em Tampão Citrato de Sódio 0,1 M (pH 6,0), à temperatura de 95 °C, por 30 minutos, seguida de resfriamento, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após essa etapa foram feitos 3 banhos de 5 min de PBS. A permeabilização das membranas foi feita em solução contendo 200 µL de PBS, 4 mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 200 µL de triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) durante 10 min.

Em seguida, foram feitas 3 lavagens com PBS de 5 min cada. O Bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com Glicina 0,3M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em BSA 5% por 30 min. Os tecidos foram incubados em temperatura de 2 – 4°C, *overnight*, com os anticorpos primários feitos em coelho anti-f4/80 (1:200, Cell Signaling Technology, EUA) e anti-TRAP (1:100, Invitrogen, EUA). Completado o tempo de incubação do anticorpo primário, foram feitas 3 lavagens de 5 min cada com PBS para posterior incubação com o anticorpo secundário de donkey, anti-igG de coelho (1:200), Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 1 hora e 30 min na mesma concentração estabelecida para o anticorpo primário. A partir desse ponto, as etapas que sucedem foram feitas protegidos da luz. Após o término da incubação do anticorpo secundário, foram feitas 3 lavagens com PBS durante 5 min cada. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (4 µL em 200 mL de PBS) durante 30 min, seguido por lavagens sucessivas em água destilada, totalizando 3 lavagens de 5 min cada. Para montagem das lâminas, foi utilizado o meio Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para a aquisição das fotomicrografias, foi utilizado um microscópio de fluorescência (ByoTek Cytation Imaging, Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

As imagens obtidas foram analisadas através de um “software” de imagem (Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA). A quantificação da área fluorescente foi feita por diferenciação dos pixels fluorescentes relacionados a fluorescência vermelha (Alexa Fluor 568) e a coloração azul para a identificação dos núcleos celulares marcados com o DAPI. Foram estabelecidos limiares de cores de detecção, estes foram padronizados em todas as quantificações. Os dados obtidos foram expressos em área de fluorescência por meio da comparação da intensidade de fluorescência do marcador alvo com o DAPI (100%).

5.11. Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase no tecido gengival

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente em grânulos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença dessas células no tecido inflamado. Em nosso estudo, essa enzima foi avaliada no tecido gengival subjacente à área da exodontia em espécimes mandibulares de animais submetidos ao presente protocolo experimental. Sua presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de placas. Resumidamente, cada amostra foi pesada e homogeneizada em solução NaCl e EDTA dissódico diluídos em Tampão Fosfato (0,02M) e triturada em TissueLyser LT da Quiagen usando *beads* de aço de 4,5 mm. As amostras foram, então, centrifugadas (3000 rpm, 15 min, 4°C) com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em solução hipotônica (NaCl 0,2%) para lise celular. Após nova centrifugação, o *pellet* resultante foi ressuspenso em 300 µL de tampão NaPO₄ 0,05 M, pH 5,4, contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB, Sigma-Aldrich/Merck Millipore, São Paulo, Brasil). A atividade da MPO foi determinada utilizando uma mistura 1:4 de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2M) e a absorbância foi analisada a 450 nm usando um espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram plotadas em uma curva padrão de neutrófilos peritoneais de camundongos, como descrito por Dornelas-Filho e colaboradores (DORNELAS-FILHO et al., 2018). Os resultados obtidos foram expressos como atividade de MPO (neutrófilos/mg de tecido).

5.12. Cultivo das linhagens de Raw 264.7

A linhagem de Macrófagos murinos (ATCC® clone TIB-71™) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® - Thermo Fisher Scientific) e 1% de antibiótico (100 UI/ml

de Penicilina/estreptomicina 100 µg/mL) (Sigma) em estufa a 37°C em incubadora com 95% de umidade e 5% de CO₂. O crescimento celular foi observado em um microscópio invertido de contraste de fase.

A manutenção foi realizada duas vezes por semana em câmara de fluxo laminar vertical com nível de biossegurança II, removendo as células mecanicamente da garrafa (Kasvi, 75 cm², volume de 250 mL), quando atingida a confluência de 60 – 70 %.

5.13. Ensaio de toxicidade em Macrófagos murinos pelo método do Alamar Blue (Resazurina)

A determinação da viabilidade celular induzida pela pelo AZ e/ou MET foi avaliada pelo método *alamar blue* em Macrófagos Raw 264.7 (3x10³ células/mL em placas de 96 poços). Após 24 horas de crescimento celular, foram adicionadas diferentes concentrações de AZ e/ou MET (1,000 – 0,001 µg/mL de PBS) por 24, 48 e 72 h, sendo considerado controle o grupo somente com o meio de cultivo. Após o tempo de incubação, o meio de cultivo foi removido e foi adicionado o corante (0,312 mg/mL; VETEC) e incubado 5% CO₂ a 37°C por no mínimo 1h. As placas foram lidas em um leitor de microplacas (BioTek Synergy HT), utilizando comprimento de onda de excitação a 530-560 nm e emissão em 590nm. Os resultados da viabilidade foram expressos como percentual de viabilidade celular, determinado através da fórmula:

$$Viabilidade (\%) = \left(\frac{Abs \ da \ amostra}{Abs \ da \ média \ do \ grupo \ controle \ DMEM} \right) \times 100$$

Vale ressaltar que o ensaio de toxicidade celular foi inicialmente realizado para decidirmos a concentração e o tempo de incubação em relação aos tratamentos com AZ e/ou MET.

5.14. Dosagem de IL-1β no sobrenadante da cultura de células

O sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7 tratados com AZ (10 µM), MET (4 Mm) e AZ+MET (10 µM e 4 mM, respectivamente) foi congelado a -80° C para a posterior dosagem de IL-1β pelo método ELISA (SUN et al., 2017).

Para isso, placa de 96 poços com superfície de alta ligação foi sensibilizada com 100 µL de anticorpos murinos de captura anti-IL1β (R&D systems) por 12h a 4° C. Posteriormente, as ligações foram bloqueadas com BSA 1% (em PBS) e o sobrenadante

proveniente do cultivo celular foram incluídos nos poços e incubados por mais 2 h a 4° C. Os anticorpos de detecção foram adicionados à placa e esta foi incubada por 2h. Em seguida, a placa foi lavada novamente e foram adicionados 100 µL do complexo diluído (1:40) de HRP-streptavidina sendo a placa protegida da luz a partir desta etapa. Após 20 minutos, foi acrescentado o substrato para a enzima e a placa ficou incubada a 25°C por mais 20 minutos. Para interromper a reação enzimática e realizar a leitura, 50 µL da solução contendo ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) foi adicionada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante, sendo a concentração das amostras obtidas a partir de uma curva padrão de cada citocina com 8 concentrações diferentes, partindo de uma diluição seriada. A concentração inicial foi de 4000 pg/ml para IL-1 β .

5.15. Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após executar um teste de normalidade, os dados foram analisados usando One-way ANOVA e pós-teste Bonferroni, ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, conforme o caso. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. Além disso, foi utilizado o software GraphPad Prism[®] versão 8.0.

5.16. Aspectos éticos

Todos os protocolos *in vivo* indicados nesse projeto foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob o número 5649020519. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram em envidar todos os esforços para reduzir ao mínimo o número de animais utilizados, bem como o sofrimento dos mesmos, de acordo com os princípios éticos para se trabalhar com animais de laboratório.

Quanto aos ensaios *in vitro*, a execução do projeto de pesquisa foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança CTNBio, autorizando a manipulação de Organismo Geneticamente Modificado da classe de risco 2 (OGM NB2). A manipulação e descarte de resíduos dessa linhagem seguiu os padrões técnicos estabelecidos para manipulação de OGM NB2.

6. RESULTADOS

6.1. Glicemia em jejum e variação de massa corpórea dos animais

A ONMB não causou alterações importantes na glicemia em jejum e na variação de massa corpórea dos animais, em comparação a animais do grupo controle *Naive* (Figuras 3A e 4A). Diferentemente, os animais submetidos à indução de DM apresentaram um aumento expressivo na glicemia em jejum e redução de peso significativa, durante os 77 dias experimentais, em comparação aos animais do grupo controle *Naive* (Figuras 3A e 4A). Interessantemente, a administração diária de MET causou uma redução significativa na glicemia em jejum nos dias experimentais 0, 14, 42 e 56 e no peso dos animais durante todo o protocolo experimental, em comparação aos do grupo controle *Naive* (Figura Figuras 3B e 4B).

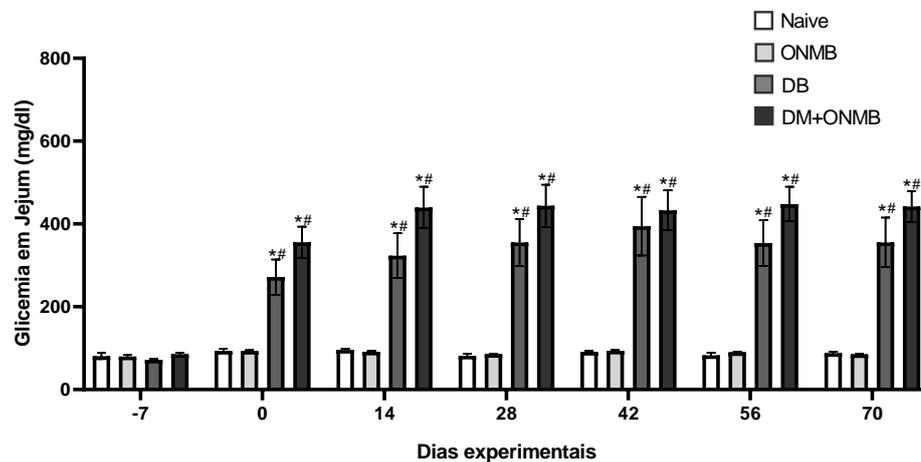


Figura 3: Glicemia em Jejum dos animais no decorrer do protocolo experimental. Os referidos valores foram considerados nos dias -7, 0, 14, 28, 42, 56 e 70, para os grupos *Naive*, ONMB, DM, DM+ONMB (A) e *Naive*, ONMB, ONMB+MET (B). * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

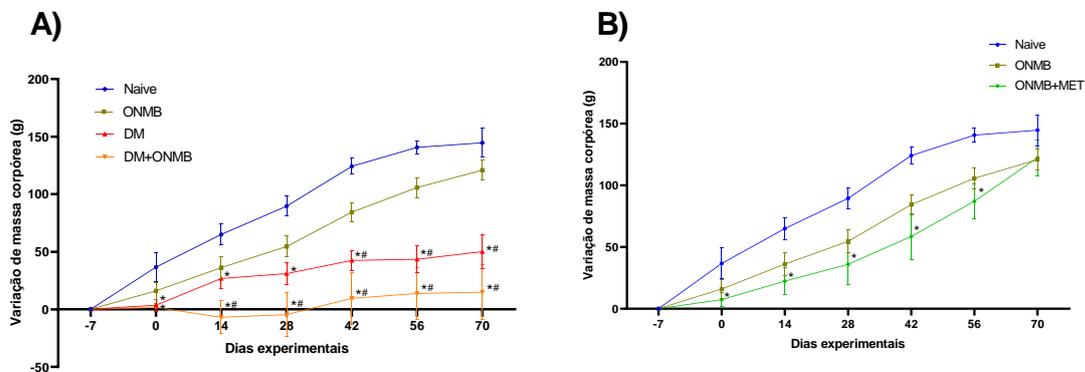


Figura 4: Variação de massa corpórea dos animais no decorrer do protocolo experimental. Os referidos foram considerados nos dias -7, 0, 14, 28, 42, 56 e 70, para os grupos *Naive*, ONMB, DM, DM+ONMB (A) e *Naive*, ONMB,

ONMB+MET (B). * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

6.2. Análise de parâmetros ósseos no osso alveolar de espécimes mandibulares submetidos à exodontia

Lacunas de osteócitos

Foram observadas importantes alterações histológicas no sítio de análise do tecido ósseo mandibular dos animais que receberam as injeções endovenosas de AZ (0,2 mg/kg), nos dias experimentais 0, 7, 14 e 49, indicando necrose óssea. Estas estão representadas por um aumento do número de lacunas de osteócitos vazias e concomitante redução da viabilidade de osteócitos nos animais do grupo ONMB (45.05 ± 3.772) em comparação àqueles do grupo controle *Naive* (14.12 ± 1.47) (Figuras 5 A-F e 6). O DM (38.57 ± 9.08), por sua vez, também influenciou nesse parâmetro de forma significativa, porém não exacerbou a necrose óssea em animais recebendo AZ, como evidenciado no grupo DM + ONMB (39.80 ± 9.05) (Figuras 5 G-L e 6).

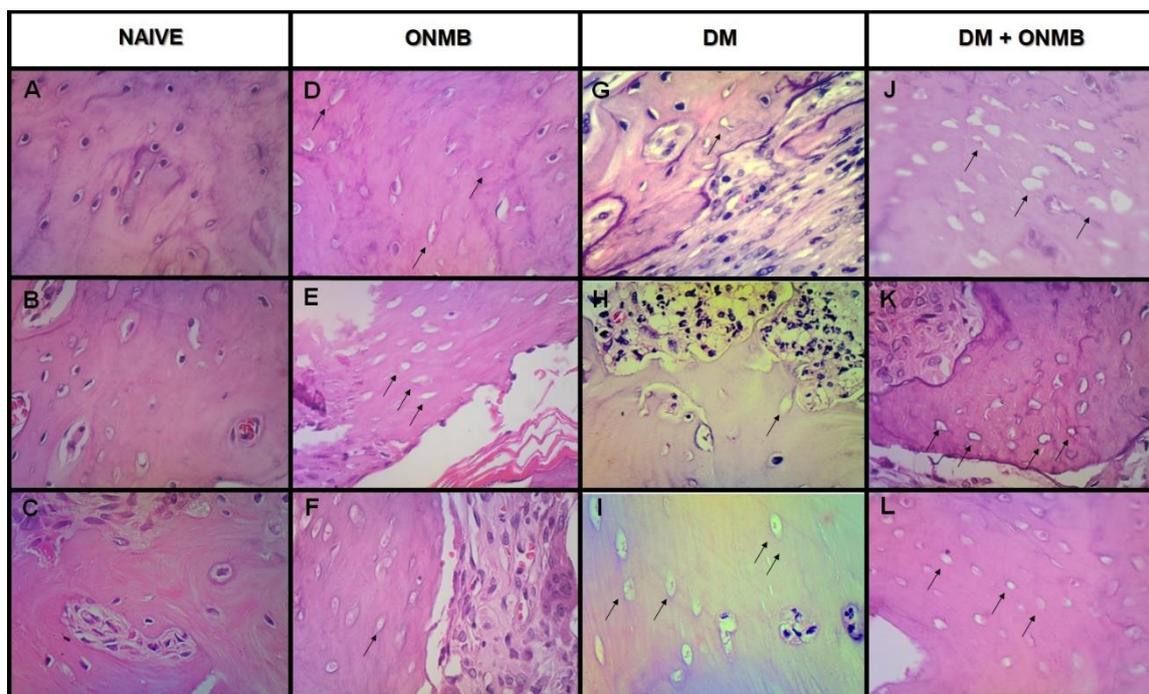


Figura 5: Fotografias de lâminas histológicas coradas em HE dos grupos *Naive*, ONMB, DM e DM+ONMB. A região analisada foi à região óssea circunjacente ao osso em cicatrização (aumento 400x) dos grupos NAIVE (A-C), ONMB (D-F), DM (G-I) e DM + ONMB (J-L). As setas indicam áreas de necrose óssea, com lacunas de osteócitos vazias. Essas áreas foram mais proeminentes nos grupos que receberam o AZ.

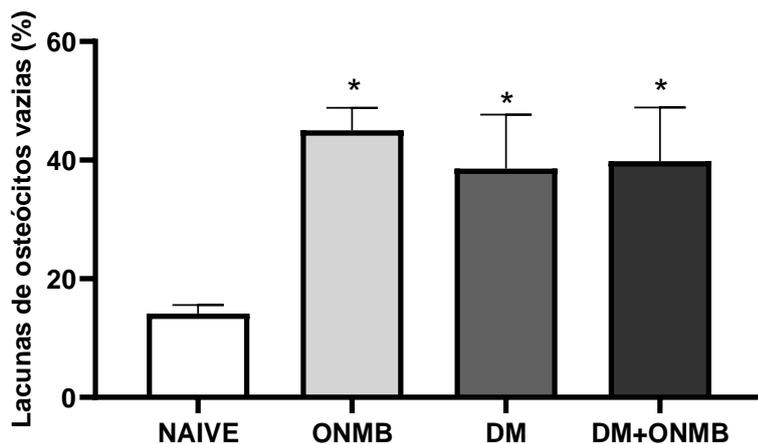


Figura 6: Porcentagem de lacunas vazias de osteócitos nos grupos *Naive*, ONMB, DM e DM+ONMB. A região analisada foi o tecido ósseo circunjacente ao osso em cicatrização pós exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*.

Enquanto isso, a administração diária de MET (250 mg/kg), durante 77 dias experimentais, preveniu a referida necrose óssea (Figura 7 G-I), de tal forma que o grupo de animais recebendo AZ e tratados com MET, representados pelo grupo ONMB + MET (24.43 ± 3.83), apresentou menor quantidade de lacunas de osteócitos vazias e, por consequência, maior número de osteócitos viáveis, em comparação ao grupo ONMB (45.05 ± 3.77) (Figura 8).

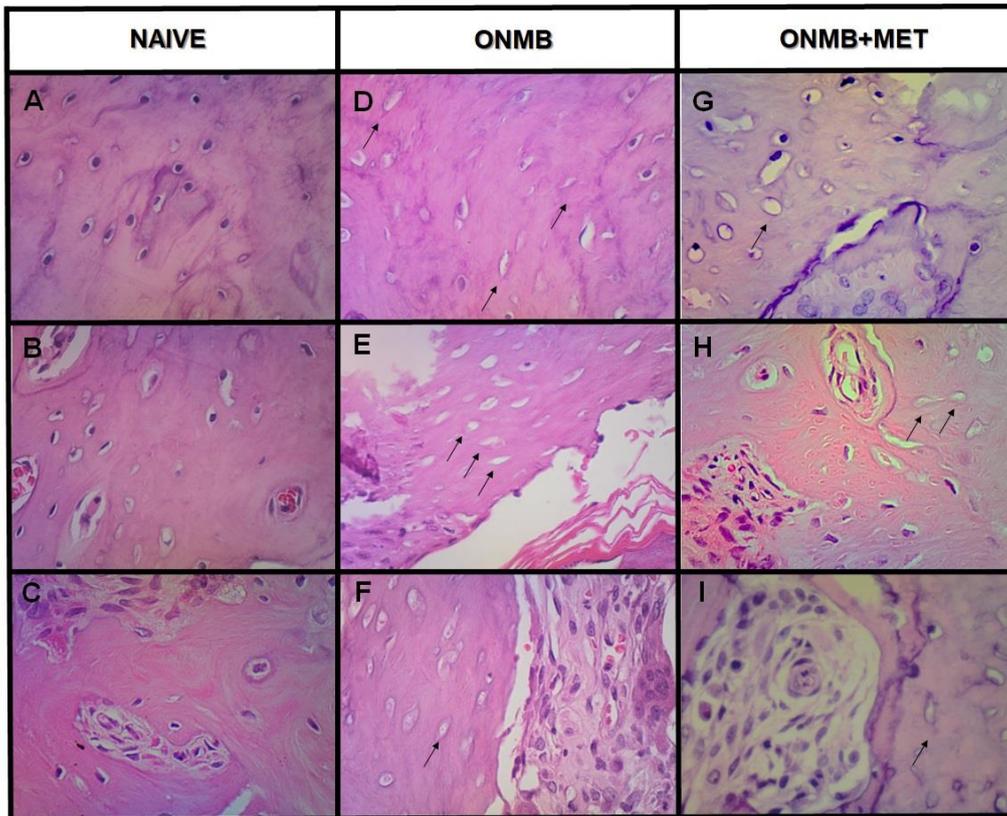


Figura 7: Fotografias de lâminas histológicas coradas em HE dos grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET. A região analisada foi à região óssea circunjacente ao osso em cicatrização (aumento 400x) dos grupos NAIVE (A-C), ONMB (D-F), ONMB+MET (G-I). As setas indicam áreas de necrose óssea, com lacunas de osteócitos vazias. Observa-se uma redução desse aspecto no grupo tratado com MET.

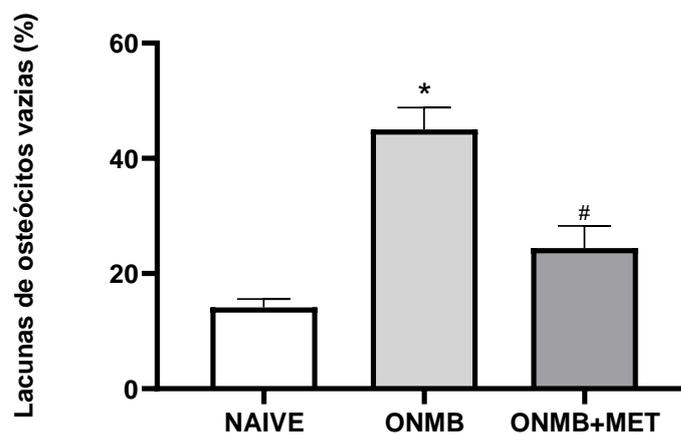


Figura 8: Porcentagem de lacunas vazias de osteócitos nos grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET. A região analisada foi o tecido ósseo circunjacente ao osso em cicatrização pós exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle Naive. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

Número de Osteoclastos

O protocolo experimental utilizando AZ, no presente estudo, caracterizou-se por uma elevação expressiva no número de OCs nos sítios alveolares analisados, conforme observado no grupo ONMB (11.2 ± 1.52) em relação ao grupo *Naive* (1 ± 0.68) (Figura 9A). Este resultado ocorreu às custas do aumento significativo da quantidade de OCs apoptóticos em espécimes dos animais submetidos à ONMB (77.22 ± 4.6), em comparação aos grupos de animais *Naive* (0.0 ± 0.0) (Figura 9B).

Contudo, apesar do grupo DM (6.28 ± 1.58) também ter apresentado um aumento significativo no número total de OCs em comparação aos animais *Naive* (1 ± 0.68), o mesmo não apresentou elevação importante da porcentagem de OCs apoptóticos (26.7 ± 11.28) (Figuras 9 A e B). Além disso, os espécimes dos animais com DM também submetidos à ONMB, no grupo DM + ONMB, não apresentaram indícios acentuados do número total de OCs (10 ± 1.85) e de OCs apoptóticos (78.68 ± 5.26), em comparação aos animais dos grupos ONMB (Figuras 9 A e B).

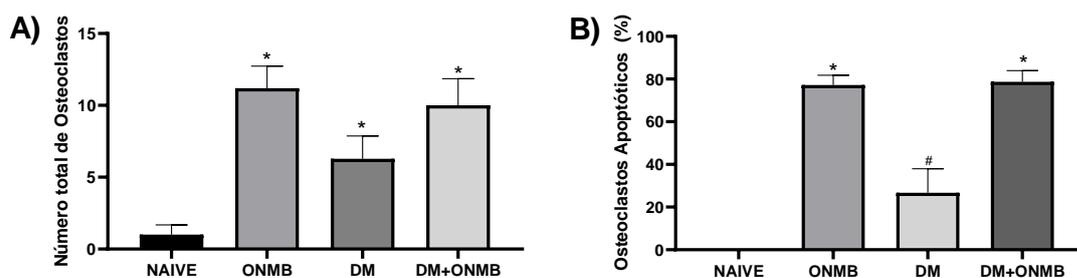


Figura 9: Efeitos dos protocolos experimentais de ONMB e DM no número de Osteoclastos para os grupos *Naive*, ONMB, DM e DM+ONMB. O número total de osteoclastos (A) e a porcentagem de osteoclastos apoptóticos (B) foram analisados no tecido ósseo periférico do osso em cicatrização pós exodontia, sendo fotografados sítios da região superior, intermediária e apical do mesmo. Assim, o número total de osteoclastos foi dividido pela quantidade total de sítios fotografados. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

A administração de MET, no grupo ONMB + MET, não influenciou de forma importante no número de OCs totais (8.33 ± 0.84), mas reduziu a porcentagem de OCs apoptóticos (40.09 ± 6), em comparação aos animais do grupo ONMB (Figuras 10 A e B).

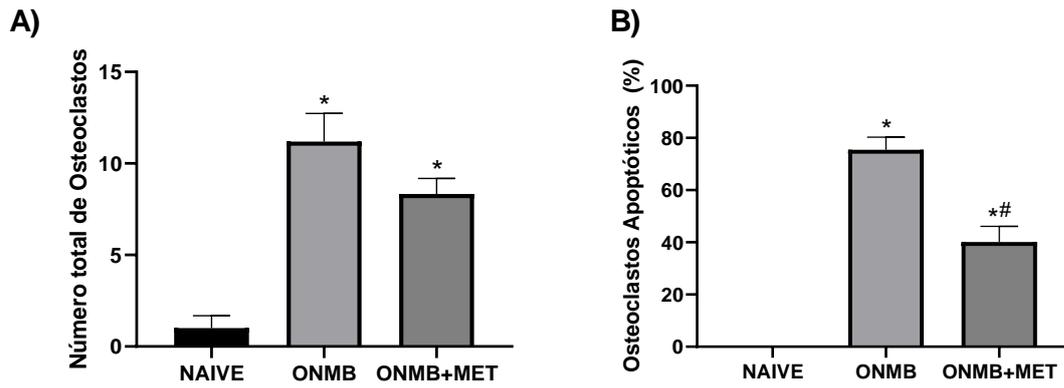


Figura 10: Efeitos dos protocolos experimentais de ONMB e DM no número de Osteoclastos para os grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET. O número total de osteoclastos (A) e a porcentagem de osteoclastos apoptóticos (B) foram analisados no tecido ósseo periférico do osso em cicatrização pós exodontia, sendo fotografados sítios da região superior, intermediária e apical do mesmo. Assim, o número total de osteoclastos foi dividido pela quantidade total de sítios fotografados. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle Naive. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

Expressão de TRAP por imunofluorescência

A atividade de OCs foi avaliada através da análise da expressão do marcador TRAP por imunofluorescência. Observou-se que tanto a administração de AZ, no grupo ONMB (20.28 ± 1.83), quanto a indução de DM, no grupo DM (29.88 ± 6.94), induziram um importante aumento na expressão de TRAP nos tecidos ósseos analisados, em relação ao grupo *Naive* (2.871 ± 0.74). Tal análise não mostrou resultado exacerbado em animais diabéticos submetidos à ONMB (19.46 ± 4.05), quando comparado ao grupo ONMB (20.28 ± 1.83) (Figuras 11 e 12).

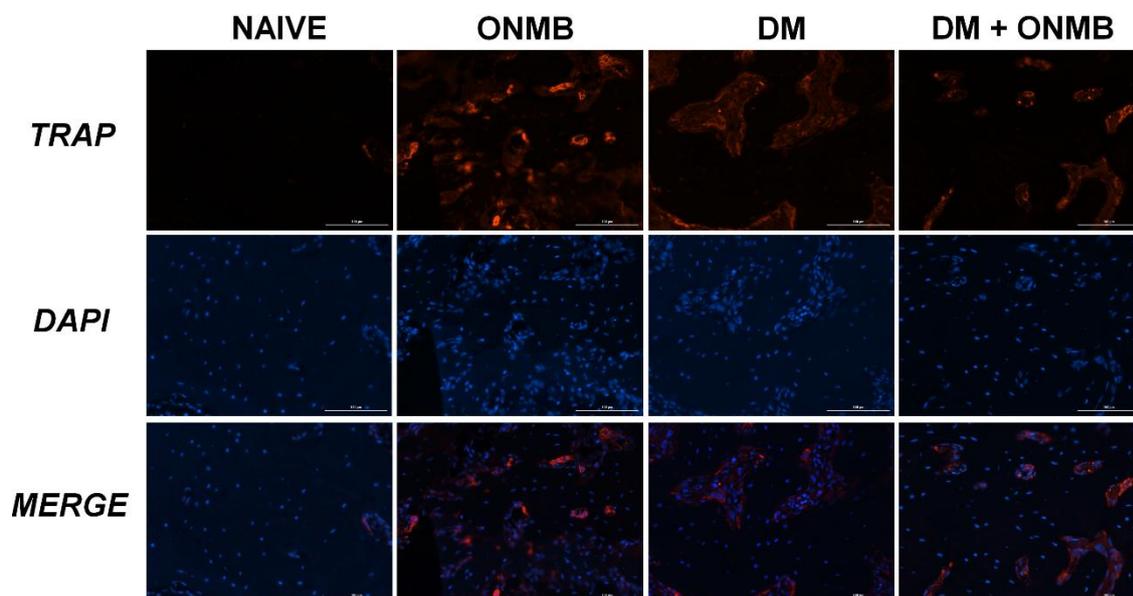


Figura 11: Imagens representativas da expressão de TRAP por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB, DM, DM+ONMB. Escala de 100 μ m.

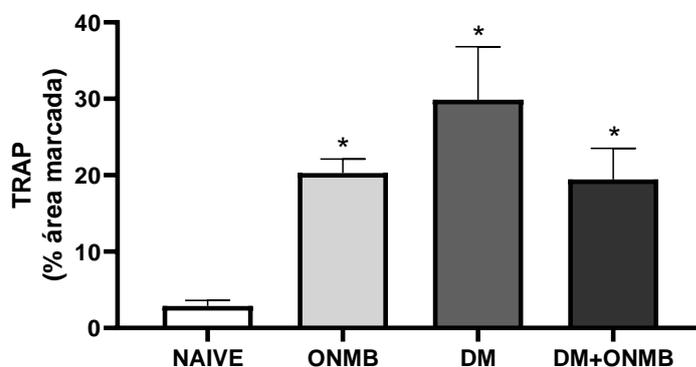


Figura 12: Efeito da indução da ONMB e de DM na expressão de TRAP por imunofluorescência. A análise foi realizada no tecido ósseo periférico do osso em cicatrização pós exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*.

Adicionalmente, os animais submetidos à ONMB e tratados diariamente com MET (43.24 ± 5.59) apresentaram um aumento significativo na expressão de TRAP, em comparação a animais submetidos à ONMB não tratados (20.28 ± 1.83) (Figuras 13 e 14).

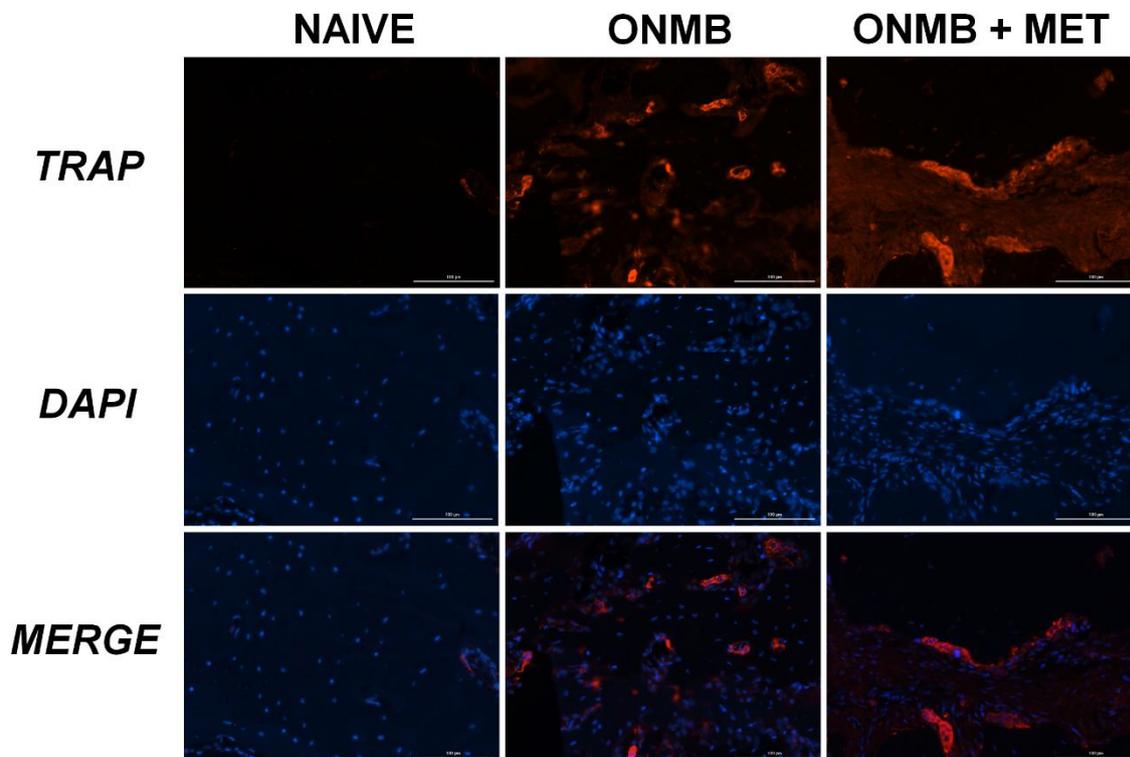


Figura 13: Imagens representativas da expressão de TRAP por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB e ONMB+MET. Escala de 100 μ m.

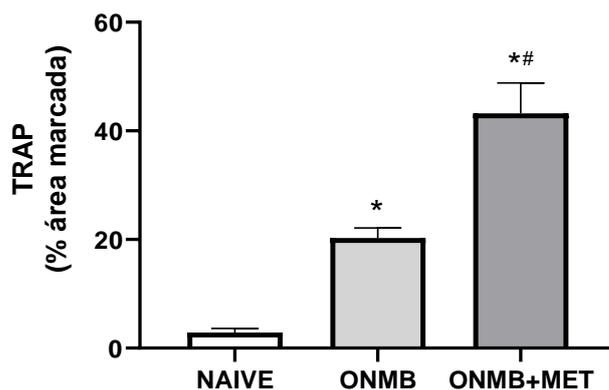


Figura 14: Efeito da administração de MET na expressão de TRAP por imunofluorescência em animais com ONMB. A análise foi realizada no tecido ósseo periférico do osso em cicatrização pós exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*.

6.3. Análise inflamatória no osso alveolar de espécimes mandibulares submetidos à exodontia

Número de células inflamatórias

A indução de ONMB (124.4 ± 15.29) e de DM (98.71 ± 33.22) causou um aumento significativo no número total de leucócitos, no tecido ósseo alveolar analisado, em comparação aos de animais pertencentes ao grupo *Naive* (49.5 ± 9.66). Em animais submetidos a ambos os protocolos experimentais, estes pertencentes ao grupo DB+ONMB (232.8 ± 39.54), observou-se elevação ainda mais expressiva especificamente no número total de leucócitos, com diferenças significantes quando comparado aos animais do grupo ONMB ou DM (Figura 15).

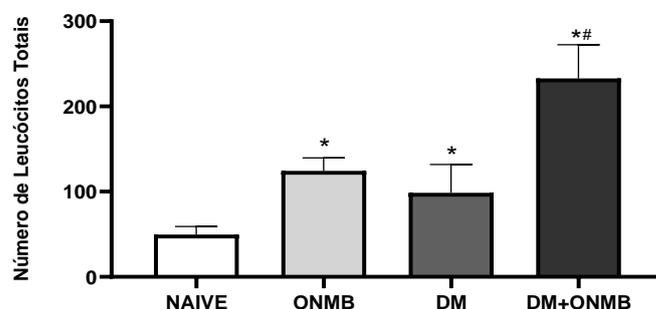


Figura 15: Efeito da indução da ONMB e de DM no número de leucócitos no tecido ósseo alveolar pós exodontia. A região analisada foi fotografada em sítios da região superior, intermediária e apical do mesmo. Assim, o número de células inflamatórias foi dividido pela quantidade total de sítios fotografados. * $p < 0,05$ representa os dados

estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

A administração diária de MET, entretanto, não foi capaz de prevenir o aumento do número de leucócitos totais em animais recebendo o AZ, segundo protocolo do presente estudo, conforme observado no grupo ONMB + MET (105.2 ± 1.09) (Figura 16).

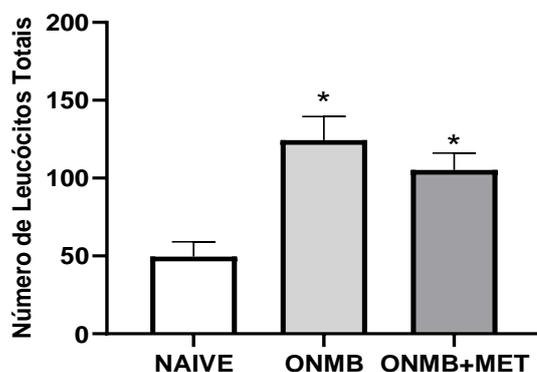


Figura 16: Efeito da administração de MET no número de leucócitos no tecido ósseo alveolar pós exodontia, em animais com ONMB. A região analisada foi fotografada em sítios da região superior, intermediária e apical do mesmo. Assim, o número de células inflamatórias foi dividido pela quantidade total de sítios fotografados. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*.

Quanto à proporção polimorfonucleares:mononucleares por grupo, esta foi de 15,5%:84,5% e 13,3%:83,7% para os grupos ONMB e DM, respectivamente, com diferenças significantes em comparação ao grupo *Naive*, o qual apresentou esta proporção em 3,5%:96,5%. Além disso, essa proporção no grupo DM + ONMB foi de 24,4%:75,6%, que também apresentou diferenças significantes em relação aos animais *Naive*. Porém, com relação ao grupo de animais com ONMB tratados com MET, as respectivas porcentagens foram de 6%:94%, sendo similares àquelas do grupo *Naive* (Figura 17).

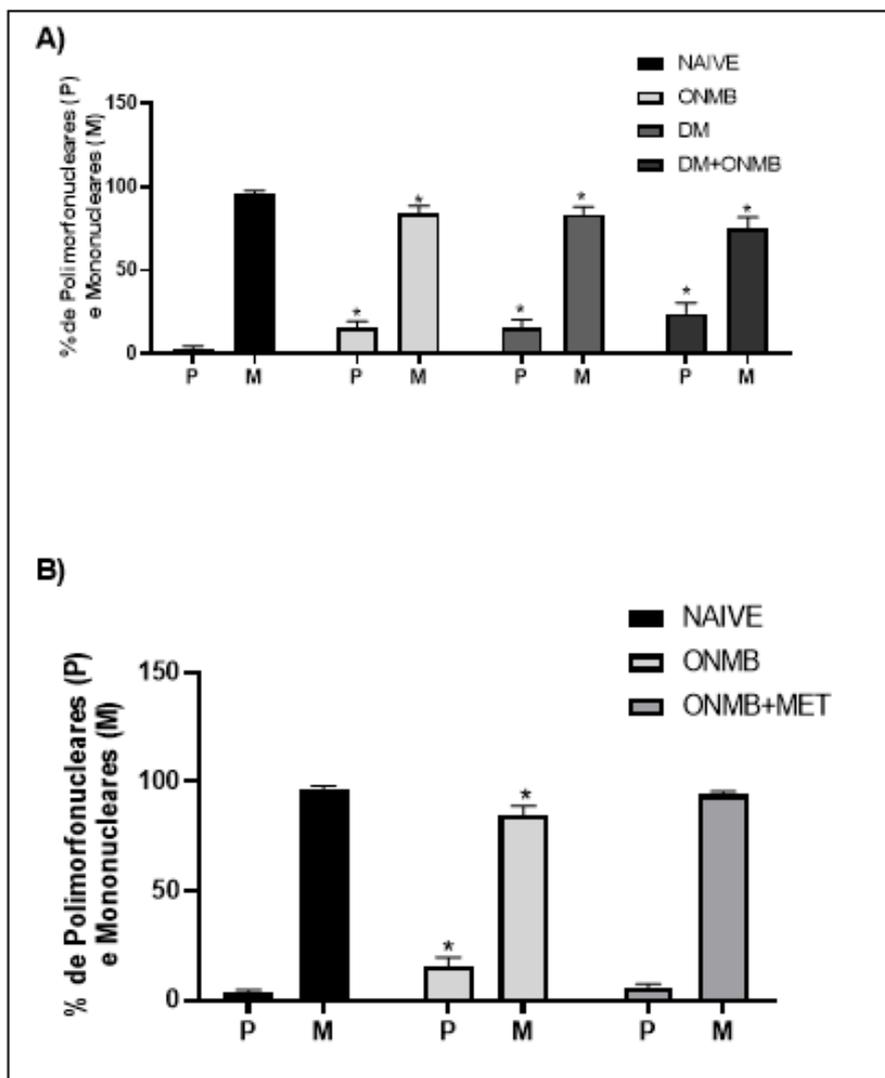


Figura 17: Porcentagem de polimorfonucleares e mononucleares no tecido ósseo alveolar pós exodontia. A região analisada foi fotografada em sítios da região superior, intermediária e apical do mesmo. Assim, o número de células inflamatórias foi dividido pela quantidade total de sítios fotografados. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*.

Expressão de F4-80 por imunofluorescência

O F4-80 é um marcador restrito da presença de macrófagos e sua expressão foi analisada através de imunofluorescência do tecido ósseo alveolar em cicatrização pós exodontia. A saber, ambos os protocolos experimentais de ONMB e de DM apresentaram resultados equivalentes e, portanto, em ambos os grupos ONMB (8.41 ± 0.87) e DM (8.85 ± 1.1), observou-se aumento da expressão deste marcador de forma significativa em comparação aos animais do grupo controle *Naive* (2.9 ± 0.36). Interessantemente, na condição de hiperglicemia concomitante à administração de AZ, observou-se intensificação deste aumento na expressão de F4/80, de modo que o grupo DM+ONMB

(13.47 ± 3.66) apresentou aumento significativo deste parâmetro em comparação aos animais dos grupos ONMB (8.41 ± 0.87) ou DM (8.85 ± 1.1) (Figuras 18 e 19).

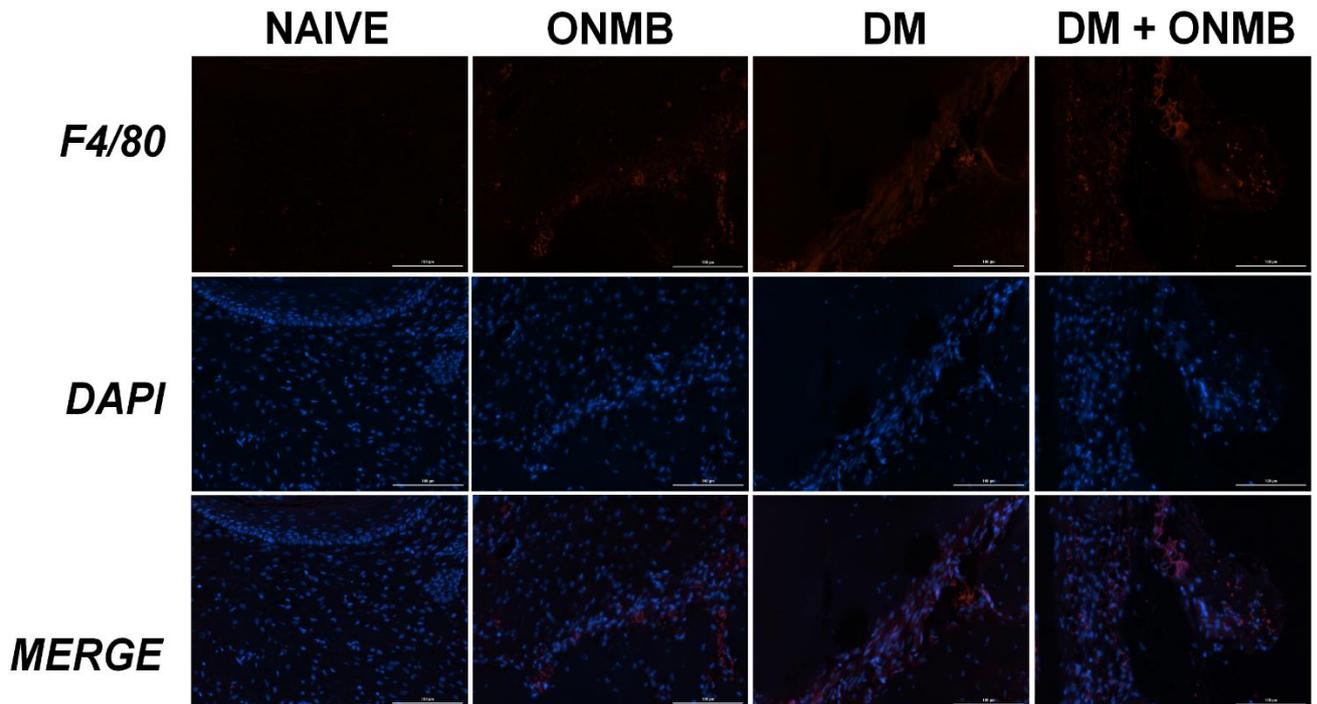


Figura 18: Imagens representativas da expressão de F4/80 por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB, DM, DM+ONMB. Escala de 100 µm.

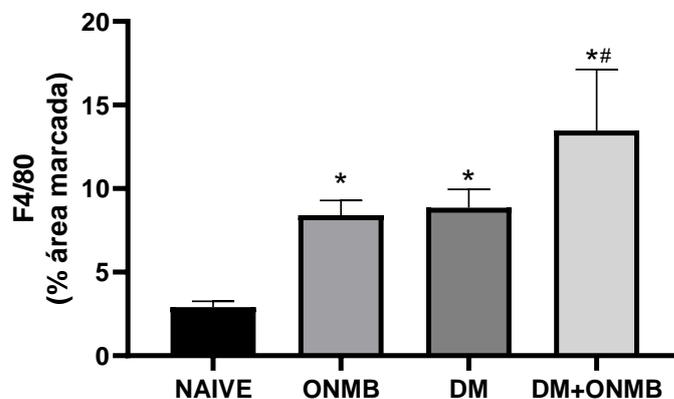


Figura 19: Efeito da indução da ONMB e de DM na expressão de F4/80 por imunofluorescência. A análise foi realizada no tecido ósseo periférico do osso em cicatrização pós exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

Além disso, observou-se que o tratamento diário com MET foi capaz de reduzir a expressão de F4/80 (3.37 ± 0.33) de forma significativa em animais submetidos à ONMB (8.41 ± 0.87) (Figuras 20 e 21).

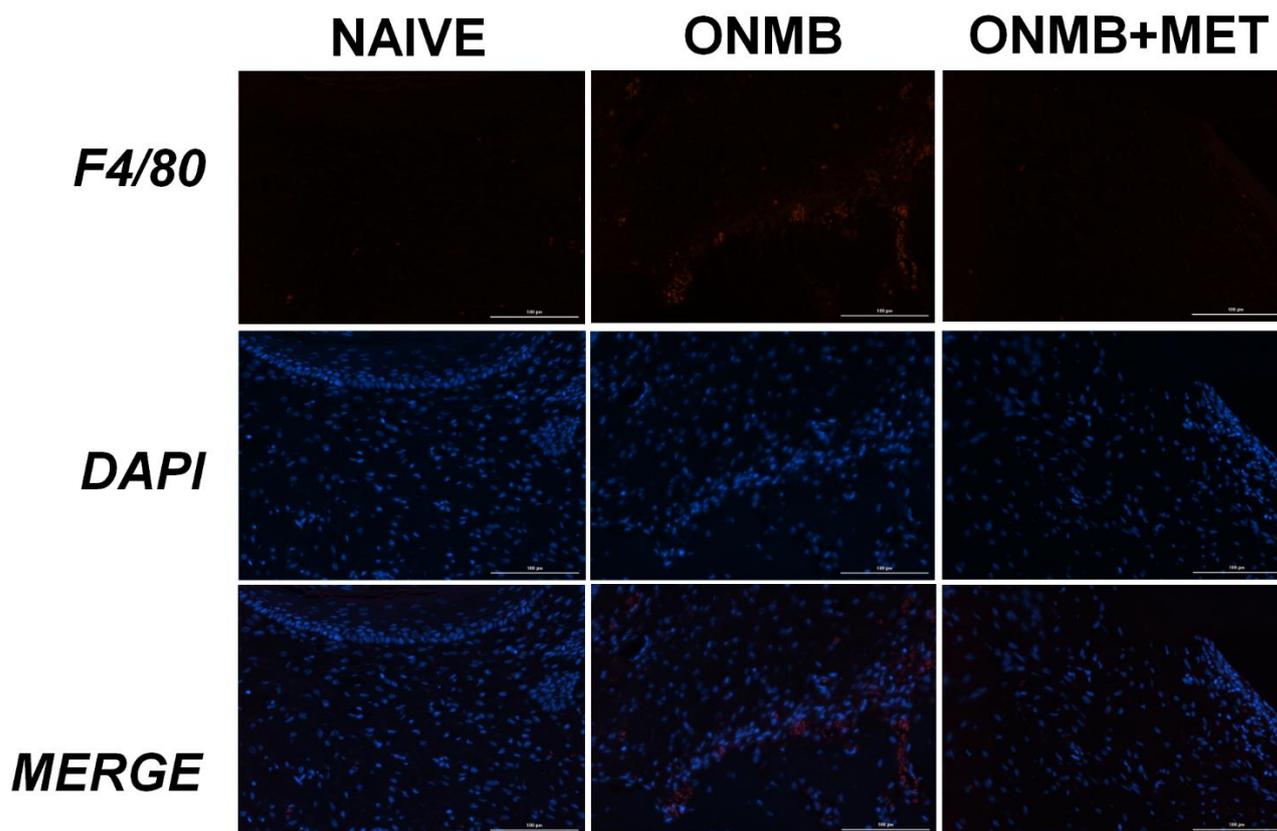


Figura 20: Imagens representativas da expressão de F4/80 por imunofluorescência nos grupos *Naive*, ONMB, ONMB+MET. Escala de 100 µm.

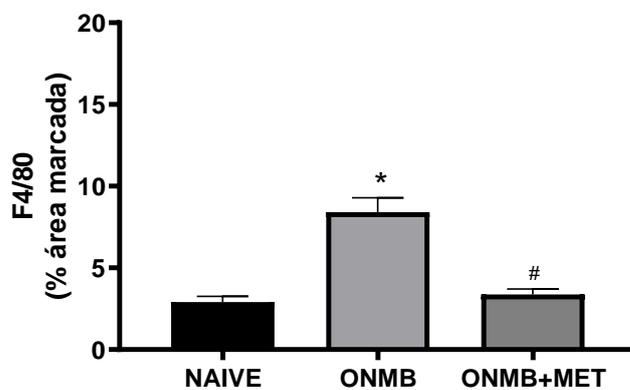


Figura 21: Efeito da administração de MET em animais *Naive* e submetidos à ONMB na expressão de F4/80 por imunofluorescência. A análise foi realizada no tecido ósseo periférico do osso em cicatrização pós exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

6.4. Análise da atividade de MPO no tecido gengival adjacente à área de exodontia de espécimes mandibulares submetidos à exodontia

A atividade de MPO é um parâmetro importante na análise da atividade dos neutrófilos. No referido protocolo experimental, observou-se que a administração de AZ causou um aumento deste parâmetro inflamatório nos espécimes analisados do grupo ONMB (550.2 ± 239), em comparação ao do grupo *Naive* (57.51 ± 13.64). O DM aumentou a atividade dos neutrófilos de maneira importante (323.4 ± 113.4), quando comparado ao grupo *Naive* (57.51 ± 13.64) e aumentou este resultado em animais recebendo AZ (1141 ± 341.8) (Figura 22).

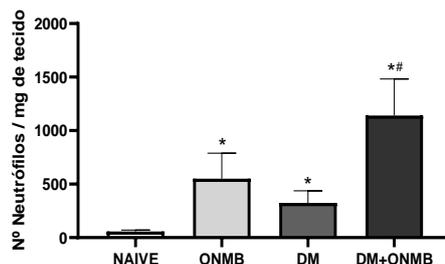


Figura 22: Efeito da indução de ONMB e DM na atividade de MPO no tecido gengival. A amostra gengival foi obtida na região circunjacente à área de exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

O tratamento diário com MET preveniu este aumento (108 ± 31.43), indicando reduzir a atividade de neutrófilos de forma significativa em comparação aos animais do grupo ONMB (550.2 ± 239) (Figura 23).

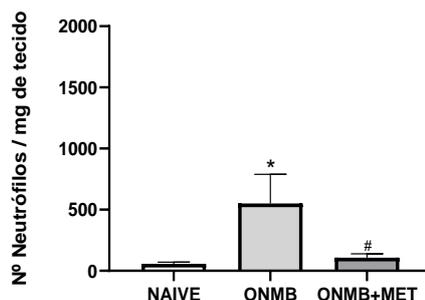


Figura 23: Efeito da indução de ONMB e administração de MET na atividade de MPO no tecido gengival. A amostra gengival foi obtida na região circunjacente à área de exodontia. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle *Naive*. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle ONMB.

6.5. Análise inflamatória em macrófagos *in vitro* tratados com AZ e/ou MET

Efeito do AZ e da MET na viabilidade celular em cultura de RAW 267.4

O tratamento com AZ não apresentou efeitos significantes na viabilidade de RAW 264.7 em nenhuma das concentrações (μM) utilizadas no presente estudo nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas (Figura 24).

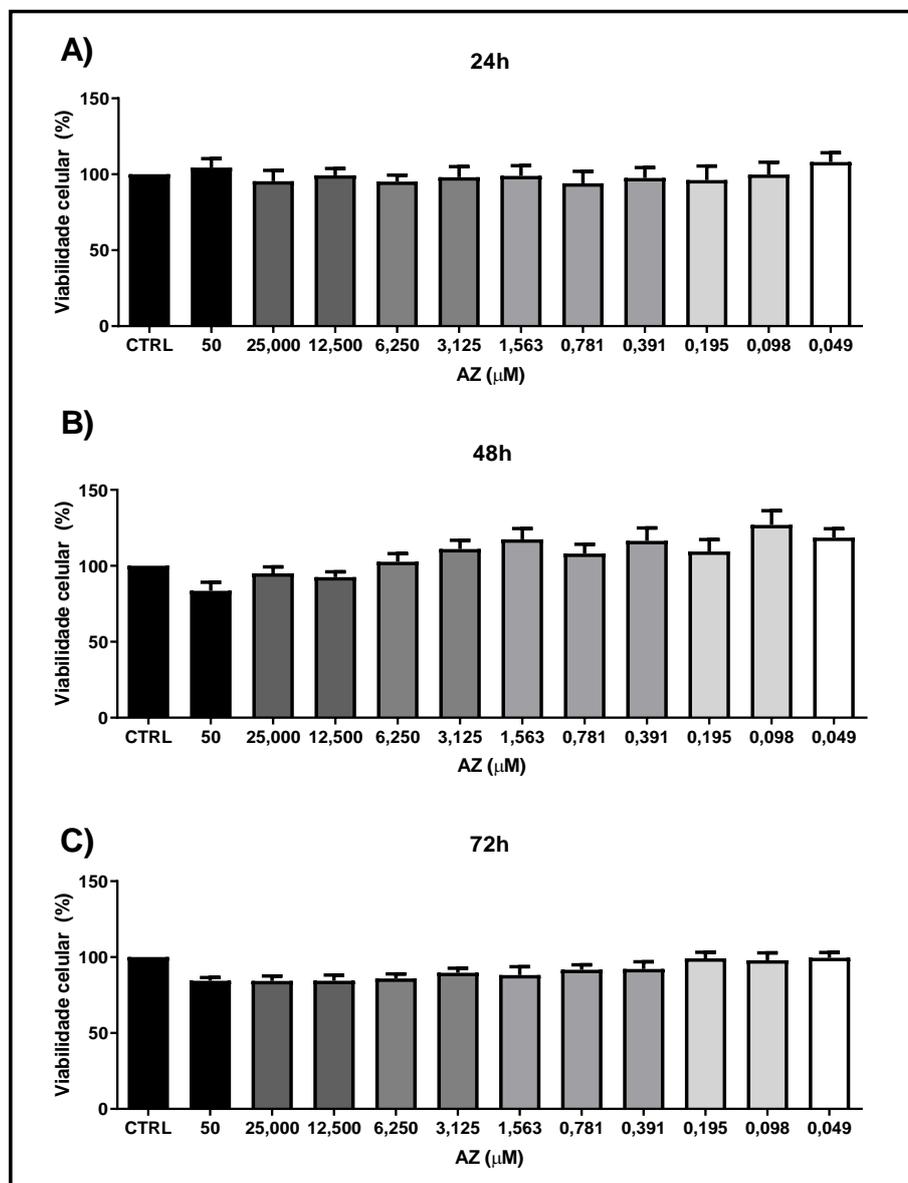


Figura 24: Efeito de diferentes concentrações do AZ na viabilidade de RAW 264.7. Os tempos de incubações foram de 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas.

Diferentemente, o tratamento com MET resultou em crescimento celular importante na concentração de 4Mm no tempo de incubação de 24 horas (Figura 25 A). Esse resultado, porém, não foi observado nos tratamentos com essa mesma concentração em 48 e 72 horas (Figura 25 B e C). Em outras concentrações utilizadas no presente estudo,

nos tempos de 24, 48 e 72 horas, não foram observados efeitos importantes da MET na viabilidade celular (Figura 25 A, B e C).

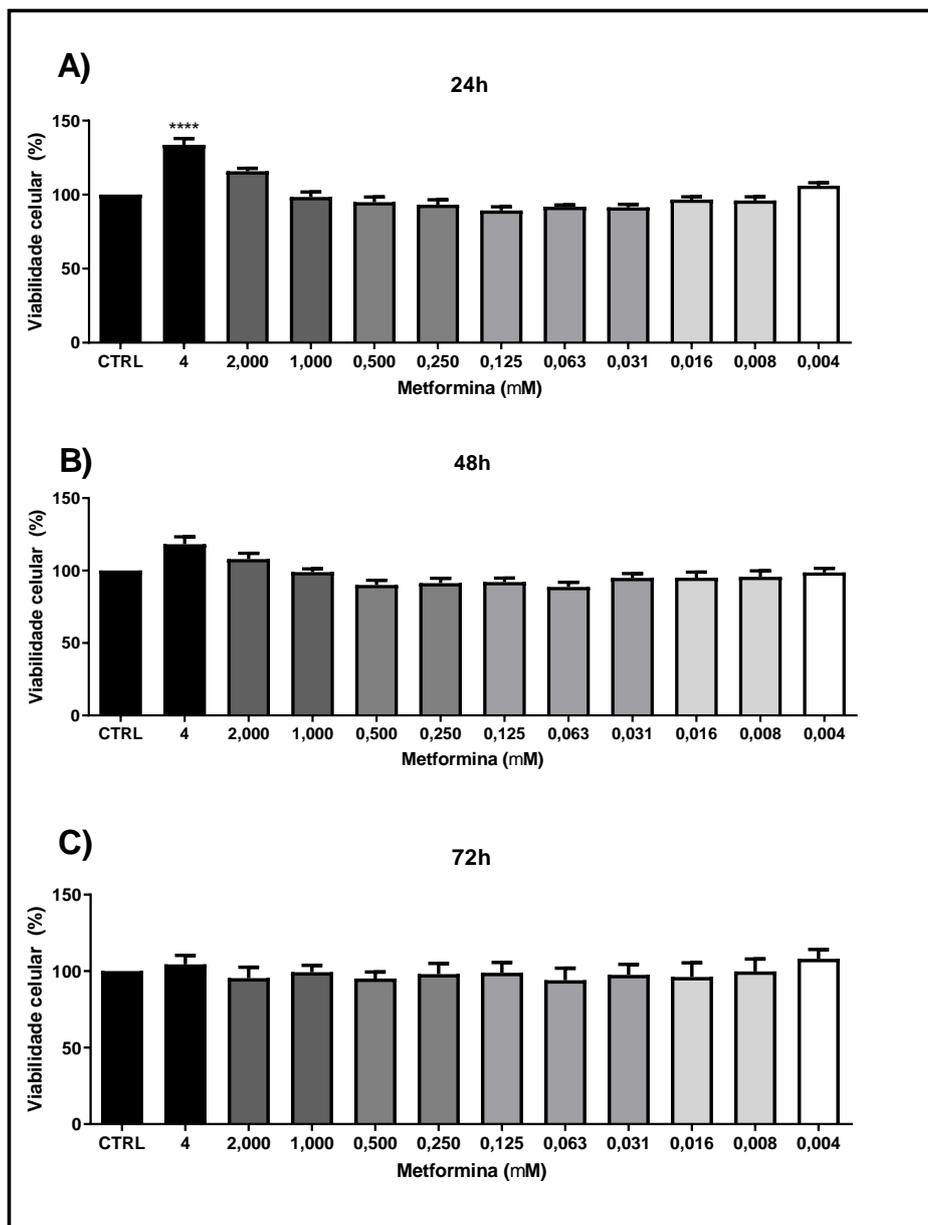


Figura 25: Efeito de diferentes concentrações de MET na viabilidade de RAW 264.7. Os tempos de incubações foram de 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas.

Dosagem de IL-1 β no sobrenadante da cultura de RAW 267.4

O tratamento com AZ e MET para análise de concentração de IL-1 β no sobrenadante de cultura celular foi realizado utilizando as concentrações de 10 μ M para AZ e de 4mM para MET, com período de incubação de 24 horas. Tais concentrações de AZ estão de acordo com a literatura científica (HAN et al., 2018; KALKAR et al., 2022) e não prejudicaram o crescimento celular avaliado em nosso estudo. A concentração de 4Mm

para MET foi escolhida para o ensaio de ELISA por esta ter causado uma elevação importante no crescimento celular no tempo de 24 horas.

Observou-se que o tratamento com AZ induziu uma elevação significativa da concentração de IL-1 β (68.74 ± 7.21) em relação ao DMEM (0.00 ± 0.00) e ao sobrenadante tratado com MET (17.83 ± 17.83). O tratamento concomitante de MET com AZ preveniu esse aumento de maneira importante (0.00 ± 0.00) (Figura 26).

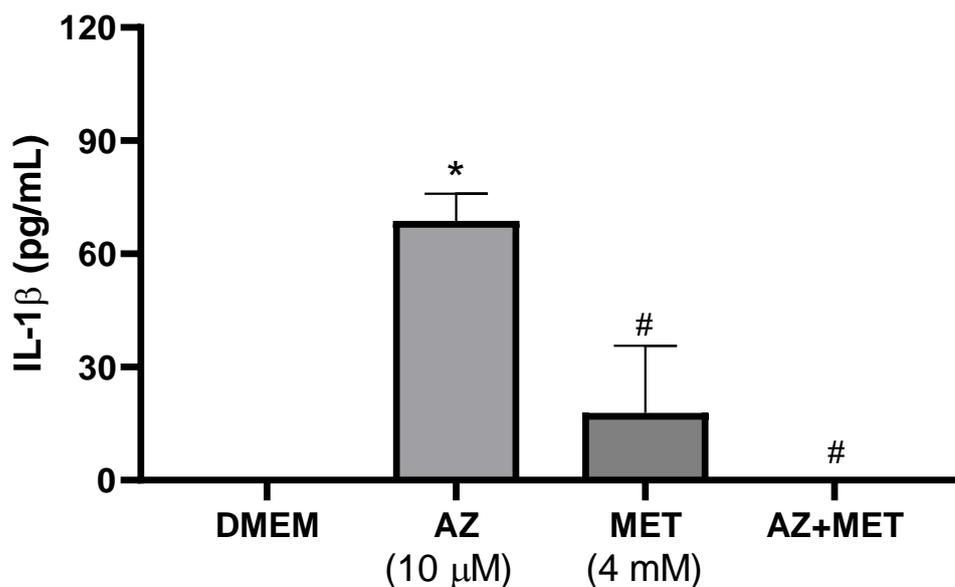


Figura 26: Efeito do tratamento de AZ (10 μ M) e/ou MET (4mM) na concentração de IL-1 β no sobrenadante de cultura celular RAW 2647. * $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao controle DMEM. # $p < 0,05$ representa os dados estatisticamente significantes em comparação ao grupo AZ.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, o protocolo experimental de ONMB não causou alterações significantes na glicemia em jejum e variação de massa corpórea dos animais em relação àqueles do grupo *Naive*. Já a indução DM através da injeção única de Alozano causou hiperglicemia nos animais de forma satisfatória, os quais apresentaram os valores glicêmicos de no mínimo de 130 mg/dl e diferenças significantes em relação aos referidos valores no grupo *Naive*. Clinicamente, tais animais foram acompanhados por baixo ganho de massa corpórea (g), apresentando valores discrepantes em comparação a animais não diabéticos, dentre outros sinais, como cegueira, diurese e alta mortalidade. Com relação à variação de massa corpórea, além dos animais diabéticos, aqueles que receberam MET por todo protocolo experimental apresentam menores valores de ganho de peso em comparação aos do grupo *Naive* e ONMB. De fato, a literatura científica relata que a MET tem sido útil no controle de peso em pacientes obesos (YEREVANIAN; SOUKAS, 2019), melhora a sensibilidade periférica à insulina (CREE-GREEN et al., 2019) e é o principal fármaco útil no controle glicêmico no DM2 (RANGEL & INZUCCHI, 2017).

O AZ é um dos BFs mais utilizados mundialmente por via endovenosa com finalidade principal de prevenção de metástases ósseas em situações de risco (COLEMAN et al., 2011; CARLOS et al., 2023). O seu mecanismo de ação baseia-se primordialmente na inibição de OCs, de tal forma que a utilização deste fármaco inibe a reabsorção óssea. Consequentemente, o processo de remodelação do osso alveolar visando renovação ou reparo ósseo torna-se prejudicado, uma vez que não há efetivamente a formação da lacuna de reabsorção óssea primária, o pontapé inicial na dinâmica do *turnover* ósseo (SINGH & GONEGANDLA, 2020; JENSEN et al., 2021). Além disso, o AZ também tem sido reconhecido por seu efeito anti-angiogênico (WOOD et al., 2002; YAMADA et al., 2009; DI SALVATORE et al., 2011), o que contribui para seu potencial anti-metastático. Contudo, tal fármaco tem sido paralelamente associado à necrose óssea, o principal efeito adverso decorrente do seu uso.

Assim, no presente estudo, a utilização endovenosa do AZ na dose de 0,2 mg/kg, nos dias experimentais 0, 7, 14 e 49, aliada a trauma ósseo executado no 42º dia experimental, foi capaz de induzir intensamente áreas de necrose óssea nos espécimes mandibulares analisados. A saber, a formação de lacunas de osteócitos vazias foi proporcionalmente relacionada à quantificação de osso necrótico em nosso estudo, uma vez que esse achado é considerado critério essencial para determinação de ONMB (SILVA et al., 2015; SOMA et al., 2022). Além disso, a observação de poucas células nas

regiões imediatamente circunvizinhas ao osso necrótico também foi característica marcante de necrose óssea observada na presente pesquisa.

Considerando a ONMB uma doença influenciada pela presença de mediadores pró-inflamatórios e com mecanismos patológicos envolvendo possivelmente a participação de outros tipos celulares ademais dos OCs (KANEKO et al., 2018), como os macrófagos, ainda não completamente elucidados pela literatura científica, nós também pretendemos avaliar o efeito da hiperglicemia, uma condição inflamatória crônica, e da utilização de MET, um fármaco antidiabético com potenciais anti-inflamatório e imunomodulador (KANG et al., 2017; PODHORECKA, IBANEZ & DMOSZYŃSKA, 2017; TAN et al., 2020), na evolução de parâmetros associados à ONMB. Assim, a hiperglicemia foi provocada pela administração endovenosa única de Aloxano, induzindo a situação de DM, enquanto que a administração de MET ocorreu por gavagem diariamente durante todo o protocolo experimental, uma vez que a via de administração oral é considerada padrão na utilização crônica deste fármaco, com poucas possibilidades de efeitos adversos (SHURRAB; ARAFA, 2020).

Com relação ao parâmetro de necrose óssea proporcional à quantificação de lacunas de osteócitos vazias, observou-se que estatisticamente o DM induziu, por si, a ON de forma significativa em comparação a animais representando condições basais (grupo *Naive*), porém não potencializou este parâmetro em animais fazendo uso de AZ no presente estudo. Entretanto, salientamos que o presente protocolo experimental de ONMB foi caracterizado por intensa área de necrose e o platô deste efeito, uma vez possivelmente atingido, poderia não ter permitido observamos algum impacto do DM na necrose óssea.

Sabe-se que achados prévios essencialmente clínicos indicam o DM como um fator de risco ao desenvolvimento de ONMB (PEER; KHAMAISI, 2015; RAHIMI-NEDJAT et al., 2016), sugerindo mecanismos patogênicos no DM relacionados ao favorecimento da apoptose de OBs ou osteócitos e à redução da microcirculação óssea, podendo, inclusive, o DM induzir, por si, necrose óssea avascular de forma não traumática (KONARSKI et al., 2022). Em relação aos estudos *in vivo*, observa-se escassez de dados comparando a ONMB em animais com ou sem DM induzida por aloxano ou estreptozotocina, o que aumenta a relevância do presente achado em nosso estudo.

Enquanto isso, em nosso estudo, a administração diária de MET reduziu o número de lacunas de osteócitos vazias, em comparação ao grupo ONMB não tratado. Nenhum outro estudo científico avaliou o efeito da administração oral de MET por 77

dias experimentais, iniciando previamente à primeira injeção de AZ, em animais com ONMB induzida exclusivamente por BFs (AZ a 0,2 mg/kg). Contudo, podemos destacar que o efeito protetor da MET contra a ONMB observado em nosso protocolo experimental está em concordância a um estudo prévio, em que a administração diária de MET (250 mg/kg), por gavagem, reduziu a ocorrência de ONM induzida por AZ (0,1 mg/kg) e corticoide em um protocolo experimental de 6 semanas (NAKAGAWA et al., 2020). Nesse sentido, vale salientar que, apesar da MET ser considerada agonista AMPK (BAHRAMBEIGI et al., 2019; RENA; HARDIE & PEARSON, 2017; THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019) e regular negativamente a função de OCs (BAHRAMBEIGI et al., 2019), o que poderia exacerbar o efeito da ONMB no presente estudo, é também por via AMPK (BAHRAMBEIGI et al., 2019; RENA, HARDIE & PEARSON, 2017; THAKUR, DALEY & KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019) que ela regula positivamente a expressão de genes que favorecem a atividade osteoblástica (PARK et al., 2020), tal como o RUNX2 e a osteocalcina, além de aumentar a atividade de fosfatase alcalina óssea, um marcador da atividade de osteoblastos (BAHRAMBEIGI et al., 2019; JIATING, BUYUN & YINCHANG, 2019). Adicionalmente, tem sido observado que a MET estimula o receptor do VEGFR, de tal forma que contribui para a angiogênese e microcirculação local (BAKHASHAB et al., 2018). Tais fatores podem ter influenciado neste efeito protetor da MET evidenciado em nosso estudo.

Quanto aos efeitos em células osteoclásticas, observamos que o protocolo experimental de ONMB na presente pesquisa científica foi acompanhado por um aumento significativo no número total de OCs. Tal resultado pode parecer paradoxal ao efeito inibitório dos BFs sobre os OCs. Entretanto, tem sido descrito que o número de OCs na superfície óssea, após administração de BFs, tende a aumentar inicialmente e apenas após um período mais prolongado é que esse número se encontra reduzido (KUROSHIMA, GO & YAMASHITA, 2012; GROSS et al., 2017).

Assim, nossos resultados estão em conformidade com relatos prévios em que a ONMB foi caracterizada pelo aumento do número de OCs (GROSS et al., 2017; KUROSHIMA, GO & YAMASHITA, 2012) e alguns autores consideram que esse fato ocorre de forma compensatória decorrente da indução de apoptose dos OCs pelo uso de BFs (GROSS et al., 2017). A saber, alguns achados prévios também relatam o aumento da expressão de NFATc1, um regulador mestre da osteoclastogênese, em OCs de espécimes oriundos de pacientes com ONMB, indicando que esse o mesmo também ocorre de forma compensatória (WEHRHAN et al., 2019). Além disso, observamos que

boa parte da elevação do número de total de OCs decorrente da administração de AZ no grupo ONMB, conforme protocolo experimental em nosso estudo, ocorreu às custas do aumento significativo do número de OCs considerados morfológicamente apoptóticos, os quais apresentaram núcleos celulares com condensação de cromatina nuclear e vacuolização intracitoplasmática, corroborando a relatos prévios (GROSS et al., 2017).

Adicionalmente, constatamos que a hiperglicemia, por si, representada pelo DM, também aumentou o número total de OCs em comparação ao grupo *Naive* e, por ser considerada uma situação pró-inflamatória sistêmica crônica caracterizada pelo aumento da concentração tecidual periférica de mediadores pró-inflamatórios, tal resultado pode ter ocorrido pelo estímulo direto e indireto à função osteoclástica, com indução da osteoclastogênese e aumento da razão RANKL/OPG (FORDE et al., 2018). Entretanto, diferentemente da situação de ONMB, no contexto de DM, não observamos alterações no número de OCs apoptóticos em comparação ao grupo *Naive*. Além disso, foi observado que o DM não potencializou de forma significativa no aumento do número total de OCs, nem mesmo na quantidade de OCs apoptóticos, em animais com ONMB.

No presente contexto da ONMB em nosso estudo, observamos que a MET não influenciou nesta possível reação compensatória representada pelo aumento do número total de OCs causada pela administração de AZ, a qual foi mencionada anteriormente. Por outro lado, observamos que a MET reduziu significativamente a porcentagem de OCs apoptóticos em animais submetidos ao protocolo experimental de ONMB, reduzindo a proporção de OCs apoptóticos/OCs totais.

Nosso estudo foi o primeiro a avaliar o efeito da administração de MET no número de OCs totais e apoptóticos em um modelo experimental de ONMB. Apesar de existirem relatos de que tal fármaco regula negativamente e induz a apoptose de OCs por ativar AMPK (BIAN et al., 2021; PARK et al., 2020), tais resultados encontrados devem ser melhor investigados e podem ser associados à dose de MET ou ao tempo de protocolo experimental em nosso estudo, uma vez que tem sido observado que apenas altas doses de MET é capaz de causar a apoptose de OCs (BIAN et al., 2021).

Mediante os dados obtidos na contagem de OCs, analisamos a expressão de TRAP através de imunofluorescência em nosso protocolo experimental por este ser considerado um eficiente método de avaliação da atividade de OCs. Com isso, observamos que a ONMB foi acompanhada por um aumento significativo na expressão deste marcador. Apesar de relatos prévios em que os BFs induzem uma menor responsividade de OCs, sendo representada por reduzida expressão de TRAP

(NAGAOKA et al., 2015; GROSS et al., 2017), nosso resultado está em conformidade com um achado prévio em que um aumento na expressão de TRAP também foi encontrado em espécimes mandibulares de animais submetidos à administração de AZ (NAKAGAWA et al., 2021). Além disso, a literatura sugere um aumento de RANKL em osteoblastos submetidos ao AZ *in vitro* (SARACINO et al., 2012), de tal forma que esse fato, eventualmente, pode estar relacionado tanto ao aumento da expressão de TRAP como do número total de OCs apresentado em nosso estudo. De certa forma, observamos que o aumento da expressão de TRAP foi proporcional ao aumento do número de OCs em animais com ONMB.

A situação de DM, por sua vez, também aumentou a expressão de TRAP, corroborando estudos prévios em que o aumento significativo da atividade de OCs ocorreu em condições inflamatórias crônicas, as quais são fortemente caracterizadas por reabsorção óssea (DE MOLON et al., 2019; AIT OUMGHAR, BARKAOUI & CHABRAND, 2020; KITAURA et al., 2020). Ainda no presente estudo, em comparação a animais do grupo ONMB, o DM, por si, não causou diferenças significantes nesta análise e, portanto, não intensificou a expressão de TRAP nesses animais. Tais resultados, em adição aos aqui apresentados anteriormente, sugerem que a hiperglicemia não apresenta efeitos proeminentes diretos no metabolismo do tecido ósseo em animais submetidos ao protocolo experimental de indução da ONMB preconizado em nosso estudo.

Enquanto isso, observamos que a administração de MET durante os 77 dias experimentais causou um aumento importante na expressão de TRAP em animais com ONMB. Tal resultado pode, aparentemente, ser contraditório a relatos anteriores em que a MET não causou alterações significantes na expressão de TRAP em um protocolo experimental de ONMB (NAKAGAWA et al., 2021), bem como a outros em que a MET inibe OCs. (PARK et al., 2020; BIAN et al., 2021). Entretanto, o presente resultado complementa nossos dados obtidos na quantificação de lacunas vazias de osteócitos e na contagem de OCs, em que a MET reduziu a lesão de ON e a porcentagem de OCs apoptóticos. Quanto especificamente à apoptose dos OCs, sugere-se que o efeito anti-angiogênico dos BFs, ao prejudicar o suprimento de nutrientes celulares e a acumulação de metabólitos tóxicos, influencie diretamente na morte celular destas células (OR et al., 2013; SRIVICHIT et al., 2022). Nesse contexto, considera-se que a MET tem demonstrado exercer um efeito regulatório no processo da angiogênese em situações de hipóxia ou isquemia tecidual (REN & LUO, 2021), o que pode ter favorecido os presentes

resultados relacionados parâmetros ósseos analisados. Além disso, é importante frisar a participação de mediadores pró-inflamatórios na etiopatogênese da ON induzida por AZ, de tal forma que tais dados nos encorajaram a investigar o potencial anti-inflamatório da MET no presente modelo experimental.

Com relação aos parâmetros inflamatórios na região da exodontia, foram consideradas as contagens de leucócitos nos espécimes corados em HE, bem como imunofluorescência de F4/80, considerado um marcador de macrófagos. Assim, observamos que ONMB induziu um aumento significativo no número de leucócitos totais, elevando a população de polimorfonucleares e mononucleares, o que foi correspondente ao importante aumento da expressão de F4/80 no tecido ósseo de animais do grupo ONMB, em comparação ao grupo *Naive*. Esse resultado está em conformidade a outros anteriormente apresentados pela literatura científica, em que a administração sistêmica de AZ causou aumento da população de células inflamatórias e que a ONMB está associada à inflamação (DE BARROS SILVA et al., 2015; KANEKO et al., 2018). Na verdade, o papel de leucócitos e de mediadores pró-inflamatórios na patogênese da ONMB ainda permanece incerto. Sugere-se, entretanto, que um aumento na concentração de citocinas como TNF- α , IL1 β , IL-6, dentre outras pró-inflamatórias, seja importante no desenvolvimento da ONMB. Sabe-se que tais citocinas tendem a induzir osteoclastogênese e aumentam a demanda do *turnover* ósseo (DE MOLON et al., 2019; AIT OUMGHAR, BARKAOUI & CHABRAND, 2020; KITAURA et al., 2020). Em outras palavras, em pacientes susceptíveis, como no caso daqueles fazendo uso de BFs, tal demanda, uma vez aliada à inibição de OCs, não estaria sendo suprimida, o que pode induzir mais facilmente a ON.

O DM, por si, também causou um resultado similar à ONMB em relação a estes parâmetros inflamatórios. Este achado já era esperado, tendo em vista que DM, apesar de ser uma patologia sistêmica, causa aumento na inflamação em tecidos periféricos (WADA & MAKINO, 2016; LI et al., 2023;). Inclusive, ao observarmos o grupo DM+ONMB, nota-se que a hiperglicemia potencializou o aumento do número de leucócitos e da expressão de F4/80 na região da exodontia, significativamente em comparação ao grupo ONMB.

Quanto aos efeitos da administração sistêmica de MET sobre o número total e diferencial de leucócitos e a expressão de F4/80 na região da exodontia de espécimes de animais com ONMB, observamos que a MET não preveniu o aumento do número de leucócitos provocado pelo tratamento com AZ na análise em HE, embora, ainda no

presente estudo, os animais submetidos à ONMB e ao pré-tratamento com MET apresentaram redução significativa da expressão de F4/80 na imunofluorescência em relação ao grupo ONMB. Essa divergência de resultados pode decorrer da diferença metodológica na sensibilidade de apurar a quantidade de células inflamatórias entre coloração por HE e imunofluorescência, sendo este último um método mais atual com superior sensibilidade e amplificação de sinal.

Adicionalmente, considerando o efeito proeminente dos BFs no tecido ósseo, induzindo a lesão de ON representada por redução da microcirculação especialmente neste tecido, o que poderia reverberar no infiltrado inflamatório, decidimos complementar nossa avaliação de parâmetros inflamatórios obtidos no tecido ósseo ao tecido mole gengival circunjacente à área necrótica através da medição da atividade de MPO, o que nos permitiu contabilizar o número de neutrófilos por mg de tecido.

Nessa análise, observamos que a ONMB induziu um aumento da atividade de neutrófilos no tecido avaliado, em comparação ao grupo *Naive*. Nesse contexto, vale salientar que a literatura indica que os BFs podem prejudicar a quimiotaxia e a função de neutrófilos especificamente no tecido ósseo (FAVOT, FORSTER & GLOGAUER, 2013). Contudo, a presente análise no tecido gengival está em conformidade a um estudo prévio em que um BF aumentou a atividade de MPO em uma cultura de neutrófilos obtidos do fluido crevicular gengival de humanos (HYVONEN & KOWOLIK, 1992). Considerando que na ONMB há um retardo na cicatrização de feridas (LANDESBURG et al., 2008), acreditamos que nosso resultado possa decorrer do impacto da lesão de ONMB no tecido gengival, uma vez que este não se adere ao tecido ósseo necrosado, havendo falha na cicatrização periférica da lesão de ON provocada pelo AZ.

Ainda com relação à atividade de MPO, a hiperglicemia também foi associada a um aumento deste parâmetro, em comparação a animais do grupo *Naive*, bem como o potencializou em animais submetidos à ONMB. A literatura, por sua vez, também tem destacado efeitos diretos da hiperglicemia no aumento da atividade de MPO em tecidos periféricos (HIROTA, LEVY & IBA, 2020). Inclusive, tem sido descrito que a disfunção vascular no DM, como muito se observa em casos de isquemia tecidual associada à hiperglicemia, é mediada inicialmente por neutrófilos. Alguns autores explicam que estas células, uma vez ativadas no processo inflamatório, expressam importantes moléculas de adesão, como integrinas e selectinas, as quais se ligam às células endoteliais para promoverem a migração neutrofílica. Em seguida, tais células sofrem morte celular, liberando DNA e o conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos, como a própria MPO, que

contribuem, ainda mais, com o processo inflamatório. Essa liberação, é conhecida na literatura, como rede extracelular de neutrófilos (NET), a qual é importante por possuir ação antimicrobiana, mas cujos componentes são conhecidos como por induzirem efeitos pró-coagulantes na área circundante, prejudicando a vascularização local. Estudos prévios indicam que a formação de NET, no DM, pode ser estimulada pela hiperglicemia (HIROTA, LEVY & IBA, 2020).

Além disso, observamos que a MET reduziu a inflamação periférica no tecido gengival representada pela atividade da MPO, em animais submetidos à ONMB. De fato, achados prévios indicam que a MET foi capaz de diminuir o estresse oxidativo e o dano cerebral, com reduzida atividade de MPO em comparação a grupos controles, em animais com diabetes e câncer de próstata (OZEL et al., 2022). Entretanto, observamos também que mais estudos são necessários para mensurar se existe participação direta de neutrófilos do tecido gengival na patogênese da ONMB e, secundariamente, desta em associação a alguma terapêutica medicamentosa.

Salientamos que nosso estudo é o primeiro na literatura científica ao avaliar o efeito da MET sobre a expressão de F4/80 em osso mandibular e a atividade de MPO no tecido gengival de animais submetidos à ONMB. Nossos resultados encontrados mediante análises *in vivo* nos incentivaram a estudar o efeito anti-inflamatório da MET sobre a concentração de IL1 β no sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 tratados com AZ. Sabe-se que a transformação de precursores de IL-1 β em moléculas biodisponíveis está associada à desubiquitinação de pró-caspases, o que ocorre mediante à ligação destas a domínios intracelulares de receptores de reconhecimento em macrófagos, formando a base de ativação do complexo proteico definido como inflamassoma (SATO et al., 2015). Assim, esta é uma forma de averiguar indiretamente a ativação do inflamassoma através da produção de IL-1 β medida em sobrenadante de cultura de RAW 264.7 sob tratamento com AZ e/ou MET.

Na presente análise *in vitro*, observamos que o tratamento com AZ aumentou a concentração de IL1 β no sobrenadante celular. Poucos estudos avaliaram, de alguma forma direta ou indireta, a influência do inflamassoma e especificamente de IL-1 β no desenvolvimento da ONMB. Porém, tem sido relatado que o AZ aumentou a expressão de TLR-4 em macrófagos, induzindo a polarização destas células em favor do fenótipo M1, e que a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por esse BF, incluindo IL-1 β , ocorre de forma dependente da via de sinalização TLR-4 (ZHU et al., 2019). Além disso, em um estudo anterior, a indução de ONMB em animais diabéticos ocorreu por

mecanismo dependente de IL-1 β (ZHANG et al., 2015). Tais estudos sugerem que o AZ apresenta capacidade de ativar receptores de reconhecimento do tipo Toll em macrófagos e que a expressão de IL-1 β faz parte da patogênese de ONMB.

Ademais, observamos que o tratamento com MET, por si, não induziu a expressão de IL1 β na cultura de RAW 264.7. Quando as células foram incubadas concomitantemente com AZ e MET, observou-se uma redução significativa na concentração de IL-1 β no sobrenadante em comparação às condições de tratamento com AZ. Sugerimos, portanto, que o tratamento com a MET possivelmente preveniu a ativação do inflamassoma e a consequente liberação de IL-1 β induzida pelo AZ.

Nesse contexto, sugerimos que a MET possa ter reduzido a lesão de ONMB, representada pelo número reduzido de lacunas vazias de osteócitos no presente estudo, pelo menos parcialmente por mecanismos possivelmente anti-inflamatórios. De fato, a literatura científica é consistente com efeitos anti-inflamatórios da MET, com redução da expressão de F4/80 a partir da utilização de MET *in vitro* (INCIO et al., 2015; DING et al., 2015). Além disso, em um modelo experimental de cardiomiopatia diabética, observaram-se reduzidas expressões de mTOR e IL-1 β em espécimes cardíacos de animais tratados com MET, o que foi revertido pela administração de um inibidor de AMPK (YANG et al., 2019), indicando a importância do AMPK para os efeitos anti-inflamatórios apresentados pela MET.

Em suma, tem sido descrito que a MET entra na célula através de transportadores de cátions, localizados na membrana celular e ocasiona um aumento na proporção ADP:ATP, fazendo com que haja ativação de AMPK. Consequentemente, ocorre a inibição de importantes vias de sinalização envolvendo a resposta inflamatória, como TNF- α /NF- κ B e o complexo proteico envolvendo mTOR, uma vez que ativa PTEN, além de suprimir TLR4, reduzindo a expressão especialmente de IL-1 β . Com isso, sugere-se que a interação entre AMPK, mTOR e TLR4 tenha possibilitado os efeitos anti-inflamatórios da MET observados em nosso estudo ao reduzir tanto o infiltrado leucocitário e a expressão de F4/80 nos espécimes mandibulares avaliados *in vivo*, como a concentração de IL-1 β no sobrenadante celular *in vitro*, e que tais efeitos possam ter reverberado no seu potencial regulatório deste fármaco sobre os parâmetros ósseos avaliados, amenizando a lesão de ON induzida por AZ.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ONMB não induziu importantes alterações na massa corpórea e na glicemia em jejum dos animais. Já aqueles submetidos ao protocolo experimental de DM apresentaram baixas condições de sobrevivência, com altas taxas de mortalidade e perda de peso contínua. Estas observações foram proporcionais ao aumento da glicemia em jejum nestes animais. Já naqueles submetidos ao tratamento com MET, observamos tendência a um ganho de peso de forma mais sucinta, com menores valores de glicemia em jejum, em comparação a animais submetidos à ONMB.

Nas análises de parâmetros ósseos realizadas na região da exodontia, a ONMB foi representada especialmente pelo aumento na quantidade de lacunas vazias de osteócitos, com elevação no número total de OCs, a qual ocorreu às custas de OCs apoptóticos, e na expressão de TRAP. A análise de parâmetros inflamatórios também foi realizada nos referidos espécimes. Nesta, a ONMB provocou aumento na expressão de F4/80 e aumento do número de leucócitos. Além disso, o tecido gengival circunjacente à área da exodontia também foi utilizado para avaliação da atividade de MPO, a qual se apresentou aumentada em espécimes de animais submetidos ao protocolo de ONMB. Complementarmente, no ensaio *in vitro* realizado em macrófagos murinos, o tratamento com AZ aumentou a expressão de IL-1 β no sobrenadante celular. Tais resultados indicam que a patogênese da ONMB abrange alterações não apenas no metabolismo ósseo, mas uma complexa rede de sinalizações intracelular envolvendo o AMPK, bem como a participação de mediadores pró-inflamatórios. Assim, este estudo tornou-se importante por avaliar, em parâmetros ósseos e inflamatórios aqui preconizados, os efeitos da hiperglicemia crônica, representando uma situação inflamatória sistêmica, com aumento da concentração de mediadores inflamatórios nos tecidos periféricos e infiltração de macrófagos ativados, bem como da administração de MET, um fármaco que, por ser agonista AMPK, apresenta múltiplos potenciais em inúmeras células, os quais ainda se encontram desconhecidos.

O DM, por sua vez, não aumentou o número de lacunas vazias de osteócitos e de OCs apoptóticos no ensaio *in vivo* e, portanto, não influenciou no desenvolvimento da ONMB. Sugere-se que os resultados significativos encontrados para os parâmetros ósseos em animais diabéticos decorreram provavelmente dos efeitos inflamatórios da hiperglicemia. Logo, o aumento do número total de OCs e da expressão de TRAP sugestivamente pode estar associado ao aumento da razão RANKL/OPG que, por sua vez, ocorre mediante a alta concentração de mediadores inflamatórios. De fato, o DM foi

acompanhado por elevação importante da expressão de F4/80 e aumento do número de leucócitos na região da exodontia, bem como da atividade de MPO no tecido gengival avaliado.

Enquanto isso, a administração de MET induziu importantes diferenças significantes em animais com ONMB, na análise de parâmetros ósseos e inflamatórios do presente estudo. O tratamento com MET atenuou a ONMB, com reduzida quantificação de lacunas vazias de osteócitos, sem influências no número total de OCs e OCs apoptóticos, porém com intensificação da expressão de TRAP. Além disso, quanto aos parâmetros inflamatórios, a MET foi associada à redução da expressão de F4/80 e do aumento do número de leucócitos nos espécimes com ONMB. Adicionalmente, quanto aos efeitos da MET em neutrófilos, observou-se que o tratamento com tal fármaco reduziu significativamente a atividade de MPO no tecido gengival de espécimes de animais submetidos à ONMB. Mediante tais resultados, observamos que a MET provou seu potencial anti-inflamatório ao reduzir a expressão de IL-1 β em macrófagos incubados concomitantemente com AZ. Além da literatura indicar um potencial angiogênico da MET, que contraria o efeito anti-angiogênico dos BFs, os resultados de nosso estudo nos sugerem que a MET é capaz de influenciar a quantificação da ONMB através, especialmente, de seu potencial anti-inflamatório.

9. CONCLUSÃO

No protocolo de ONMB preconizado em nosso estudo, a hiperglicemia influenciou os parâmetros inflamatórios avaliados, sem apresentar importantes interferências nos parâmetros ósseos considerados. O tratamento com MET apresentou efeitos protetores *in vivo* em reduzir a quantificação da lesão de ON e a porcentagem de OCs apoptóticos. Mediante potencial anti-inflamatório apresentados em nossas análises *in vivo* e *in vitro*, sugere-se que o efeito protetor da MET no presente protocolo de ONMB decorra parcialmente de sua atividade anti-inflamatória. Desta forma, sugere-se a MET um fármaco promissor para uso clínico em pacientes fazendo uso de BFs especialmente por via endovenosa, onde o risco de desenvolvimento de ONMB é maior.

10. REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.S.; ALARFAJ, S.J.; SAIF, D.S.; EL-NAGGAR, M.E.; ELSOKARY, M.A.; ELSAWAH, H.K.; ABDELSATTAR ZAKI, S.; WAHSH, E.A.; ABO MANSOUR, H.E.; MOSALAM, E.M. The AMPK modulator metformin as adjunct to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: A proof-of-concept, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Int Immunopharmacol.** v.95(2021):107575, 2021.
- ABDELGAWAD, M. E.; SØE, K., ANDERSEN, T. L.; MERRILD, D. M.; CHRISTIANSEN, P.; KJÆRSGAARD-ANDERSEN, P.; DELAISSE, J. M. Does collagen trigger the recruitment of osteoblasts into vacated bone resorption lacunae during bone remodeling? **Bone.** v. 67, p. 181–8, 2014.
- AGHALOO, T.; HAZBOUN, R.; TETRADIS, S. Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** v. 27(4), p. 489-96, 2015.
- AIT OUMGHAR, I.; BARKAOUI, A.; CHABRAND, P. Toward a Mathematical Modeling of Diseases' Impact on Bone Remodeling: Technical Review. **Front Bioeng Biotechnol.** v. 2(8):584198, 2020.
- AL ZA'ABI, M.; ALI, B.H.; AL SULEIMANI, Y.; ADHAM, S.A.; ALI, H.; MANOJ, P.; ASHIQUE, M.; NEMMAR, A. The Effect of Metformin in Diabetic and Non-Diabetic Rats with Experimentally-Induced Chronic Kidney Disease. **Biomolecules.** v. 11(6): 814, 2021.
- AMARASEKARA, D.S.; YUN, H.; KIM, S.; LEE, N.; KIM, H; RHO, J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. **Immune Netw.** v.18(1):e8, 2018.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 37(Suppl 1): S81-90, 2014.
- ANDRZEJEWSKI, S.; GRAVEL, S.P.; POLLAK, M.; ST-PIERRE, J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. **Cancer Metab.** v. 2:12, 2014.
- BAHRAMBEIGI, S.; YOUSEFI, B.; RAHIMI, M.; SHAFIEI-IRANNEJAD, V. Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. **Biomed Pharmacother.** v. 109, p. 1593-1601, 2019.
- BAKHASHAB, S.; AHMED, F.; SCHULTEN, H. J.; AHMED, F. W.; GLANVILLE, M.; AL-QAHTANI, M. H.; WEAVER, J. U. Proangiogenic Effect of Metformin in Endothelial Cells Is via Upregulation of VEGFR1/2 and Their Signaling under Hyperglycemia-Hypoxia. **Int J Mol Sci.** v. 19(1), p. 293-310, 2018.
- BALTZIS, D.; ELEFThERIADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. **Adv Ther.** v. 31(8), p. 817-36, 2014.
- BARTOLD, P.M.; LOPEZ-OLIVA, I. Periodontitis and rheumatoid arthritis: An update 2012-2017. **Periodontol 2000.** v. 83(1), p. 189-212, 2020.

BIAN, F.; ZHANG, Y.; XIE, Y.; FANG, H.; FAN, M.; WANG, X.; LI, H.; HUANG, T.; ZHANG, S.; CAI, L. Effects of different concentrations of metformin on osteoclast differentiation and apoptosis and its mechanism. **Pharmazie**. v. 76(6), p. 244-8, 2021.

CARLOS, A.C.A.M.; Coelho, L.M.C.; Malta, C.E.N.; Magalhães, I.A.; Borges, M.M.F.; Silva Júnior, J.E.; Silva, L.F.G.; SILVA, P.G.B. Risk Factors for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Bone Metastatic Breast and Prostate Cancer under Zoledronate Treatment: A Retrospective Analysis from 10 Years of Evaluation. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 24(8), p. 2681-9, 2023.

CHAGAS, V.T.; COELHO, R.M.R.S.; GASPAR, R.S.; DA SILVA, S.A.; MASTROGIOVANNI, M.; MENDONÇA, C.J.; RIBEIRO, M.N.S.; PAES, A.M.A.; TROSTCHANSKY, A. Protective Effects of a Polyphenol-Rich Extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels Leaf on Oxidative Stress-Induced Diabetic Rats. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2018:5386079, 2018.

COLEMAN, R.; BURKINSHAW, R.; WINTER, M.; NEVILLE-WEBBE, H.; LESTER, J.; WOODWARD, E.; BROWN, J. Zoledronic acid. **Expert Opin Drug Saf**. v. 10(1), p. 133-45, 2011.

CREE-GREEN, M.; BERGMAN, B.C.; CENGIZ, E.; FOX, L.A.; HANNON, T.S.; MILLER, K.; NATHAN, B.; PYLE, L.; KAHN, D.; TANSEY, M.; TICHY, E.; TSALIKIAN, E.; LIBMAN, I.; NADEAU, K.J. Metformin Improves Peripheral Insulin Sensitivity in Youth With Type 1 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 104(8), p. 3265-78, 2019.

DE MOLON, R.S.; ROSSA JÚNIOR, C.; THURLINGS, R.M.; CIRELLI, J.A.; KOENDERS, M.I. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. **Int J Mol Sci**. v. 20(18), p. 4541-76, 2019.

DELAISSE, J.M.; ANDERSEN, T.L.; KRISTENSEN, H.B.; JENSEN, P.R.; ANDREASEN, C.M.; SØE, K. Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. **Bone**. v. 141:115628, 2020.

DI SALVATORE, M.; ORLANDI, A.; BAGALÀ, C.; QUIRINO, M.; CASSANO, A.; ASTONE, A.; BARONE, C. Anti-tumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. **Cell Prolif**. v. 44(2), p. 139-46, 2011.

DORNELAS-FILHO, A.F.; PEREIRA, V.B.M.; WONG, D.V.T.; NOBRE, L.M.S.; MELO, A.T.; SILVA, C.M.S.; WANDERLEY, C.W.S.; NOUR, M.L.; ARAÚJO, L.C.N.C.; SILVA, R.O.; PINTO, F.M.M.; BINGANA, R.D.; SOUZA, M.H.L.P.; ALENCAR, N.M.N.; SILVA, P.G.B.; ALVES, A.P.N.N.; ALMEIDA, P.R.C.; CUNHA, F.Q.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P. Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. **Int Immunopharmacol**. v. 62, p. 96-108, 2018.

DING, L.; LIANG, G.; YAO, Z.; ZHANG, J.; LIU, R.; CHEN, H.; ZHOU, Y.; WU, H.; YANG, B.; HE, Q. Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. **Oncotarget**. v. 6(34), p. 36441-55, 2015.

DRAKE, M.T.; CLARKE, B.L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin Proc.** v. 83(9), p. 1032-45, 2008.

FAVOT, C.L.; FORSTER, C.; GLOGAUER, M. The effect of bisphosphonate therapy on neutrophil function: a potential biomarker. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v. 42(5), p. 619-26, 2013.

FERREIRA-JUNIOR, A.E.C.; BARROS-SILVA, P.G.; OLIVEIRA, C.C.; LIMA VERDE, M.E.Q.; SOUSA, F.B.; MOTA, M.R.L.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; ALVES, A.P.N.N. Influence of infliximab therapy on bone healing post-dental extraction in rats. **Arch Oral Biol.** v. 112:104680, 2020.

FLEISCH, H.; RESZKA, A.; RODAN, G.; ROGERS, M. hapter 78 - Bisphosphonates: Mechanisms of Action. **Principles of Bone Biology (Second Edition).** V. 2002, p. 1361-85, 2002.

FLORY, J.; LIPSKA, K. Metformin in 2019. **JAMA.** v. 321(19), p. 1926-27, 2019.

FORDE, H.; DAVENPORT, C.; HARPER, E.; CUMMINS, P.; SMITH, D. The role of OPG/RANKL in the pathogenesis of diabetic cardiovascular disease. **Cardiovasc Endocrinol Metab.** v. 7(2), p. 28-33, 2018.

GIANNASI, C.; NIADA, S.; FARRONATO, D.; LOMBARDI, G.; MANFREDI, B.; FARRONATO, G.; BRINI, A.T. Nitrogen Containing Bisphosphonates Impair the Release of Bone Homeostasis Mediators and Matrix Production by Human Primary Pre-Osteoblasts. **Int J Med Sci.** V. 16(1), p. 23-32, 2019.

GONG, L.; GOSWAMI, S.; GIACOMINI, K.M.; ALTMAN, R.B.; KLEIN, T.E. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacogenet Genomics.** v. 22(11), p. 820-7, 2012.

GONG, X.; YU, W.; ZHAO, H.; SU, J.; SHENG, Q. Skeletal Site-specific Effects of Zoledronate on in vivo Bone Remodeling and in vitro BMSCs Osteogenic Activity. **Sci Rep.** v. 7:36129, 2017.

GROSS, C.; WEBER, M.; CREUTZBURG, K.; MÖBIUS, P.; PREIDL, R.; AMANN, K.; WEHRHAN, F. Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. **J Transl Med.** v. 15(1), p. 128-41, 2017.

HALOUL, M.; OLIVEIRA, E.R.A.; KADER, M.; WELLS, J.Z.; TOMINELLO, T.R.; EL ANDALOUSSI, A.; YATES, C.C.; ISMAIL, N. mTORC1-mediated polarization of M1 macrophages and their accumulation in the liver correlate with immunopathology in fatal ehrlichiosis. **Sci Rep.** v. 9(1):14050, 2019.

HAN, J.H.; JUNG, J.; HWANG, L.; KO, I.G.; NAM, O.H.; KIM, M.S.; LEE, J.W.; CHOI, B.J.; LEE, D.W. Anti-inflammatory effect of polydeoxyribonucleotide on zoledronic acid-pretreated and lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Exp Ther Med.** v. 16(1), p. 400-5, 2018.

HIROTA, T.; LEVY, J.H.; IBA, T. The influence of hyperglycemia on neutrophil extracellular trap formation and endothelial glycocalyx damage in a mouse model of type 2 diabetes. **Microcirculation**. v. 27(5):e12617, 2020.

HOWIE, R.N.; BORKE, J.L.; KURAGO, Z.; DAOUDI, A.; CRAY, J.; ZAKHARY, I.E.; BROWN, T.L.; RALEY, J.N.; TRAN, L.T.; MESSER, R.; MEDANI, F.; ELSALANTY, M.E. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. **PLoS One**. v. 10(7): e0132520, 2015.

HYVÖNEN, P.M.; KOWOLIK, M.J. Influence of dichloromethylene bisphosphonate on the in vitro phagocytosis of hydroxyapatite particles by rat peritoneal exudate cells: an electron microscopic and chemiluminescence study. **Ann Rheum Dis**. v. 51(2), p.203-9, 1992.

INCIO, J.; SUBOJ, P.; CHIN, S.M.; VARDAM-KAUR, T.; LIU, H.; HATO, T.; BABYKUTTY, S.; CHEN, I.; DESHPANDE, V.; JAIN, R.K.; FUKUMURA, D. Metformin Reduces Desmoplasia in Pancreatic Cancer by Reprogramming Stellate Cells and Tumor-Associated Macrophages. **PLoS One**. v. 10(12):e0141392, 2015.

JENSEN, P.R.; ANDERSEN, T.L.; CHAVASSIEUX, P.; ROUX, J.P.; DELAISSE, J.M. Bisphosphonates impair the onset of bone formation at remodeling sites. **Bone**. v. 145:115850, 2021.

JIATING, L.; BUYUN, J.; YINCHANG, Z. Role of Metformin on Osteoblast Differentiation in Type 2 Diabetes. **Biomed Res Int**. v. 2019:9203934, 2019.

KALKAR, P.; COHEN, G.; TAMARI, T.; SCHIF-ZUCK, S.; ZIGDON-GILADI, H.; ARIEL, A. IFN- β mediates the anti-osteoclastic effect of bisphosphonates and dexamethasone. **Front Pharmacol**. v. 13:1002550, 2022.

KANEKO, J.; OKINAGA, T.; HIKIJI, H.; ARIYOSHI, W.; YOSHIGA, D.; HABU, M.; TOMINAGA, K.; NISHIHARA, T. Zoledronic acid exacerbates inflammation through M1 macrophage polarization. **Inflamm Regen**. v. 38:16, 2018.

KANG, W.; WANG, T.; HU, Z.; LIU, F.; SUN, Y.; GE, S. Metformin Inhibits Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide-Influenced Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts via Regulating Activating Transcription Factor-3 Expression. **J Periodontol**. v. 88(10):e169-e178, 2017.

KENKRE, J.S.; BASSETT, J. The bone remodelling cycle. **Ann Clin Biochem**. v. 55(3), p. 308-27, 2018.

KHAN, A.A.; MORRISON, A.; HANLEY, D.A.; FELSEBERG, D.; MCCAULEY, L.K.; O'RYAN, F.; REID, I.R.; RUGGIERO, S.L.; TAGUCHI, A.; TETRADIS, S.; WATTS, N.B.; BRANDI, M.L.; PETERS, E.; GUISE, T.; EASTELL, R.; CHEUNG, A.M.; MORIN, S.N.; MASRI, B.; COOPER, C.; MORGAN, S.L.; OBERMAYER-PIETSCH, B.; LANGDAHL, B.L.; AL DABAGH, R.; DAVISON, K.S.; KENDLER, D.L.; SÁNDOR, G.K.; JOSSE, R.G.; BHANDARI, M.; EL RABBANY, M.; PIERROZ, D.D.; SULIMANI, R.; SAUNDERS, D.P.; BROWN, J.P.; COMPSTON, J. International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Diagnosis and management of osteonecrosis of

the jaw: a systematic review and international consensus. **J Bone Miner Res.** v. 30(1), p. 3-23, 2015.

KIM, J.M.; LIN, C.; STAVRE, Z.; GREENBLATT, M.B.; SHIM, J.H. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. **Cells.** v. 9(9), p. 2073, 2020.

KING, A.J. The use of animal models in diabetes research. **Br J Pharmacol.** v. 166(3), p. 877-94, 2012.

KITAURA, H.; MARAHLEH, A.; OHORI, F.; NOGUCHI, T.; SHEN, W.R.; QI, J.; NARA, Y.; PRAMUSITA, A.; KINJO, R.; MIZOGUCHI, I. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. **Int J Mol Sci.** v. 21(14): 5169, 2020.

KOCH, F.P.; MERKEL, C.; ZIEBART, T.; SMEETS, R.; WALTER, C.; AL-NAWAS, B. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. **Clin Oral Investig.** v. 16(1), p. 79-86, 2012.

KOLPAKOVA, M.E.; ZUBAREVA, A.A.; ARTAMONOVA, T.D.; LISOVSKAYA, E.K.; CHEFU, S.G.; YAGMUROV, O.D.; YAREMENKO, A.I.; VLASOV, T.D. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. **Br J Oral Maxillofac Surg.** v. 55(2), p. 156-159, 2017.

KONARSKI, W.; POBOŻY, T.; KOTELA, A.; ŚLIWCZYŃSKI, A.; KOTELA, I.; HORDOWICZ, M.; KRAKOWIAK, J. Does Diabetes Mellitus Increase the Risk of Avascular Osteonecrosis? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Environ Res Public Health.** v. 19(22):15219, 2022.

KRISTÓFI, R.; ERIKSSON, J.W. Metformin as an anti-inflammatory agent: a short review. **J Endocrinol.** v. 251(2):R11-R22, 2021.

KUMAR, S.; SINGH, R.; VASUDEVA, N.; SHARMA, S. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. **Cardiovasc Diabetol.** v. 11:9, 2012.

KUROSHIMA, S.; GO, V.A.; YAMASHITA, J. Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. **Endocrinology.** v. 153(1), p. 17-28, 2012.

LAND, W.G. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. **Sultan Qaboos Univ Med J.** v. 15(2):e157-70, 2015.

LANDESBERG, R.; COZIN, M.; CREMERS, S.; WOO, V.; KOUSTENI, S.; SINHA, S.; GARRETT-SINHA, L.; RAGHAVAN, S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 66(5):839-47, 2008.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.** v. 51(2):216-26, 2008.

LI, Y.; LIU, Y.; LIU, S.; GAO, M.; WANG, W.; CHEN, K.; HUANG, L.; LIU, Y. Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. **Signal Transduct Target Ther.** v.8(1):152, 2023.

LOTZ, E.M.; LOHMANN, C.H.; BOYAN, B.D.; SCHWARTZ, Z. Bisphosphonates inhibit surface-mediated osteogenesis. **J Biomed Mater Res A**. v. 108(8), p. 1774-86, 2020.

LUUKKONEN, J.; HILLI, M.; NAKAMURA, M.; RITAMO, I.; VALMU, L.; KAUPPINEN, K.; TUUKKANEN, J.; LEHENKARI, P. Osteoclasts secrete osteopontin into resorption lacunae during bone resorption. **Histochem Cell Biol**. v. 151(6), p. 475-487, 2019.

IGHODARO, O.M.; ADEOSUN, A.M.; AKINLOYE, O.A. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. **Medicina (Kaunas)**. v. 53(6), p. 365-74, 2017.

MARTÍNEZ, B.B.; PEREIRA, A.C.; MUZETTI, J.H.; TELLES, F.P.; MUNDIM, F.G.; TEIXEIRA, M.A. Experimental model of glucocorticoid-induced insulin resistance. **Acta Cir Bras**. v. 31(10), p. 645-49, 2016.

MARX, R.E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 61(9), p. 1115-7, 2003.

MAURIZI, A.; RUCCI, N. The Osteoclast in Bone Metastasis: Player and Target. **Cancers (Basel)**. v. 10(7):218, 2018.

MIRANDA PEDROSO, T.F.; BONAMIGO, T.R.; DA SILVA, J.; VASCONCELOS, P.; FÉLIX, J.M.; CARDOSO, C.A.L.; SOUZA, R.I.C.; DOS SANTOS, A.C.; VOLOBUFF, C.R.F.; FORMAGIO, A.S.N.; TRICHEZ, V.D.K. Chemical constituents of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation, and anticholinesterase effects in Wistar rats. **Biomed Pharmacother**. v. 111, p. 1383-92, 2019.

MIYAMOTO, T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. **Keio J Med**. v. 60(4), p. 101-5, 2011.

MUNIZ, F.W.M.G.; SILVA, B.F.D.; GOULART, C.R.; SILVEIRA, T.M.D.; MARTINS, T.M. Effect of adjuvant bisphosphonates on treatment of periodontitis: Systematic review with meta-analyses. **J Oral Biol Craniofac Res**. v. 11(2), p. 158-68, 2011.

MUNSHI, R.P.; JOSHI, S.G.; RANE, B.N. Development of an experimental diet model in rats to study hyperlipidemia and insulin resistance, markers for coronary heart disease. **Indian J Pharmacol**. v. 46(3), p. 270-6, 2014.

NAKAGAWA, T.; TSUKA, S.; AONUMA, F.; NODAI, T.; MUNEMASA, T.; TAMURA, A.; MUKAIBO, T.; KONDO, Y.; MASAKI, C.; HOSOKAWA, R. Effects of metformin on the prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in rats. **J Prosthodont Res**. v. 65(2), p. 219-24, 2021.

NAGAOKA, Y.; KAJIYA, H.; OZEKI, S.; IKEBE, T.; OKABE, K. Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition. **J Dent Res**. v. 94(4), p. 594-601, 2015.

NETO, N.C.; SPOLIDORIO, L.C.; ANDRADE, C.R.; ESTEVES, J.C.; MARCANTONIO, E. Experimental osteonecrosis: development of a model in rodents administered alendronate. **Braz Oral Res.** v. 30(1):e99, 2016.

OMI M, MISHINA Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. **Genesis.** v. 60(8-9):e23490, 2022.

OR, C.; CUI, J.; MATSUBARA, J.; FOROOGHIAN, F. Pro-inflammatory and anti-angiogenic effects of bisphosphonates on human cultured retinal pigment epithelial cells. **Br J Ophthalmol.** v. 97(8), p.1074-8, 2013.

ORIDUPA, O.A.; OVWIGHOSE, N.O.; SABA, A.B. Anti-Hyperglycaemic Effect of Cleome Rutidosperma in Alloxan-Induced Diabetic Albino Rats. **Drug Res (Stuttg).** v. 67(12), p. 719-23, 2017.

OZEL AB, DAGSUYU E, AYDIN PK, BUGAN I, BULAN OK, YANARDAG R, YARAT A. Brain Boron Level, DNA Content, and Myeloperoxidase Activity of Metformin-Treated Rats in Diabetes and Prostate Cancer Model. **Biol Trace Elem Res.** v. 200(3), p. 1164-70, 2022.

PAPAPETROU, P.D. Bisphosphonate-associated adverse events. **Hormones (Athens).** v. 8(2), p. 96-110, 2009.

PARK, S.H.; KANG, M.A.; MOON, Y.J.; JANG, K.Y.; KIM, J.R. Metformin coordinates osteoblast/osteoclast differentiation associated with ischemic osteonecrosis. **AGING (Albany NY).** v. 12(6), p. 4727-41, 2020.

PEER, A.; KHAMAISSI, M. Diabetes as a risk factor for medication-related osteonecrosis of the jaw. **J Dent Res.** v. 94(2), p. 252-60, 2015.

PEREIRA, L.M.S. Neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos: influência do diabetes mellitus e o efeito protetor da metformina. Tese apresentada em 2017, no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob orientação do professor Roberto César Pereira Lima Júnior.

PERIS, P.; MONEGAL, A.; GUAÑABENS, N. Bisphosphonates in inflammatory rheumatic diseases. **Bone.** 146:115887, 2021.

PODHORECKA, M.; IBANEZ, B.; DMOSZYŃSKA, A. Metformin - its potential anti-cancer and anti-aging effects. **Postepy Hig Med Dosw (Online).** v. 71(0), p.170-75, 2017.

RAHIMI-NEDJAT, R.K.; SAGHEB, K.; PABST, A.; OLK, L.; WALTER, C. Diabetes Mellitus and Its Association to the Occurrence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Dent J (Basel).** v. 4(2):17, 2016.

SILVA, V.D.; NOGUEIRA, R.M.B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences - Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 36(1), p. 9–15, 2015.

REN, Y.; LUO, H. Metformin: The next angiogenesis panacea? **SAGE Open Med.** v. 9:20503121211001641, 2021.

RENA, G.; HARDIE, D.G.; PEARSON, E.R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia.** v. 60(9), p. 1577-85, 2017.

RODAN, G.A.; FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. **J. Clin. Invest.** v. 97(12), p. 2692–96, 1996.

RODAN, G.A.; RESZKA, A.A. Bisphosphonate mechanism of action. **Curr Mol Med.** v. 2(6), p. 571-7, 2002.

ROSINI, S.; BERTOLDI, I.; FREDIANI, B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v. 19(17), p. 3309-17, 2015.

SANCHEZ-RANGEL, E.; INZUCCHI, S.E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. **Diabetologia.** v. 60(9), p. 1586-93, 2017.

SARACINO, S.; CANUTO, R.A.; MAGGIORA, M.; ORALDI, M.; SCOLETTA, M.; CIUFFREDA, L.; VANDONE, A.M.; CAROSSA, S.; MOZZATI, M.; MUZIO, G. Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model. **J Oral Pathol Med.** v. 41(10), p. 788-92, 2012.

SATOH, T.; OTSUKA, A.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L.E. The inflammasome and IL-1 β : implications for the treatment of inflammatory diseases. **Immunotherapy.** v. 7(3), p. 243-54, 2015.

SCAVELLI, C.; DI PIETRO, G.; CIRULLI, T.; COLUCCIA, M.; BOCCARELLI, A.; GIANNINI, T.; MANGIALARDI, G.; BERTIERI, R.; COLUCCIA, A.M.; RIBATTI, D.; DAMMACCO, F.; VACCA, A. Zoledronic acid affects over-angiogenic phenotype of endothelial cells in patients with multiple myeloma. **Mol Cancer Ther.** v. 6(12 Pt 1):3256-62, 2007.

SHURRAB, N.T.; ARAFA, E.S.A. Metformin: A review of its therapeutic efficacy and adverse effects. **Obesity Medicine.** v. 17:100186, 2020.

SILVA, P.G.; FERREIRA JUNIOR, A.E.; TEÓFILO, C.R.; BARBOSA, M.C.; LIMA JÚNIOR, R.C.; SOUSA, F.B.; MOTA, M.R.; RIBEIRO, R.D.A.; ALVES, A.P. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Arch Oral Biol.** v. 60(9), p. 1237-45, 2015.

SILVA VD, NOGUEIRA RMB. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences - Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 36(1), p. 9–15, 2015.

SINGH, M.; GONEGANDLA, G.S. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws (BIONJ). **J Maxillofac Oral Surg.** v. 19(2), p. 162-167, 2020.

SOMA T, IWASAKI R, SATO Y, KOBAYASHI T, ITO E, MATSUMOTO T, KIMURA A, MIYAMOTO K, MATSUMOTO M, NAKAMURA M, MORITA M,

ASODA S, KAWANA H, NAKAGAWA T, MIYAMOTO T. Osteonecrosis development by tooth extraction in zoledronate treated mice is inhibited by active vitamin D analogues, anti-inflammatory agents or antibiotics. **Sci Rep.** v. 12(1):19, 2022.

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

SOYSA NS, ALLES N. Positive and negative regulators of osteoclast apoptosis. **Bone Rep.** v. 11:100225, 2019.

SUN, H.; CAI, W.; WANG, X.; LIU, Y.; HOU, B.; ZHU, X.; QIU, L. Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation via inactivation of NF κ B and ERK pathways in Raw 264.7 cells. **BMC Complement Altern Med.** v. 17(1):120, 2017.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res.** v. 50(6), p. 537-46, 2001.

TAN, Y.; CHEN, J.; JIANG, Y.; CHEN, X.; LI, J.; CHEN, B.; GAO, J. The anti-periodontitis action of metformin via targeting NLRP3 inflammasome. **Arch Oral Biol.** v. 114:104692, 2020.

THAKUR, S.; DALEY, B.; KLUBO-GWIEZDZINSKA, J. The role of an anti-diabetic drug metformin in the treatment of endocrine tumors. **J Mol Endocrinol.** v. 63(2), p. R17-R35, 2019.

VILLANUEVA-PAZ M, COTÁN D, GARRIDO-MARAVÉ J, OROPESA-ÁVILA M, DE LA MATA M, DELGADO-PAVÓN A, DE LAVERA I, ALCOCER-GÓMEZ E, ÁLVAREZ-CÓRDOBA M, SÁNCHEZ-ALCÁZAR JA. AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. **Exp Suppl.** v. 107:45-71, 2016.

VITTÉ, C.; FLEISCH, H.; GUENTHER, H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology.** v. 137(6), p. 2324-33, 1996. doi: 10.1210/endo.137.6.8641182. PMID: 8641182.

WADA, J.; MAKINO, H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol.** 12(1), p. 13-26, 2016.

WEHRHAN, F.; GROSS, C.; CREUTZBURG, K.; AMANN, K.; RIES, J.; KESTING, M.; GEPPERT, C.I.; WEBER, M. Osteoclastic expression of higher-level regulators NFATc1 and BCL6 in medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. **J Transl Med.** v. 17(1):69, 2019.

WEYAND, C.M.; GORONZY, J.J. The immunology of rheumatoid arthritis. **Nat Immunol.** v. 22(1), p. 10-18, 2021.

WOOD, J.; BONJEAN, K.; RUETZ, S.; BELLAHCÈNE, A.; DEVY, L.; FOIDART, J.M.; CASTRONOVO, V.; GREEN, J.R. Novel antiangiogenic effects of the

bisphosphonate compound zoledronic acid. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 302(3), p. 1055-61, 2002.

YAMADA, J.; TSUNO, N.H.; KITAYAMA, J.; TSUCHIYA, T.; YONEYAMA, S.; ASAKAGE, M.; OKAJI, Y.; SHUNO, Y.; NISHIKAWA, T.; TANAKA, J.; TAKAHASHI, K.; NAGAWA, H. Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. **J Surg Res.** v. 151(1), p. 115-20, 2009.

YAMASHITA, J.; KOI, K.; YANG, D.Y.; MCCAULEY, L.K. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. **Clin Cancer Res.** v. 17(6), p. 1405-14, 2011.

YANG, F.; QIN, Y.; WANG, Y.; MENG, S.; XIAN, H.; CHE, H.; JIE, L.V.; LI, Y.; YU, Y.; BAI, Y.; WANG, L. Metformin Inhibits the NLRP3 Inflammasome via AMPK/mTOR-dependent Effects in Diabetic Cardiomyopathy. **Int J Biol Sci.** v. 15(5), p. 1010-19, 2019.

YAVROPOULOU, M.P.; YOVOS, J.G. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** v. 8(3), p. 204-16, 2008.

YEREVANIAN, A.; SOUKAS, A.A. Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. **Curr Obes Rep.** v. 8(2), p. 156-164, 2019.

ZHANG, Q.; YU, W.; LEE, S.; XU, Q.; NAJI, A.; LE, A.D. Bisphosphonate Induces Osteonecrosis of the Jaw in Diabetic Mice via NLRP3/Caspase-1-Dependent IL-1 β Mechanism. **J Bone Miner Res.** v. 30(12), p. 2300-12, 2015.

ZHAO, W.; HUANG, Z.; LIN, Y.; LAN, J.; GAO, X. Inhibition Effect of Zoledronate on the Osteoclast Differentiation of RAW264.7 Induced by Titanium Particles. **Biomed Res Int.** 2021:5578088, 2021.

ZHU, W.; XU, R.; DU, J.; FU, Y.; LI, S.; ZHANG, P.; LIU, L.; JIANG, H. Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **FASEB J.** v. 33(4), p. 5208-19, 2019.

APÊNDICES

Apêndice 1: Dados experimentais com inclusão dos grupos DM+MET e DM+ONMB+MET

Os grupos experimentais DM+MET e DM+ONMB+MET existiram durante as realizações dos protocolos experimentais. Entretanto, seus dados foram excluídos da apresentação da presente tese em decorrência do número de animais sobreviventes no 77º dia experimental ter sido insuficiente para realização de análise estatística satisfatória (n=1 para cada grupo).

Considerando a importância desses dados e todos os esforços para existirem tais grupos, ainda que não se tenha tido êxito nesse sentido, os mesmos estão apresentados a seguir:

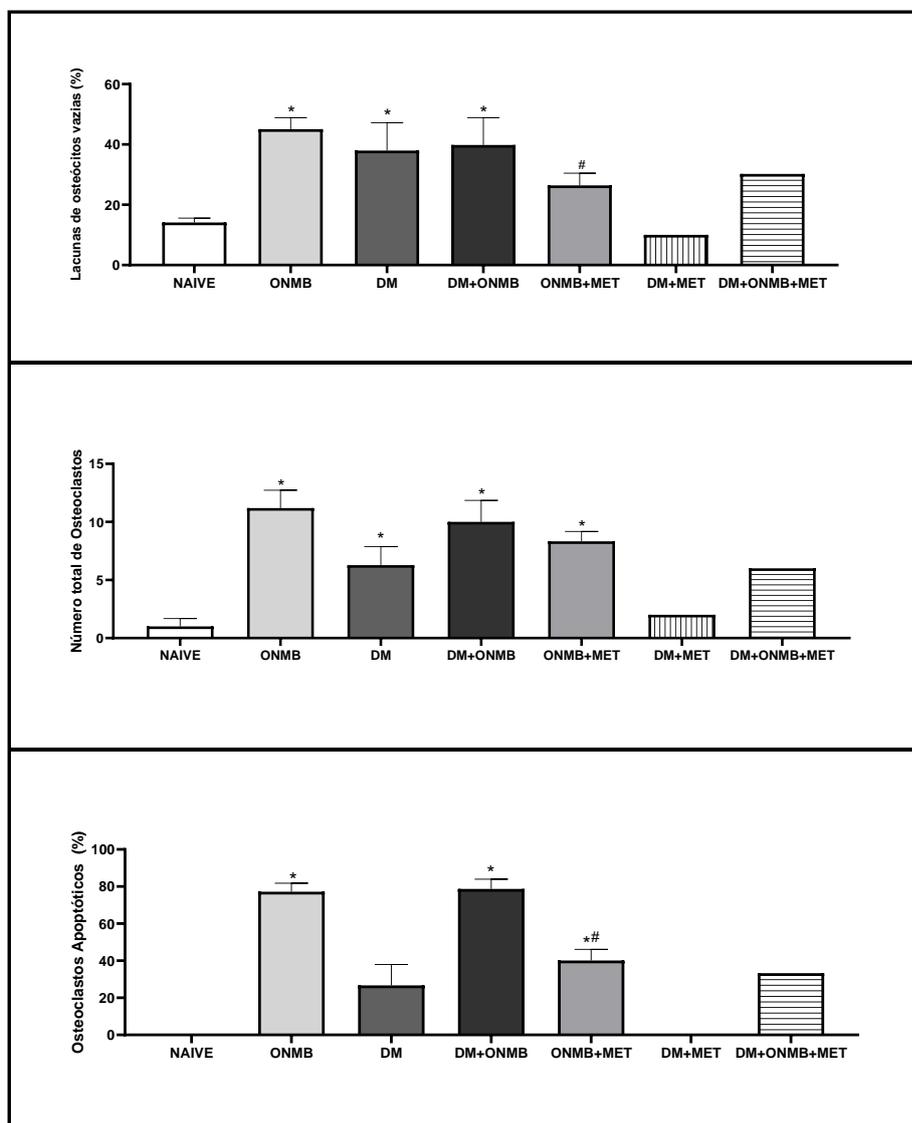


Figura 27: Dados experimentais sobre a análise perfil de células ósseas do osso pós-exodontia no presente estudo. Dados já apresentados na seção Resultados, incluindo os grupos DM+MET e DB+ONMB+MET. Não foi realizada análise estatística incluindo tais grupos pelo baixo número de animais compondo os mesmos (n=1 para cada).

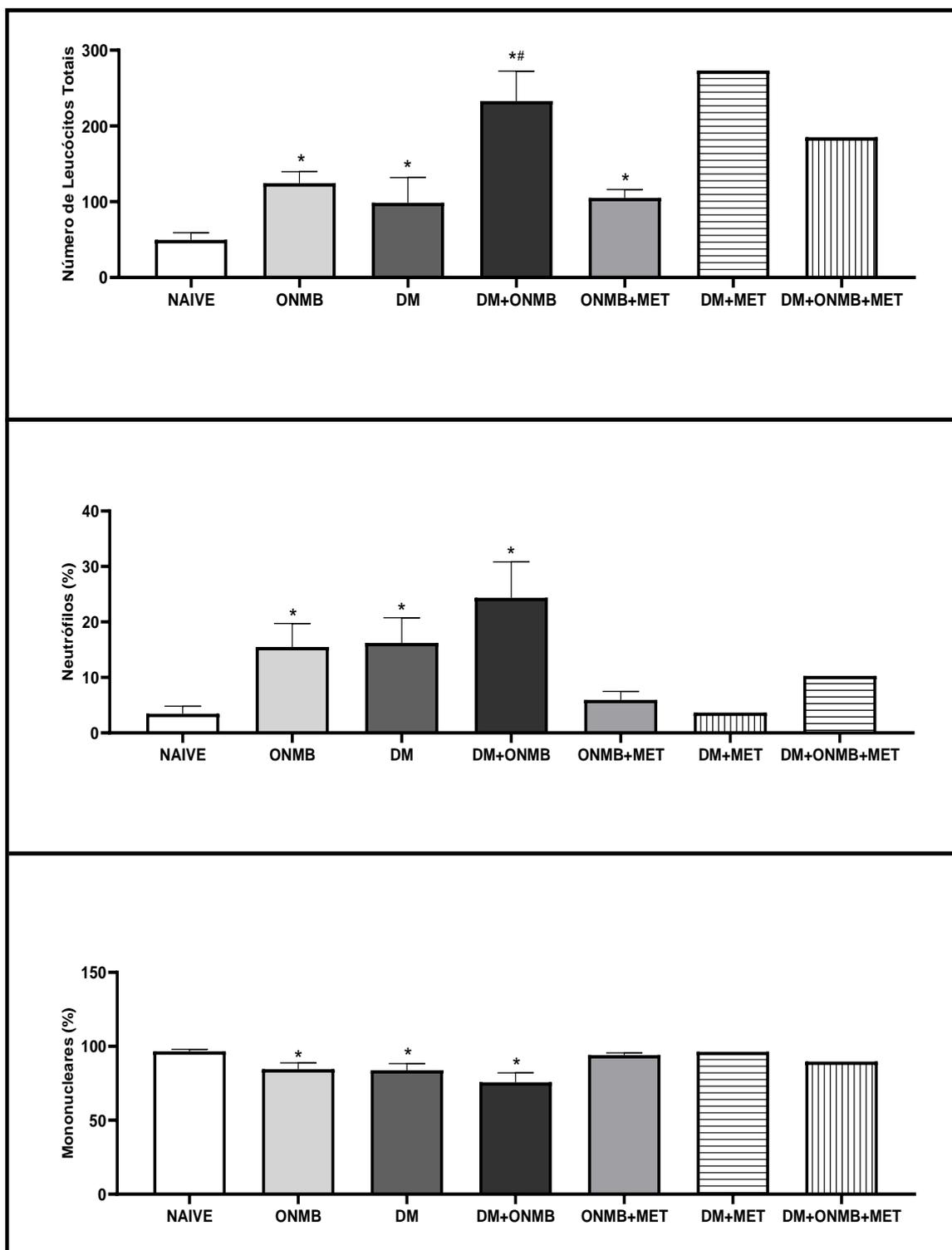


Figura 28: Dados experimentais sobre a análise perfil de células inflamatórias do osso pós-exodontia no presente estudo. Dados já apresentados na seção Resultados, incluindo os grupos DM+MET e DB+ONMB+MET. Não

foi realizada análise estatística incluindo tais grupos pelo baixo número de animais compondo os mesmos (n=1 para cada).

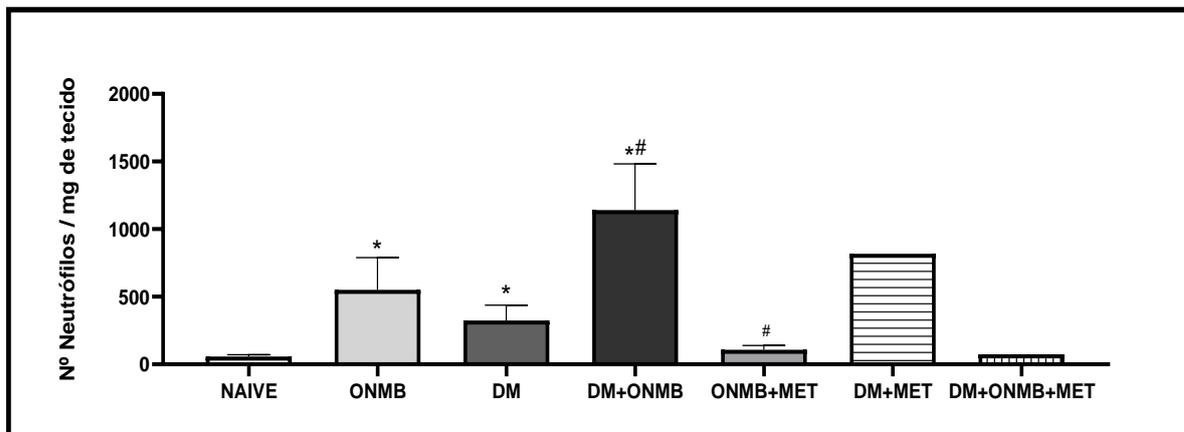


Figura 29: Dados experimentais sobre a atividade de MPO no tecido gengival adjacente à área de exodontia do primeiro molar no presente estudo. Dados já apresentados na seção Resultados, incluindo os grupos DM+MET e DB+ONMB+MET. Não foi realizada análise estatística incluindo tais grupos pelo baixo número de animais compondo os mesmos (n=1 para cada).

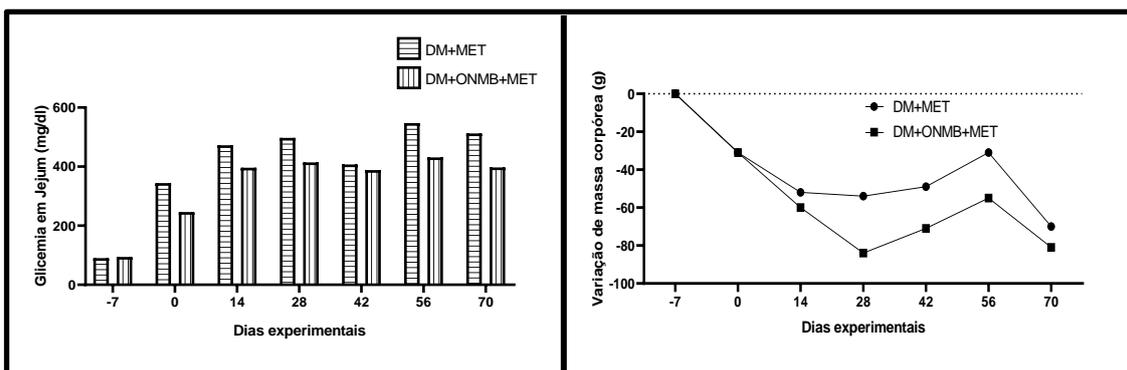


Figura 30: Glicemia em Jejum e Variação de massa corpórea dos animais dos grupos DM+MET e DM+ONMB+MET no decorrer dos dias experimentais.

Anexo 2: Artigo científico para publicação em BONE Journals & Books (IF 4.1)

Full Length Article

**NOVEL INSIGHTS ON THE PROTECTIVE EFFECT OF METFORMIN IN
THE EXPERIMENTAL MODEL OF ZOLEDRONIC ACID-INDUCED
OSTEONECROSIS OF THE JAW****ABSTRACT**

Zoledronic acid (AZ) is frequently used in the treatment of some cancers to prevent bone metastases. However, this drug is immeasurably associated with mandibular osteonecrosis (BRONJ), interfering with patients' quality of life. Considering that the concentration of pro-inflammatory mediators and a complex network of intracellular signaling involving AMPK possibly influence the pathogenesis of BRONJ, our study evaluated the influence of chronic administration of metformin (MET), a drug with possible immunomodulatory potential and AMPK agonist, on the cellular profile and expression of osteoclastic and inflammatory markers in AZ-induced BRONJ. For this, 30 Wistar rats were subjected to BRONJ induction protocol. They had their body mass and fasting blood glucose levels routinely measured. Animals treated with MET received this drug (250 mg/kg) daily by gavage. After euthanasia, mandibular arches subjected to extraction and their gums were obtained for analysis. Furthermore, RAW 264.7 cells were incubated with AZ and/or MET for cell viability tests and analysis of IL-1 β expression. In the post-extraction socket, BRONJ was characterized by an increase in the number of empty osteocyte lacunae, the total amount of osteoclasts and apoptotic osteoclasts, the expression of TRAP and F4/80, as well as leukocytes number increase. In the inflammatory evaluation of the gingival tissue, an increase in myeloperoxidase activity (MPO) was observed. In cell culture, AZ treatment increased IL-1 β expression. The use

of MET attenuated BRONJ, reduced the apoptotic OCs and intensified the expression of TRAP caused by AZ. Furthermore, MET reduced both the leukocytes number increase and expression of F4/80 in alveolar bone, as well as MPO activity in gingival samples from animals with BRONJ. In fact, MET also decreased the expression of IL-1 β caused by AZ *in vitro*. Thus, treatment with MET alleviated BRONJ, with influences on the expressions of osteoclastic markers. It is suggested that such effects probably resulted from the anti-inflammatory potential of this drug presented in our study.

Keywords: Zoledronic acid; Osteonecrosis; Metformin; Inflammation; Diabetes.

INTRODUCTION

Bisphosphonates (BFs) are drugs with promising antiresorptive potential and have been used to reduce bone resorption in osteoporosis, for example, in postmenopausal women, as well as to prevent bone metastases in high-risk cancer cases (KHAN et al., 2015; ROSINI; BERTOLDI; FREDIANI, 2015; SINGH; GONEGANDLA, 2020). Several studies have evaluated the antiresorptive potential of these drugs in the treatment of chronic inflammatory disorders characterized by bone resorption, such as rheumatoid arthritis and periodontitis. Despite this great advantage, it is clear that the mechanisms underlying the therapeutic potential of BFs mean that such drugs also demonstrate adverse effects, which are substantially represented by osteonecrosis, especially in the maxillomandibular bones, referring to the term Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ), which has been commonly mentioned in scientific literature since 2003 (MARX, 2003; SINGH; GONEGANDLA, 2020; OMI; MISHINA, 2022).

BRONJ is an important clinical condition represented by pain and bone exposure, presenting similarities to ON arising from osteomyelitis, irradiation or even other antiresorptive medications (KHAN et al., 2015; ROSINI; BERTOLDI; FREDIANI,

2015; SINGH; GONEGANDLA, 2020). In addition to the changes in bone metabolism that are involved in the etiology of BRONJ, an important association of the local concentration of pro-inflammatory mediators in the development and clinical severity of this disease is observed (MARX, 2003; KANEKO et al., 2018), of such that the use of anti-inflammatory drugs may eventually interfere with its pathogenesis.

In this way, the drug Metformin (MET) catches our attention. This is one of the most prescribed drugs worldwide, being the first line of pharmacological treatment against type 2 diabetes mellitus (BAHRAMBEIGI et al., 2019; FLORY; LIPSKA, 2019; KRISTÓFI; ERIKSSON, 2021), having its origins in phytotherapy (KRISTÓFI; ERIKSSON, 2021). The hypoglycemic effects of this drug are already well proven, but some immunomodulatory effects remain incompletely elucidated, although they are probably related to its intracellular mechanisms. MET has been recognized as an AMPK agonist drug, an enzyme highly associated with energy metabolism in a complex network of intracellular signaling (RENA; HARDIE; PEARSON, 2017; VILLANUEVA-PAZ et al., 2016).

In recent years, the increasing use of MET has resulted in scientific research that has studied additional potentials of this drug. Evidence showed that patients with DM-2 and chronic exposure to MET had a lower incidence of cancer or a better response to cancer therapy in general, such that the anticancer potential of MET was observed primarily in diabetic patients (THAKUR; DALEY; KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019), arousing the interest of the scientific community in investigating this role.

Regarding the anticancer effect of MET, preclinical studies report that there is a double suppression of mTOR, resulting in lower protein synthesis and decreased cell proliferation. Namely, the activation of AMPK, through reduction of ATP, in addition to directly suppressing mTOR, also culminates in the inhibition of the phosphorylation of

substrate-1 of the insulin receptor (THAKUR; DALEY; KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019; VILLANUEVA-PAZ et al. 2016). This, in turn, transmits insulin growth factor signals via PI3K/AKT and, therefore, its blockade reduces AKT signaling, whose target is mTOR (BAHRAMBEIGI et al., 2019; THAKUR; DALEY; KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019). Additionally, some anticancer effects of MET are independent of the connection with AMPK, and these are characterized by antioxidative actions, with a reduction in mitochondrial oxidative phosphorylation and a consequent decrease in the production of reactive oxygen species, and anti-inflammatory actions against cancer cells, with the blockade of activity of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) and, consequently, reduction in the secretion of pro-inflammatory mediators (PODHORECKA; IBANEZ; DMOSZYŃSKA, 2017).

In fact, MET has also shown promise for its anti-inflammatory effects. Studies demonstrated that MET reduced the expression of the NLRP3 inflammasome and cytokines such as IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α induced by *P. gingivalis* LPS in periodontal ligament cells, indicating a possible protective potential against periodontitis, a disease of bacterial etiology (KANG et al., 2017; TAN et al., 2020). Furthermore, in pathologies associated with other causes, such as rheumatoid arthritis, MET has also shown to have effective anti-inflammatory potential. Interestingly, in a clinical study, a reduction in serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17 and NF- κ B was observed in patients affected by this disease and treated with MET, which translated into the clinical efficacy of this drug (ABDALLAH et al., 2021).

Few studies, however, report the effects of MET directly on bone tissue, although the literature indicates that AMPK induces osteoblastogenesis, through the activation of the OB-specific transcription factor, Runx-2, and inhibits induced osteoclast differentiation. by RANKL (BAHRAMBEIGI et al., 2019). Our study is the first to

evaluate the effect of chronic administration of MET in an experimental protocol for osteonecrosis induced exclusively by BFs for 70 days, involving analysis of the cellular profile and the expression of osteoclastic and inflammatory markers.

MATERIALS AND METHODS

Animal selection

Thirty male Wistar rats, with body mass from 180 grams, were used for the analyzes in the present study. These animals came from the central vivarium of the Federal University of Ceará and were kept in appropriate cages, in a temperature-controlled environment (22-25 °C), air exhaust, 12 h light/dark cycle each, with free access to drinking water. and standard food, respecting the maximum number of 03 animals per box. The studies were started only after approval from the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Ceará, with protocol number 5649020519.

Experimental protocol for BRONJ

In BRONJ induction, the previously recommended experimental model was used (SILVA et al., 2015). AZ (SUN pharma) was dissolved in sterile 0.9% saline solution and was administered at a dose of 0.2 mg/kg weekly intravenously, for 3 consecutive weeks (days 0, 7 and 14). On the 42nd day after the first administration, extraction of the lower left first molar was performed.

In this procedure, the animal was previously anesthetized with a combination of xylazine and ketamine (90 and 10 mg/kg, i.p., respectively). Syndesmotomy and dislocation procedures were then performed, with the aid of a number 05 exploration

probe and 3S spatula, followed by the extraction of the lower left first molar, with the aid of a Lecron spatula or Mayo needle holder. One week after the aforementioned extraction, corresponding to 49 days after the first administration of AZ, the animals received an additional dose of AZ, in a similar way to the previous ones, and were euthanized through exsanguination under prior anesthesia, on the 70th experimental day. The remaining animals, which were not subjected to BRONJ by AZ, received, on the respective days, the administration of 0.9% saline solution.

Pharmacological Approach: Metformin

MET (Merck KGaA, 500 mg tablet) was dissolved in 0.9% saline solution and administered daily at a dose of 250 mg/kg to the animals by gavage, from experimental day -7 until euthanasia. This dose was chosen based on experimental protocols previously published in the scientific literature, in which MET showed anti-inflammatory activity in Wistar rats, without demonstrating underlying toxic effects.

Experimental groups

In the present scientific research, the animals were divided into 3 experimental groups:

- Group 1 (Naive group): The animals were not subjected to DM or ONJ induction and did not receive administration of any substance. These animals provided baseline control data for the experimental protocols of this present research.
- Group 2 (BRONJ Group): The animals were subjected only to weekly administration of AZ on days 0, 7, 14 and 49, following recommendations previously stated, for induction of BRONJ.

- Group 3 (BRONJ + MET Group): The animals received MET administration, by gavage, from day -7 to the 70th experimental day, as well as weekly administration of AZ on days 0, 7, 14 and 49.

Obtaining samples after animal euthanasia

On experimental day 70, the animals were euthanized by exsanguination, after anesthesia with xylazine and ketamine (90 and 10 mg/kg, i.p., respectively). The left mandibular hemiarcs and their respective gingival tissue adjacent to the area of interest (lower left first molar) were then removed from each animal, and stored in 4% buffered formalin and in a freezer at -80° C, respectively.

Histological Procedures

Microscopic analyzes were evaluated in serial sections of the mandibular hemiarcs submitted to extraction. To this end, after euthanizing the animals on the 70th experimental day, the hemiarcs were removed and fixed in 4% buffered formalin for 24 hours. Next, the aforementioned specimens were subjected to demineralization with 10% EDTA buffered with 0.1M phosphate, pH 7.0, for approximately 25 days. Subsequently, the hemiarcs were neutralized in a running water bath for 24 hours to be processed in paraffin, and were then sent for histological evaluation in hematoxylin–eosin (HE) and immunofluorescence analysis. In such analyses, the region of the residual socket related to the extraction of the lower left first molar was considered.

Histological evaluation: cellular profile analysis

From the specimens processed in paraffin, serial sections of 3-4 µm were made using a microtome and the slides obtained were stained using the HE method, mounted

with Canada balsam, for subsequent microscopic analysis using conventional light microscopy. The counting of osteocyte lacunae (viable and empty) and osteoclasts (viable and apoptotic), as well as neutrophils and mononuclear cells, was considered in this evaluation. To this end, photographs of different high-magnification microscopic fields (400x) were obtained at the analysis site.

This analysis was carried out using the Image J® software (YAMASHITA et al., 2011). Namely, osteoclasts were considered apoptotic and under the effect of AZ when they presented peculiar characteristics, such as increased size, as well as more numerous, pyknotic nuclei and vacuolization in cytoplasm according to scientific literature (GROSS et al., 2017).

Expression of F4/80 and TRAP by Immunofluorescence

For this analysis, the same blocks used in the histological analysis were cut into serial sections (4µm) on slides with poly L-lysine (Probe on Plus®) suitable for the immunofluorescence technique. Sections were obtained from paraffin-fixed tissues. The slides containing the sections were kept in an oven for 1 hour at 60°C, followed by two baths in Xylol for 10 minutes to dewax the tissues. Excess Xylol and tissue hydration were achieved by successive Ethanol baths in decreasing concentrations, namely: 2 baths of 10 minutes of absolute Ethanol; 1 bath of 90%, 70%, 50% Ethanol for 5 minutes, in that order. The slides were then washed in running water for 10 min, followed by 3 baths of PBS for 5 min each. Antigen retrieval was carried out in 0.1 M Sodium Citrate Buffer (pH 6.0), at a temperature of 95 °C, for 30 minutes, followed by cooling at room temperature for 20 minutes. After this step, three 5-min PBS baths were performed. Membrane permeabilization was carried out in a solution containing 200 µL of PBS, 4

mL of 5% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) and 200 μ L of 0.1 triton X-100 % (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) for 10 min.

Then, 3 washes were performed with PBS for 5 min each. Blocking of nonspecific bonds was performed with 0.3M Glycine (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) in 5% BSA for 30 min. The tissues were incubated at a temperature of 2 – 4°C, overnight, with the primary antibodies made in rabbit anti-f4/80 (1:200, Cell Signaling Technology, USA) and anti-TRAP (1:100, Invitrogen, USA). After the primary antibody incubation time was completed, 3 washes of 5 min each were performed with PBS for subsequent incubation with the secondary donkey antibody, rabbit anti-igG (1:200), Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 hour and 30 min at the same concentration established for the primary antibody. From that point onwards, the following steps were carried out protected from light. After the end of the secondary antibody incubation, 3 washes were performed with PBS for 5 min each. Cell nuclei were labeled with DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (4 μ L in 200 mL of PBS) for 30 min, followed by successive washes in distilled water, totaling 3 washes of 5 min each. To mount the slides, Prolong Gold Antifade Mountant medium (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used. To acquire the photomicrographs, a fluorescence microscope (ByoTek Cytation Imaging, Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used.

The images obtained were analyzed using image software (Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, USA). Quantification of the fluorescent area was done by differentiating the fluorescent pixels related to red fluorescence (Alexa Fluor 568) and blue staining to identify cell nuclei labeled with DAPI. Detection color thresholds were established and standardized in all quantifications. The data obtained

were expressed in fluorescence area by comparing the fluorescence intensity of the target marker with DAPI (100%).

Assessment of the activity of the Myeloperoxidase enzyme in the gingival tissue of animals subjected to BRONJ

Myeloperoxidase (MPO), an enzyme present in neutrophil granules, is used as a marker of the presence of these cells in inflamed tissue. In our study, this enzyme was evaluated in the gingival tissue underlying the extraction area in mandibular specimens from animals submitted to the present experimental protocol. Its presence was determined using a colorimetric method and the final reading was performed using a plate reader. Briefly, each sample was weighed and homogenized in a NaCl and disodium EDTA solution diluted in Phosphate Buffer (0.02M) and crushed in a Quiagen TissueLyser LT using 4.5 mm steel beads. The samples were then centrifuged (3000 rpm, 15 min, 4°C) with subsequent discarding of the supernatant and resuspension of the pellet in a hypotonic solution (0.2% NaCl) for cell lysis. After another centrifugation, the resulting pellet was resuspended in 300 µL of 0.05 M NaPO₄ buffer, pH 5.4, containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB, Sigma-Aldrich/Merck Millipore, São Paulo, Brazil). MPO activity was determined using a 1:4 mixture of tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.5 mM). The reaction was stopped with a sulfuric acid solution (2M) and the absorbance was analyzed at 450 nm using a spectrophotometer. Absorbance readings were plotted on a standard curve of mouse peritoneal neutrophils, as described by Dornelas-Filho and colleagues (DORNELAS-FILHO et al., 2018). The results obtained were expressed as MPO activity (neutrophils/mg of tissue).

Cultivation of Raw 264.7 strains

The murine macrophage line (ATCC® clone TIB-71™) was purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank and cultivated in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco ® - Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotic (100 IU/ml Penicillin/streptomycin 100 µg/mL) (Sigma) in an oven at 37°C in an incubator with 95% humidity and 5% CO₂. Cell growth was observed under an inverted phase-contrast microscope. Maintenance was carried out twice a week in a vertical laminar flow chamber with biosafety level II, mechanically removing the cells from the bottle (Kasvi, 75 cm², volume of 250 mL), when 60 – 70% confluence was reached.

Viability assay in murine macrophages using the Alamar Blue (Resazurin) method

The determination of cell viability induced by AZ and/or MET was evaluated by the alamar blue method in Raw 264.7 Macrophages (3x10³ cells/mL in 96-well plates. After 24 hours of cell growth, different concentrations of AZ and/or MET were added (1.000 – 0.001 µg/mL of PBS) for 24 h, with the group with only the culture medium being considered control. After the incubation time, the culture medium was removed and the dye (0.312 mg/mL; VETEC) was added and incubated with 5% CO₂ at 37 °C for at least 1h. The plates were read in a microplate reader (BioTek Synergy HT), using excitation wavelength at 530-560 nm and emission at 590nm. Viability results were expressed as percentage of cell viability, determined using the formula:

$$Viability (\%) = \left(\frac{Sample\ absorbance}{Mean\ absorbance\ of\ the\ DMEM\ control\ group} \right) \times 100$$

Measurement of IL-1β in cell culture supernatant

The culture supernatant of RAW 264.7 macrophages treated with AZ (10 μ M), MET (4 Mm) and AZ+MET (10 μ M and 4 mM, respectively) was frozen at -80° C for subsequent IL-1 β measurement using the method ELISA (SUN et al., 2017).

For this, a 96-well plate with a high-binding surface was sensitized with 100 μ L of murine anti-IL1 β capture antibodies (R&D systems) for 12h at 4° C. Subsequently, the bonds were blocked with 1% BSA (in PBS) and the supernatant from cell culture were included in the wells and incubated for another 2 h at 4° C. Detection antibodies were added to the plate and it was incubated for 2 h. Then, the plate was washed again and 100 μ L of the diluted HRP-streptavidin complex (1:40) was added, with the plate protected from light from this stage onwards. After 20 minutes, the substrate for the enzyme was added and the plate was incubated at 25°C for another 20 minutes. To stop the enzymatic reaction and perform the reading, 50 μ L of the solution containing 2N sulfuric acid (H₂SO₄) was added.

The reading was carried out on a spectrophotometer using a wavelength of 450 nm. The results were expressed in picogram of cytokines/mL of supernatant, with the concentration of the samples obtained from a standard curve of each cytokine with 8 different concentrations, starting from a serial dilution. The initial concentration was 4000 pg/ml for IL-1 β .

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). After performing a normality test, the data were analyzed using One-way ANOVA and Bonferroni post-test, or Kruskal-Wallis and Dunn post-test, as appropriate. In all situations, the significance level $p < 0.05$ was adopted. Additionally, the GraphPad Prism® software version 8.0 was used.

Ethical aspects

All *in vivo* protocols indicated in this project were submitted and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Ceará, under number 5649020519. The researchers involved committed to making every effort to reduce the number of animals to a minimum. of animals to be used, as well as their suffering, in accordance with the ethical principles for working with laboratory animals.

As for *in vitro* tests, the execution of the research project was approved by the National Technical Commission for Biosafety CTNBio, authorizing the manipulation of Genetically Modified Organisms of risk class 2 (GMO NB2). The handling and disposal of waste from this strain followed the technical standards established for handling GMO NB2.

RESULTS

Analysis of bone parameters in the socket after extraction

Important histological changes were observed at the site of analysis of the mandibular bone tissue of animals that received intravenous injections of AZ (0.2 mg/kg), on experimental days 0, 7, 14 and 49, indicating bone necrosis (Figure 1 D-F). These are represented by an increase in the number of empty osteocyte lacunae and a concomitant reduction in osteocyte viability in animals in the BRONJ group (45.05 ± 3.77) compared to those in the Naive control group (14.12 ± 1.471) (Figures 1 A-C and 2A).

Daily administration of MET (250 mg/kg), for 77 experimental days, prevented the aforementioned bone necrosis (Figure 1 G-I), such that the group of animals receiving AZ and treated with MET, represented by the BRONJ +MET group (24.43 ± 3.83),

presented a smaller number of empty osteocyte lacunae and, consequently, a greater number of viable osteocytes, compared to the BRONJ group (45.05 ± 3.77) (Figure 2A).

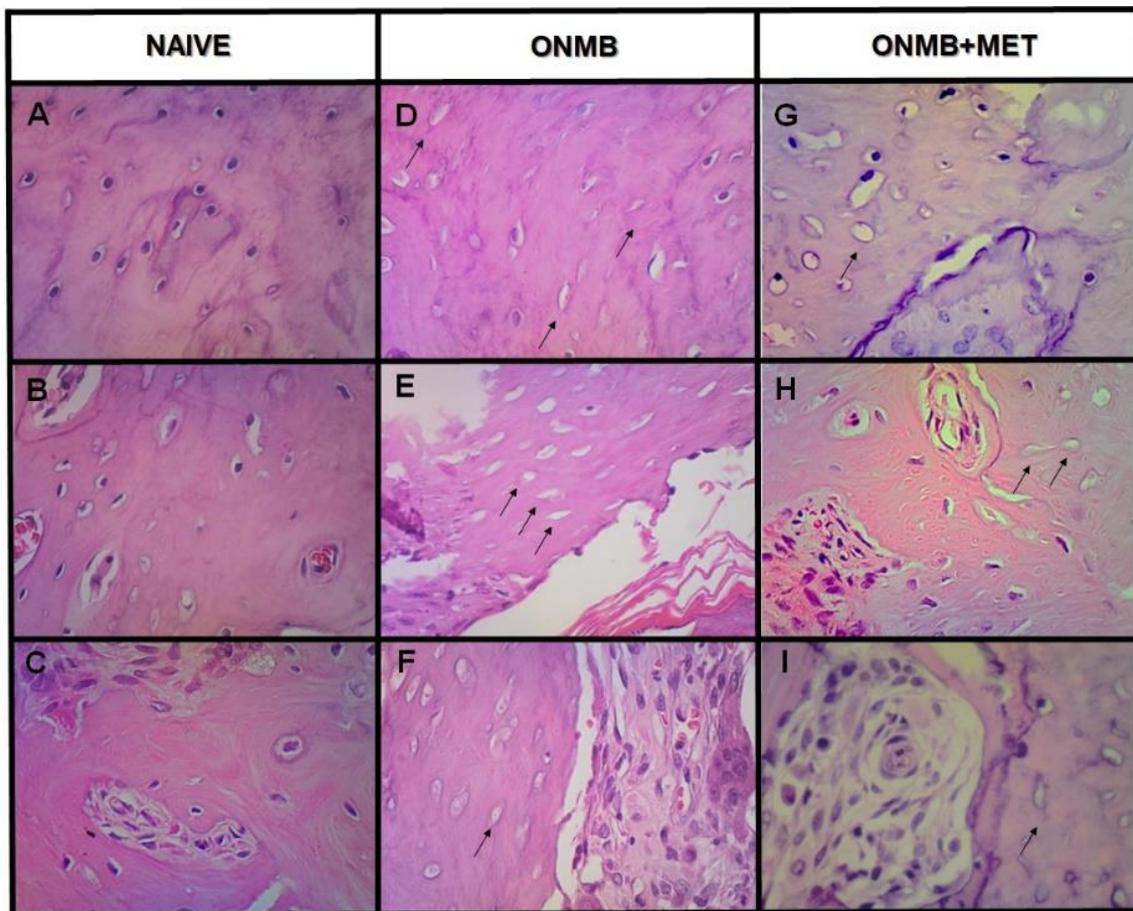


Figure 1: Photographs of histological slides stained in HE. The region analyzed was the bone tissue surrounding the healing socket (400x magnification) of groups NAIVE (A-C), BRONJ (D-F), BRONJ+MET (G-I). Arrows indicate areas of bone necrosis, with empty osteocyte lacunae. A reduction in this aspect was observed in the group treated with MET.

Experimental protocol using AZ, in the present study, was characterized by a significant increase in the number of osteoclasts in the alveolar sites analyzed, as observed in the BRONJ group (11.2 ± 1.52) in relation to the Naive group (1 ± 0.68) (Figure 2B). This result occurred at the expense of a significant increase in the number of apoptotic osteoclasts in specimens from animals subjected to BRONJ (77.22 ± 4.6), compared to groups of Naive animals (0.0 ± 0.0) (Figure 2C).

The administration of MET, in the BRONJ + MET group, did not significantly influence the number of total osteoclasts (8.33 ± 0.84) (Figure 2B), but reduced the percentage of apoptotic osteoclasts (40.09 ± 6) (Figure 2C), compared to animals from the BRONJ group.

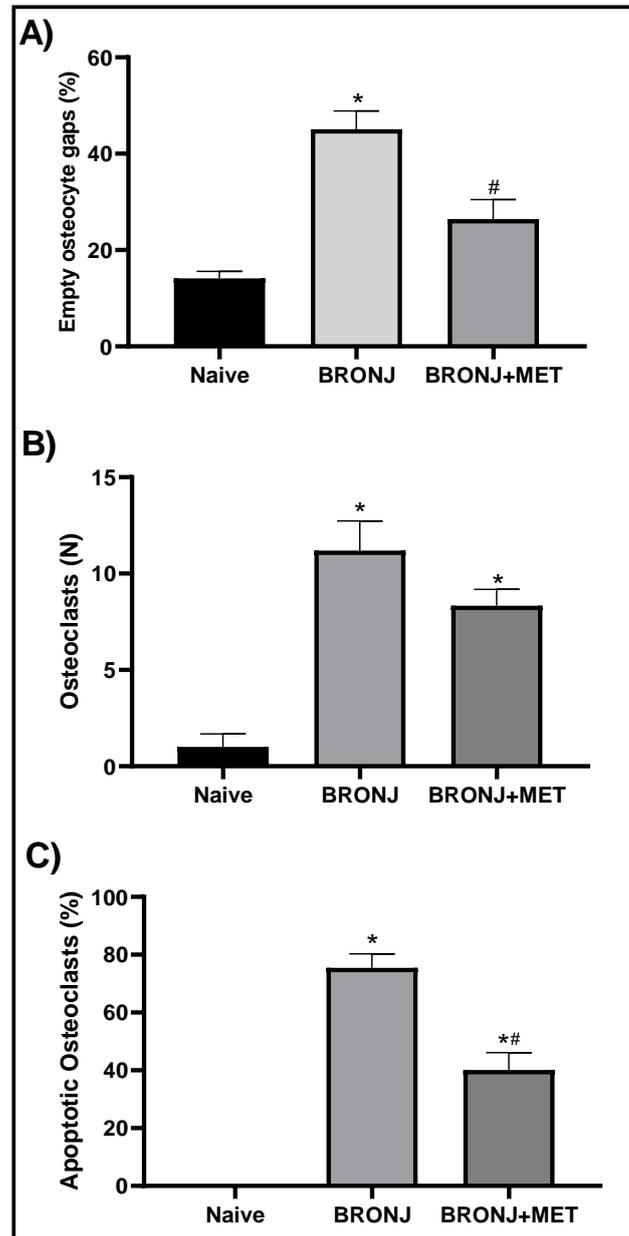


Figure 2: Cellular profile in the bone tissue in the post-extraction socket. The region analyzed was the bone tissue surrounding the socket healing post-extraction. * $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to the Naive control group. # $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to the BRONJ control group.

Osteoclast activity was assessed by analyzing TRAP marker expression by immunofluorescence in the same specimens targeted for HE analysis. The administration of AZ, in the BRONJ group, induced a significant increase in the expression of TRAP in the bone tissues analyzed (20.28 ± 1.83), in relation to the Naive group (2.871 ± 0.7420). Additionally, animals subjected to BRONJ and treated daily with MET (43.24 ± 5.590) showed a significant increase in TRAP expression, compared to animals subjected to BRONJ without treatment (Figure 3 A-B).

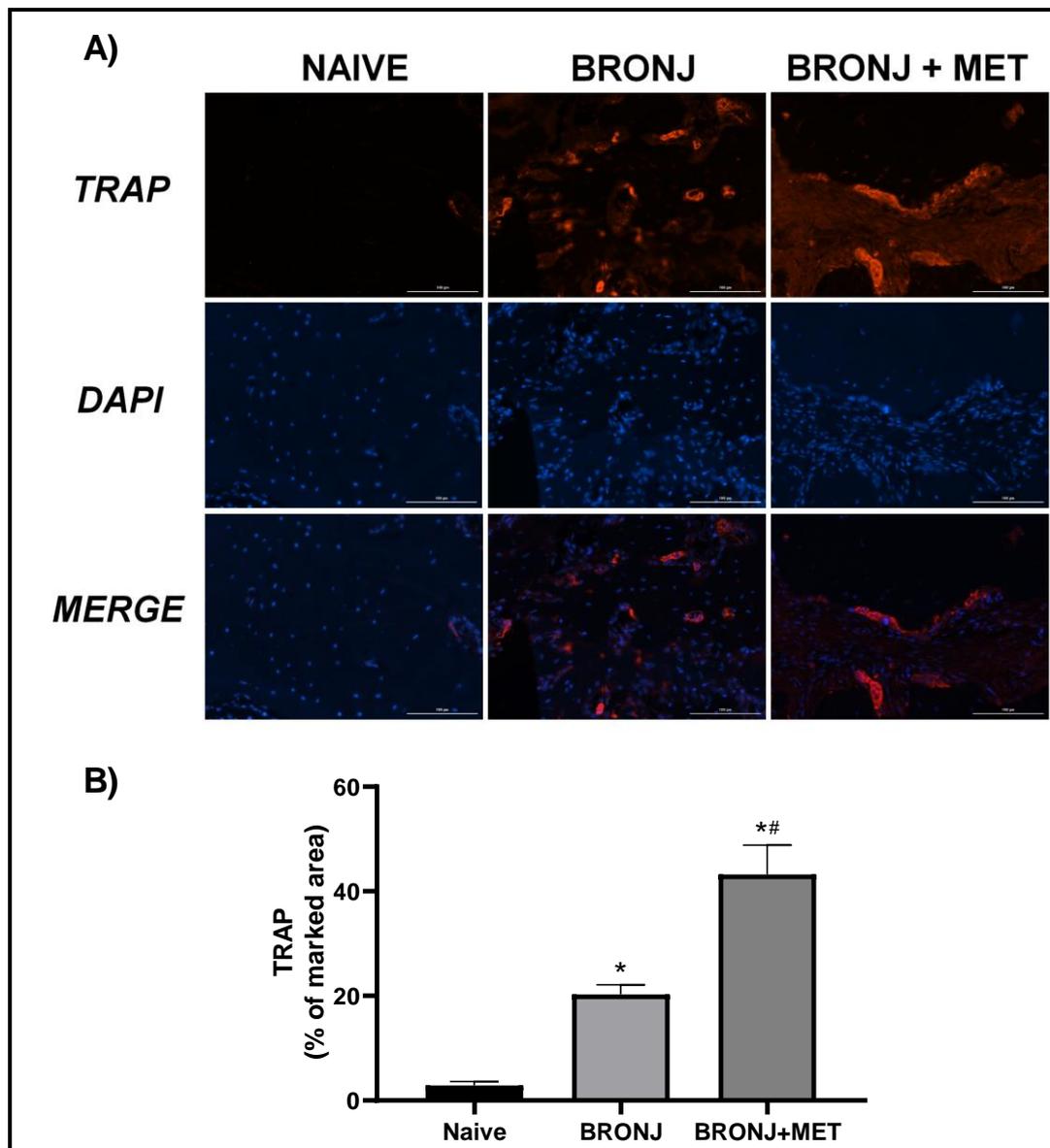


Figure 3: TRAP expression by immunofluorescence. Representative images with a scale of 100 μm (A) and graph after statistical analysis (B) * $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to the Naive control group. # $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to the BRONJ control group. The region analyzed was the bone tissue surrounding the healing socket.

Analysis of inflammatory parameters in the socket after extraction

The induction of BRONJ (124.4 ± 15.29) caused a significant increase in the total number of leukocytes in the alveolar bone tissue analyzed, compared to those in animals belonging to the Naive group (49.5 ± 9.66). Daily administration of MET, however, was not able to prevent the increase in the number of total leukocytes in animals receiving AZ, according to the protocol of the present study, as observed in the BRONJ + MET group (105.2 ± 1.09) (Figure 4A).

As for the polymorphonuclear:mononuclear proportion per group, it was 3.5%:96.5% and 15.5%:84.5% for the Naive and BRONJ groups, respectively, with significant differences. Regarding the group of animals with BRONJ treated with MET, the respective percentages were 6%:94%, being similar to those of the Naive group (Figure 4B).

The analysis of anti-inflammatory parameters also occurred in the gingival tissue surrounding the extraction area through the assessment of MPO activity. This enzyme is an important parameter in the analysis of neutrophil activity. In the aforementioned experimental protocol, it was observed that the administration of AZ caused an increase in this inflammatory parameter in the specimens analyzed from the BRONJ group (550.2 ± 239), compared to that from the Naive group (57.51 ± 13.64). Daily treatment with MET prevented this increase (108 ± 31.43), indicating a significant reduction in neutrophil activity compared to animals in the BRONJ group (550.2 ± 239) (Figure 4C).

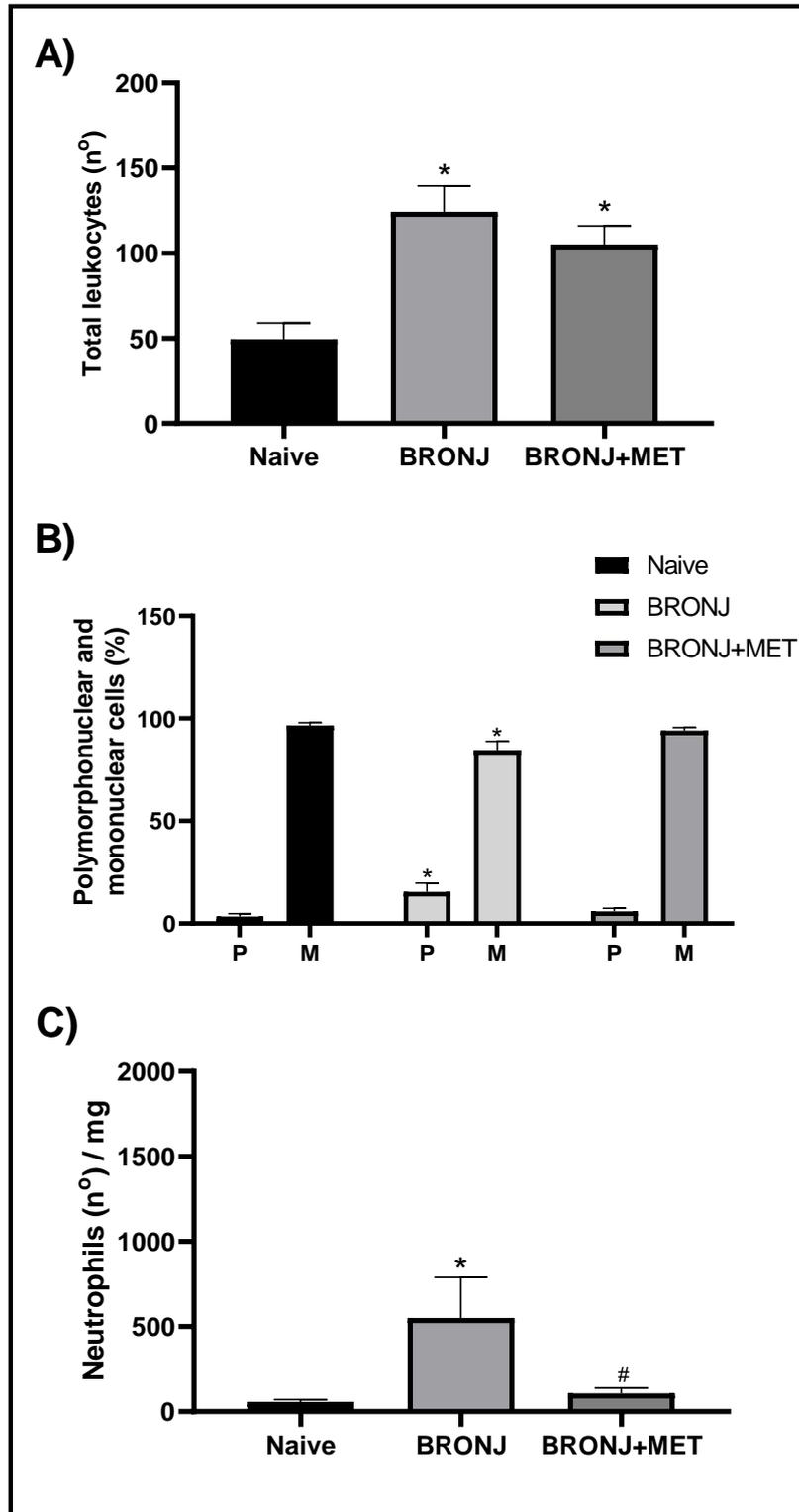


Figure 4: Effect of MET administration on the analysis of inflammatory parameters in animals with BRONJ. Treatment with MET did not cause changes in the total number of leukocytes (A) or in the percentage of Polymorphonuclear or Mononuclear cells (B) in the bone tissue surrounding the healing socket. In gingival tissue, however, MET reduced MPO activity in specimens from MET-treated animals (C). * $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to the Naive control group.

F4-80 is a restricted marker of the presence of macrophages and its expression was analyzed through immunofluorescence of alveolar bone tissue in post-extraction healing. Namely, a significant increase in the expression of this marker was observed in animals subjected to BRONJ (8.415 ± 0.8768) compared to animals in the Naive control group (2.901 ± 0.3612). Daily treatment with MET significantly reduced the expression of F4/80 (3.370 ± 0.3326) in animals subjected to BRONJ (Figure 5 A-B).

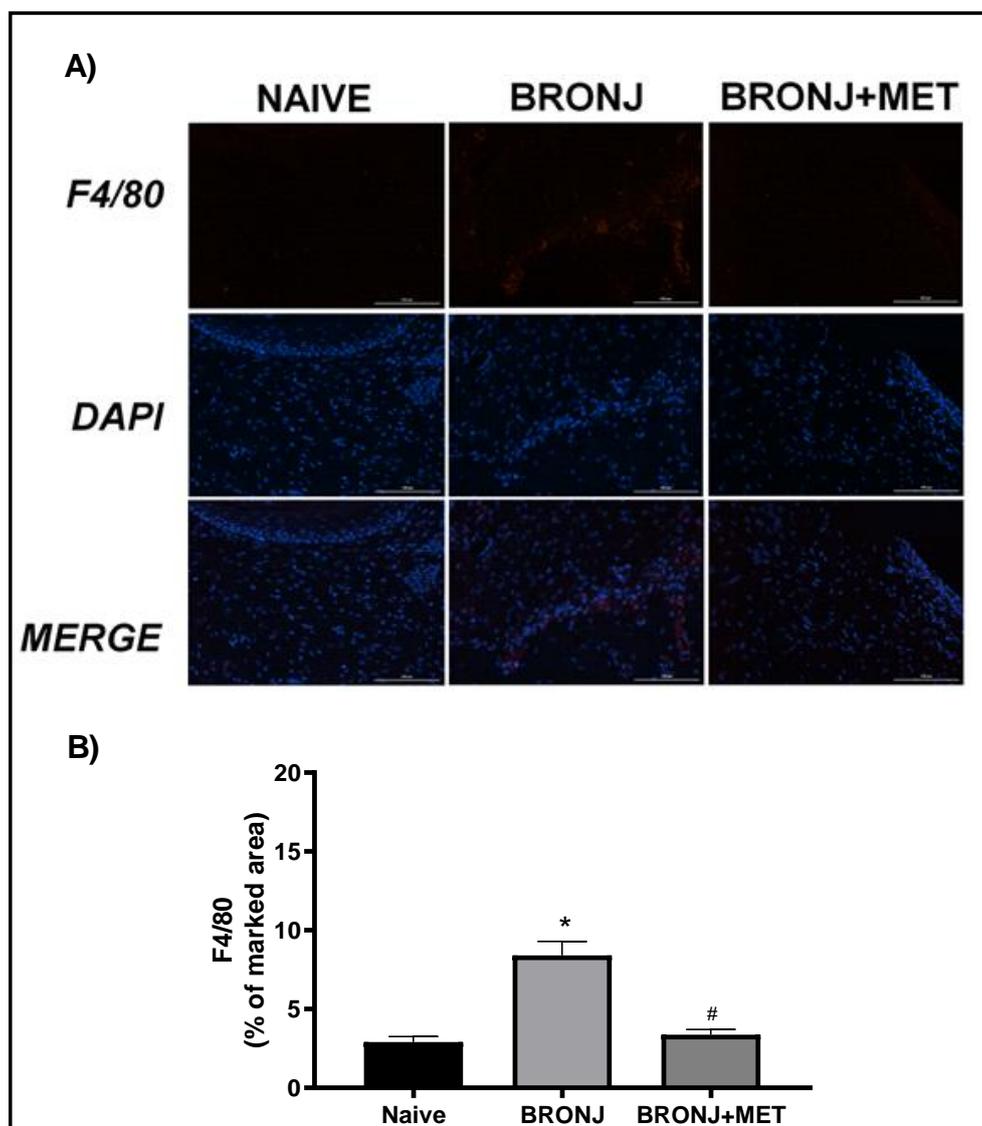


Figure 5: Expression of F4/80 by immunofluorescence. Representative images with a scale of 100 μ m (A) and graph after statistical analysis (B) * $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to the Naive control group. #

p<0.05 represents statistically significant data compared to the BRONJ control group. The region analyzed was the bone tissue surrounding the healing socket.

Inflammatory analysis *in vitro* macrophages treated with AZ and/or MET

During the 24-hour incubation time, treatment with AZ did not show significant effects on the viability of RAW 264.7 at any of the concentrations (μM) used in the present study (Figure 6A). Differently, treatment with MET resulted in significant cell growth at a concentration of 4Mm (Figure 6 B). Thus, treatment with AZ and MET to analyze the concentration of IL-1 β in the cell culture supernatant was carried out using concentrations of 10 μM for AZ and 4mM for MET, with an incubation period of 24 hours. Such concentrations of AZ are in accordance with scientific literature (HAN et al., 2018; KALKAR et al., 2022) and did not harm cell growth evaluated in our study. The concentration of 4Mm for MET was chosen for the ELISA assay because it caused a significant increase in cell growth within 24 hours.

It was observed that treatment with AZ induced a significant increase in the concentration of IL-1 β (68.74 ± 7.21) in relation to DMEM (0.00 ± 0.00) and the supernatant treated with MET (17.83 ± 17.83). Concomitant treatment of MET with AZ significantly prevented this increase (0.00 ± 0.00) (Figure 6B).

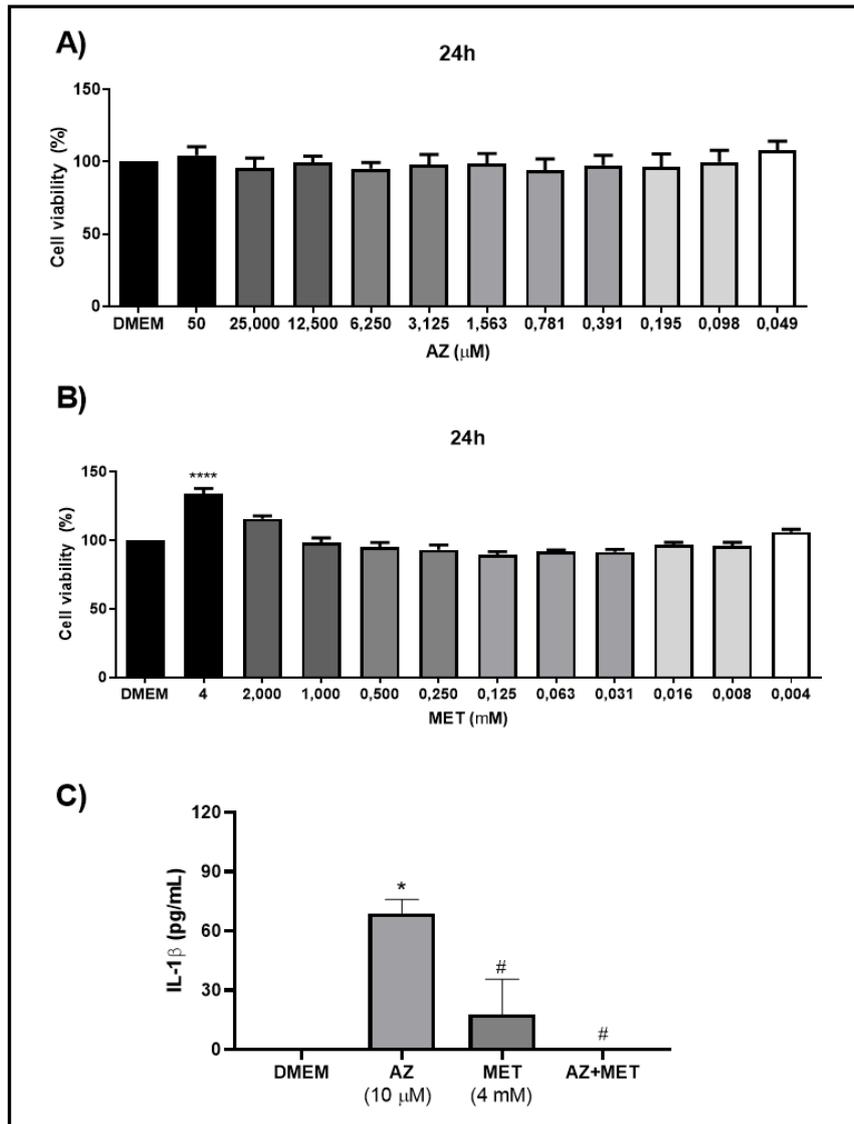


Figure 6: In vitro analysis performed in the present study on RAW 2647 cells. Analysis of cell viability under various concentrations of AZ (A) and MET (B). The concentration of IL-1 β in the cell supernatant was evaluated by ELISA after incubations of macrophages in AZ (10) and MET (4Mm) (C) * $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to DMEM. # $p < 0.05$ represents statistically significant data compared to the AZ group.

DISCUSSION

AZ is one of the most widely used intravenous BFs worldwide with the main purpose of preventing bone metastases in risk situations, such as breast cancer (COLEMAN et al., 2011). Its mechanism of action is primarily based on the inhibition of osteoclasts, such that the use of this drug inhibits bone resorption. Consequently, the

alveolar bone remodeling process aimed at bone renewal or repair becomes impaired, since there is no effective formation of the primary bone reabsorption gap, the starting point in the dynamics of bone turnover (SINGH; GONEGANDLA, 2020; JENSEN et al., 2021). Furthermore, AZ has also been recognized for its anti-angiogenic effect (WOOD et al., 2002; YAMADA et al., 2009; DI SALVATORE et al., 2011), which contributes to its anti-metastatic potential. However, this drug has been associated with bone necrosis, the main adverse effect resulting from its use.

Thus, in the present study, the intravenous use of AZ at a dose of 0.2 mg/kg, on experimental days 0, 7, 14 and 49, combined with bone trauma performed on the 42nd experimental day, was capable of intensely inducing areas of necrosis bone in the analyzed mandibular specimens. Namely, the formation of empty osteocyte lacunae was proportionally related to the quantification of necrotic bone in our study, since this finding is considered an essential criterion for determining BRONJ (SILVA et al., 2015; SOMA et al., 2022). Furthermore, the observation of few cells in the regions immediately surrounding the necrotic bone was also a striking characteristic of bone necrosis observed in the present research.

Considering BRONJ a disease influenced by the presence of pro-inflammatory mediators and with pathological mechanisms possibly involving the participation of other cell types in addition to osteoclasts (KANEKO et al., 2018), such as macrophages, not yet completely elucidated in the scientific literature, we We also intend to evaluate the effect of using MET, an antidiabetic drug with anti-inflammatory and immunomodulatory potential (KANG et al., 2017; PODHORECKA; IBANEZ; DMOSZYŃSKA, 2017; TAN et al., 2020), on the evolution of parameters associated with BRONJ. MET was administered by gavage daily throughout the experimental protocol, since the oral

administration route is considered standard in the chronic use of this drug, with little possibility of adverse effects (SHURRAB; ARAFA, 2020).

MET treatment reduced the number of empty osteocyte lacunae compared to the untreated BRONJ group. No other scientific study has evaluated the effect of oral administration of MET for 77 experimental days, starting prior to the first injection of AZ, in animals with BRONJ induced exclusively by BFs (AZ at 0.2 mg/kg). However, we can highlight that the protective effect of MET against BRONJ observed in our experimental protocol is in agreement with a previous study, in which the daily administration of MET (250 mg/kg), by gavage, reduced the occurrence of BRONJ induced by AZ (0.1 mg/kg) and corticosteroids in a 6-week experimental protocol. In this sense, it is worth highlighting that, although MET is considered an AMPK agonist (BAHRAMBEIGI et al., 2019; RENA; HARDIE; PEARSON, 2017; THAKUR; DALEY; KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019) and negatively regulates the function of osteoclasts (BAHRAMBEIGI et al., 2019), which could exacerbate the effect of BRONJ in the present study, is also via the AMPK pathway (BAHRAMBEIGI et al., 2019; RENA; HARDIE; PEARSON, 2017; THAKUR; DALEY; KLUBO-GWIEZDZINSKA, 2019) that it positively regulates the expression of genes that favor osteoblastic activity (PARK et al., 2020), such as RUNX2 and osteocalcin, in addition to increasing the activity of bone alkaline phosphatase, a marker of osteoblast activity (BAHRAMBEIGI et al., 2019; JIATING; BUYUN; YINCHANG, 2019). Additionally, it has been observed that MET stimulates the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), in such a way that it contributes to angiogenesis and local microcirculation (BAKHASHAB et al., 2018). Such factors may have influenced this protective effect of MET evidenced in our study.

Regarding the effects on osteoclastic cells, the BRONJ experimental protocol in the present scientific research was accompanied by a significant increase in the total number of osteoclasts. Such a result may seem paradoxical to the inhibitory effect of BFs on osteoclasts. However, it has been described that the number of osteoclasts on the bone surface, after administration of BFs, tends to increase initially and only after a longer period is this number reduced (KUROSHIMA; GO; YAMASHITA, 2012; GROSS et al., 2017).

Thus, our results are in line with previous reports in which BRONJ was characterized by an increase in the number of osteoclasts (GROSS et al., 2017; KUROSHIMA; GO; YAMASHITA, 2012) and some authors consider that this fact occurs in a compensatory way due to the induction of apoptosis of osteoclasts through the use of BFs (GROSS et al., 2017). Namely, some previous findings also report increased expression of NFATc1, a master regulator of osteoclastogenesis, in osteoclasts from specimens from patients with BRONJ, indicating that this also occurs in a compensatory manner (WEHRHAN et al., 2019).

Furthermore, we observed much of the increase in the total number of osteoclasts resulting from the administration of AZ in the BRONJ group, according to the experimental protocol in our study, which occurred at the expense of a significant increase in the number of osteoclasts considered morphologically apoptotic, which presented larger cell nuclei, pyknotic, with modified anatomy, and in greater numbers, corroborating previous reports (GROSS et al., 2017).

We found that MET did not prevent or intensify the significant increase in the total number of OCs in animals subjected to ONMB. Thus, in the context of ONMB in our study, we observed that MET did not influence the compensatory reaction of an increase in the total number of OCs caused by the administration of AZ, which was

mentioned previously. On the other hand, we observed that MET significantly reduced the percentage of apoptotic OCs in animals subjected to the ONMB experimental protocol, reducing the ratio of apoptotic OCs/total OCs.

Our study was the first to evaluate the effect of MET administration on the number of total and apoptotic OCs in an experimental model of ONMB. Although there are reports that this drug negatively regulates and induces apoptosis of OCs by activating AMPK (BIAN et al., 2021; PARK et al., 2020), these results should be further investigated and may be associated with the dose of MET or the duration of the experimental protocol in our study, since it has been observed that only high doses of MET are capable of causing apoptosis of OCs (BIAN et al., 2021).

Using the data obtained from counting OCs, we analyzed TRAP expression through immunofluorescence in our experimental protocol as this is considered an efficient method for evaluating OC activity. Therefore, we observed that ONMB was accompanied by a significant increase in the expression of this marker. Despite previous reports in which BFs induce a lower responsiveness of OCs, being represented by reduced TRAP expression (NAGAOKA et al., 2015; GROSS et al., 2017), our result is in accordance with a previous finding in which a Increased TRAP expression was also found in mandibular specimens from animals subjected to AZ administration (NAKAGAWA et al., 2021). Furthermore, the literature suggests an increase in RANKL in osteoblasts subjected to AZ in vitro (SARACINO et al., 2012), so that this fact may eventually be related to both the increase in TRAP expression and the total number of OCs presented in our study. In a way, we observed that the increase in TRAP expression was proportional to the increase in the number of OCs in animals with ONMB.

Meanwhile, surprisingly, we observed that MET administration during the 77 experimental days caused a significant increase in TRAP expression in animals with

ONMB. This result may apparently be contradictory to previous reports in which MET did not cause significant changes in TRAP expression in an ONMB experimental protocol (NAKAGAWA et al., 2021), as well as others in which MET inhibits OCs. (PARK et al., 2020; BIAN et al., 2021). However, the present result complements our data obtained in the quantification of empty osteocyte lacunae and in the counting of OCs, in which MET reduced ON injury and the percentage of apoptotic OCs. Regarding specifically the apoptosis of OCs, it is suggested that the anti-angiogenic effect of BFs, by impairing the supply of cellular nutrients and the accumulation of toxic metabolites, directly influences the cell death of these cells (SRIVICHIT et al., 2022). In this context, it is considered that MET has been shown to exert a regulatory effect on the angiogenesis process in situations of hypoxia or tissue ischemia (REN; LUO, 2021), which may have favored the present results in the bone parameters analyzed. Furthermore, it is important to highlight the participation of pro-inflammatory mediators in the etiopathogenesis of ON induced by AZ, so that such data encouraged us to investigate the anti-inflammatory potential of MET in the present experimental model.

Regarding inflammatory parameters in the healing alveolus, leukocyte counts in HE-stained specimens were considered, as well as F4/80 immunofluorescence, considered a marker of macrophages. Thus, we observed that BRONJ induced a significant increase in the number of total leukocytes, increasing the population of polymorphonuclear and mononuclear cells, which corresponded to the important increase in the expression of F4/80 in the bone tissue of animals in the BRONJ group, compared to the Naïve group. . This result is in line with others previously presented in the scientific literature, in which systemic administration of AZ caused an increase in the population of inflammatory cells and that BRONJ is associated with inflammation (SILVA et al., 2015; KANEKO et al., 2018). In fact, the role of leukocytes and pro-inflammatory

mediators in the pathogenesis of BRONJ still remains unclear. It is suggested, however, that an increase in the concentration of cytokines such as TNF- α , IL1 β , IL-6, among other pro-inflammatory cytokines, is important in the development of BRONJ. It is known that such cytokines tend to induce osteoclastogenesis and increase the demand for bone turnover (DE MOLON et al., 2019; AIT OUMGHAR; BARKAOUI; CHABRAND, 2020; KITAURA et al., 2020). In other words, in susceptible patients, as in the case of those using BFs, such demand, once combined with the inhibition of osteoclasts, would not be suppressed, which can more easily induce osteonecrosis.

About the effects of systemic administration of MET on the total and differential number of leukocytes and the expression of F4/80 in the healing alveolus of animals with BRONJ, we observed that MET did not prevent leukocytosis caused by treatment with AZ in the HE analysis, although, in the present study, animals subjected to BRONJ and pre-treatment with MET showed a significant reduction in the expression of F4/80 in immunofluorescence in relation to the BRONJ group. This divergence of results may be due to the methodological difference in the sensitivity of determining the number of inflammatory cells between HE staining and immunofluorescence, the latter being a more current method with superior sensitivity and signal amplification.

Additionally, to complement our evaluation of *in vivo* inflammatory parameters, we also considered it important to evaluate the effects of BRONJ, hyperglycemia and MET administration on neutrophils. Therefore, we also evaluated inflammation in the gingival soft tissue surrounding the area of healing sockets by measuring MPO activity, which allowed us to count the number of neutrophils per mg of tissue.

In this analysis, we observed that BRONJ induced an increase in neutrophil activity in the evaluated tissue, compared to the Naïve group. In this context, it is worth noting that BFs can impair neutrophil chemotaxis and function (FAVOT; FORSTER;

GLOGAUER, 2013). However, our result is in accordance with a previous study in which a BF increased MPO activity in a culture of neutrophils obtained from human gingival crevicular fluid (HYVONEN; KOWOLIK, 1992). Despite this, given the few reports that evaluate the influence of AZ directly on neutrophils, considering that in BRONJ there is a delay in wound healing (LANDESBERG et al., 2008), we believe that our result may be due especially to the failure in peripheral wound healing. BRONJ, characterized by exposure of bone tissue.

Still regarding MPO activity, we observed that MET reduced peripheral inflammation in the gingival tissue represented by MPO activity in animals subjected to BRONJ. In fact, previous findings indicate that MET was able to reduce oxidative stress and brain damage, with reduced MPO activity compared to control groups, in animals with diabetes and prostate cancer (OZEL et al., 2022). However, we also note that more studies are needed to measure whether there is a direct involvement of neutrophils in the pathogenesis of BRONJ and, secondarily, in association with some drug therapy.

We emphasize that our study is the first in the scientific literature to evaluate the effect of MET on the expression of F4/80 in mandibular tissue and MPO activity in the gingival tissue of animals subjected to BRONJ. Our results found through *in vivo* analyzes encouraged us to study the anti-inflammatory effect of MET on the concentration of IL1 β in the culture supernatant of RAW 264.7 macrophages treated with AZ. It is known that the transformation of IL-1 β precursors into bioavailable molecules is associated with the deubiquitination of pro-caspases, which occurs through their binding to intracellular domains of recognition receptors in macrophages, forming the basis of activation of the defined protein complex as an inflammasome (SATO et al., 2015). Thus, this is a way to verify the activation of the inflammasome indirectly through the production of IL-1 β measured in RAW 264.7 culture supernatant under treatment with AZ and/or MET.

In the present *in vitro* analysis, we observed that AZ treatment increased the concentration of IL1 β in the cell supernatant. Few studies have evaluated, directly or indirectly, the influence of the inflammasome and specifically IL-1 β on the development of BRONJ. However, it has been reported that AZ increased the expression of TLR-4 in macrophages, inducing the polarization of these cells in favor of the M1 phenotype, and that the production of pro-inflammatory cytokines induced by these BFs, including IL-1 β , occurs in dependent on the TLR-4 signaling pathway (ZHU et al., 2019). Furthermore, in a previous study, the induction of BRONJ in diabetic animals occurred through an IL-1 β -dependent mechanism (ZHANG et al., 2015). Such studies suggest that AZ has the capacity to activate Toll-type recognition receptors in macrophages and that the expression of IL-1 β is part of the pathogenesis of BRONJ.

Furthermore, we observed that MET treatment, *per se*, did not induce the expression of IL1 β in the RAW 264.7 culture. When cells were incubated concomitantly with AZ and MET, a significant reduction in the concentration of IL-1 β in the supernatant was observed compared to AZ treatment conditions. This demonstrates that treatment with MET possibly prevented the activation of the inflammasome and the consequent release of IL-1 β induced by AZ.

In this context, we suggest that MET may have reduced BRONJ injury, represented by the reduced number of empty osteocyte lacunae in the present study, at least partially through possibly anti-inflammatory mechanisms. In fact, the scientific literature is consistent with the reduction in F4/80 expression following the use of MET *in vitro* (INCIO et al., 2015; DING et al., 2015). Furthermore, in an experimental model of diabetic cardiomyopathy, reduced expressions of mTOR and IL-1 β were observed in cardiac specimens from animals treated with MET, which was reversed by the

administration of an AMPK inhibitor (YANG et al.,2019), indicating the importance of AMPK for the anti-inflammatory effects presented by MET.

In short, it has been described that MET enters the cell through cation transporters, located in the cell membrane and causes an increase in the ADP:ATP ratio, causing AMPK activation. Consequently, important signaling pathways involving the inflammatory response are inhibited, such as TNF- α /NF-KB and the protein complex involving mTOR, as it activates PTEN, in addition to suppressing TLR4, reducing the expression, especially of IL-1 β . Additionally, through an AMPK-independent mechanism, MET also has anti-inflammatory effects by directly activating Dicer, iPK2 and miRNA, leading to lower expression of several other pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 (HALOUL et al., 2019; KRISTÓFI; ERIKSSON, 2021). Therefore, the interaction between AMPK, mTOR and TLR4 appears to be essential for the anti-inflammatory effects of MET observed in our study by reducing both the expression of F4/80 in mandibular specimens evaluated *in vivo*, and the concentration of IL-1 β in the cell supernatant *in vitro*.

CONCLUSION

In the BRONJ protocol recommended in our study, MET treatment showed protective effects *in vivo* in reducing the quantification of ON injury and the percentage of apoptotic OCs. Based on the anti-inflammatory potential presented in our *in vivo* and *in vitro* analyses, it is suggested that the protective effect of MET in the present ONMB protocol partially arises from its anti-inflammatory activity. Therefore, MET is considered a promising drug for clinical use in patients using BPs, especially intravenously, where the risk of developing ONMB is greater.

REFERENCES

1. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, Reid IR, Ruggiero SL, Taguchi A, Tetradis S, Watts NB, Brandi ML, Peters E, Guise T, Eastell R, Cheung AM, Morin SN, Masri B, Cooper C, Morgan SL, Obermayer-Pietsch B, Langdahl BL, Al Dabagh R, Davison KS, Kendler DL, Sándor GK, Josse RG, Bhandari M, El Rabbany M, Pierroz DD, Sulimani R, Saunders DP, Brown JP, Compston J; International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015 Jan;30(1):3-23. doi: 10.1002/jbmr.2405. PMID: 25414052
2. Rosini S, Rosini S, Bertoldi I, Frediani B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015 Sep;19(17):3309-17. PMID: 26400539
3. Singh M, Gonegandla GS. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws (BIONJ). *J Maxillofac Oral Surg.* 2020 Jun;19(2):162-167. doi: 10.1007/s12663-019-01211-2. Epub 2019 Apr 8. PMID: 32346224; PMCID: PMC7176749.
4. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Sep;61(9):1115-7. doi: 10.1016/s0278-2391(03)00720-1. PMID: 12966493.
5. Omi M, Mishina Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. *Genesis.* 2022 Sep;60(8-9):e23490. doi: 10.1002/dvg.23490. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35757898; PMCID: PMC9786271
6. Kaneko J, Okinaga T, Hikiji H, Ariyoshi W, Yoshiga D, Habu M, Tominaga K, Nishihara T. Zoledronic acid exacerbates inflammation through M1 macrophage polarization. *Inflamm Regen.* 2018 Jun 23;38:16. doi: 10.1186/s41232-018-0074-9. PMID: 29977413; PMCID: PMC6015454
7. Bahrambeigi S, Yousefi B, Rahimi M, Shafiei-Irannejad V. Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109:1593-1601. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.032. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30551413.
8. Flory J, Lipska K. Metformin in 2019. *JAMA.* 2019 May 21;321(19):1926-1927. doi: 10.1001/jama.2019.3805. PMID: 31009043; PMCID: PMC7552083.

9. Kristófi R, Eriksson JW. Metformin as an anti-inflammatory agent: a short review. *J Endocrinol*. 2021 Sep 28;251(2):R11-R22. doi: 10.1530/JOE-21-0194. PMID: 34463292.
10. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017 Sep;60(9):1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28776086; PMCID: PMC5552828.
11. Villanueva-Paz M, Cotán D, Garrido-Maraver J, Oropesa-Ávila M, de la Mata M, Delgado-Pavón A, de Lavera I, Alcocer-Gómez E, Álvarez-Córdoba M, Sánchez-Alcázar JA. AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. *Exp Suppl*. 2016;107:45-71. doi: 10.1007/978-3-319-43589-3_3. Erratum in: *EXS*. 2016;107:E1. PMID: 27812976.
12. Thakur S, Daley B, Klubo-Gwiedzinska J. The role of an anti-diabetic drug metformin in the treatment of endocrine tumors. *J Mol Endocrinol*. 2019 Aug;63(2):R17-R35. doi: 10.1530/JME-19-0083. PMID: 31307011; PMCID: PMC6938582.
13. Podhorecka M, Ibanez B, Dmoszyńska A. Metformin - its potential anti-cancer and anti-aging effects. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017 Mar 2;71(0):170-175. doi: 10.5604/01.3001.0010.3801. PMID: 28258677.
14. Kang W, Wang T, Hu Z, Liu F, Sun Y, Ge S. Metformin Inhibits *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide-Influenced Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts via Regulating Activating Transcription Factor-3 Expression. *J Periodontol*. 2017 Oct;88(10):e169-e178. doi: 10.1902/jop.2017.170168. Epub 2017 May 26. PMID: 28548885.
15. Tan Y, Chen J, Jiang Y, Chen X, Li J, Chen B, Gao J. The anti-periodontitis action of metformin via targeting NLRP3 inflammasome. *Arch Oral Biol*. 2020 Jun;114:104692. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104692. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32305805.
16. Abdallah MS, Alarfaj SJ, Saif DS, El-Naggar ME, Elsokary MA, Elsayah HK, Abdelsattar Zaki S, Wahsh EA, Abo Mansour HE, Mosalam EM. The AMPK modulator metformin as adjunct to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: A proof-of-concept, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int Immunopharmacol*. 2021 Jun;95:107575. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107575. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33773207.

17. Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 15;17(6):1405-14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1614. Epub 2010 Dec 13. PMID: 21149614; PMCID: PMC3060285.
18. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa FB, Mota MR, Ribeiro Rde A, Alves AP. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol*. 2015 Sep;60(9):1237-45. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.015. Epub 2015
19. Gross C, Weber M, Creutzburg K, Möbius P, Preidl R, Amann K, Wehrhan F. Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. *J Transl Med*. 2017 Jun 6;15(1):128. doi: 10.1186/s12967-017-1230-8. PMID: 28587628; PMCID: PMC5461625.
20. Dornelas-Filho AF, Pereira VBM, Wong DVT, Nobre LMS, Melo AT, Silva CMS, Wanderley CWS, Nour ML, Araújo LCNC, Silva RO, Pinto FMM, Bingana RD, Souza MHLP, Alencar NMN, Silva PGB, Alves APNN, Almeida PRC, Cunha FQ, Lima-Júnior RCP. Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. *Int Immunopharmacol*. 2018 Sep;62:96-108. doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.031. Epub 2018 Jul 6. PMID: 29990699
21. Sun H, Cai W, Wang X, Liu Y, Hou B, Zhu X, Qiu L. Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation via inactivation of NF κ B and ERK pathways in Raw 264.7 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2017 Feb 20;17(1):120. doi: 10.1186/s12906-017-1635-1. PMID: 28219355; PMCID: PMC5319035.
22. Han JH, Jung J, Hwang L, Ko IG, Nam OH, Kim MS, Lee JW, Choi BJ, Lee DW. Anti-inflammatory effect of polydeoxyribonucleotide on zoledronic acid-pretreated and lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Exp Ther Med*. 2018 Jul;16(1):400-405. doi: 10.3892/etm.2018.6186. Epub 2018 May 18. PMID: 29896266; PMCID: PMC5995037.
23. Kalkar P, Cohen G, Tamari T, Schif-Zuck S, Zigdon-Giladi H, Ariel A. IFN- β mediates the anti-osteoclastic effect of bisphosphonates and dexamethasone. *Front Pharmacol*. 2022 Oct 14;13:1002550. doi: 10.3389/fphar.2022.1002550. PMID: 36386129; PMCID: PMC9648992.

24. Coleman R, Burkinshaw R, Winter M, Neville-Webbe H, Lester J, Woodward E, Brown J. Zoledronic acid. *Expert Opin Drug Saf.* 2011 Jan;10(1):133-45. doi: 10.1517/14740338.2011.540387. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21114419.
25. Jensen PR, Andersen TL, Chavassieux P, Roux JP, Delaisse JM. Bisphosphonates impair the onset of bone formation at remodeling sites. *Bone.* 2021 Apr;145:115850. doi: 10.1016/j.bone.2021.115850. Epub 2021 Jan 17. PMID: 33465485.
26. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Sep;302(3):1055-61. doi: 10.1124/jpet.102.035295. PMID: 12183663
27. Yamada J, Tsuno NH, Kitayama J, Tsuchiya T, Yoneyama S, Asakage M, Okaji Y, Shuno Y, Nishikawa T, Tanaka J, Takahashi K, Nagawa H. Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. *J Surg Res.* 2009 Jan;151(1):115-20. doi: 10.1016/j.jss.2008.01.031. Epub 2008 Feb 29. PMID: 18619615.
28. Di Salvatore M, Orlandi A, Bagalà C, Quirino M, Cassano A, Astone A, Barone C. Anti-tumour and anti-angiogenic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. *Cell Prolif.* 2011 Apr;44(2):139-46. doi: 10.1111/j.1365-2184.2011.00745.x. PMID: 21401755; PMCID: PMC6496192.
29. Soma T, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Ito E, Matsumoto T, Kimura A, Miyamoto K, Matsumoto M, Nakamura M, Morita M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. Osteonecrosis development by tooth extraction in zoledronate treated mice is inhibited by active vitamin D analogues, anti-inflammatory agents or antibiotics. *Sci Rep.* 2022 Jan 7;12(1):19. doi: 10.1038/s41598-021-03966-6. PMID: 34997043; PMCID: PMC8742126.
30. Shurrab NT; Arafa ESA. Metformin: A review of its therapeutic efficacy and adverse effects. *Obesity Medicine.* 2020 mar, 17:100186. doi: 10.1016/j.obmed.2020.100186.
31. Jiating L, Buyun J, Yinchang Z. Role of Metformin on Osteoblast Differentiation in Type 2 Diabetes. *Biomed Res Int.* 2019 Nov 26;2019:9203934. doi: 10.1155/2019/9203934. PMID: 31886264; PMCID: PMC6899291.
32. Bakhshab S, Ahmed F, Schulten HJ, Ahmed FW, Glanville M, Al-Qahtani MH, Weaver JU. Proangiogenic Effect of Metformin in Endothelial Cells Is via

- Upregulation of VEGFR1/2 and Their Signaling under Hyperglycemia-Hypoxia. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 19;19(1):293. doi: 10.3390/ijms19010293. PMID: 29351188; PMCID: PMC5796238.
33. Kuroshima S, Go VA, Yamashita J. Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology.* 2012 Jan;153(1):17-28. doi: 10.1210/en.2011-1439. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22109892; PMCID: PMC3249684.
 34. Wehrhan F, Gross C, Creutzburg K, Amann K, Ries J, Kesting M, Geppert CI, Weber M. Osteoclastic expression of higher-level regulators NFATc1 and BCL6 in medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. *J Transl Med.* 2019 Mar 4;17(1):69. doi: 10.1186/s12967-019-1819-1. PMID: 30832685; PMCID: PMC6398259.
 35. Bian F, Zhang Y, Xie Y, Fang H, Fan M, Wang X, Li H, Huang T, Zhang S, Cai L. Effects of different concentrations of metformin on osteoclast differentiation and apoptosis and its mechanism. *Pharmazie.* 2021 Jun 1;76(6):244-248. doi: 10.1691/ph.2021.1378. PMID: 34078517
 36. Park SH, Kang MA, Moon YJ, Jang KY, Kim JR. Metformin coordinates osteoblast/osteoclast differentiation associated with ischemic osteonecrosis. *Aging (Albany NY).* 2020 Feb 11;12(6):4727-4741. doi: 10.18632/aging.102796. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32045366; PMCID: PMC7138543
 37. Nagaoka Y, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition. *J Dent Res.* 2015 Apr;94(4):594-601. doi: 10.1177/0022034514564187. Epub 2014 Dec 22. PMID: 25535203.
 38. Nakagawa T, Tsuka S, Aonuma F, Nodai T, Munemasa T, Tamura A, Mukaibo T, Kondo Y, Masaki C, Hosokawa R. Effects of metformin on the prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in rats. *J Prosthodont Res.* 2021 Jun 30;65(2):219-224. doi: 10.2186/jpr.JPOR_2019_629. Epub 2020 Sep 15. PMID: 32938854.
 39. Saracino S, Canuto RA, Maggiora M, Oraldi M, Scoletta M, Ciuffreda L, Vandone AM, Carossa S, Mozzati M, Muzio G. Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model. *J Oral Pathol Med.* 2012 Nov;41(10):788-92. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01173.x. Epub 2012 May 31. PMID: 22650360.

40. Soysa NS, Alles N. Positive and negative regulators of osteoclast apoptosis. *Bone Rep.* 2019 Oct 21;11:100225. doi: 10.1016/j.bonr.2019.100225. PMID: 31720316; PMCID: PMC6838739.
41. de Molon RS, Rossa C Jr, Thurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 13;20(18):4541. doi: 10.3390/ijms20184541. PMID: 31540277; PMCID: PMC6769683.
42. Ait Oumghar I, Barkaoui A, Chabrand P. Toward a Mathematical Modeling of Diseases' Impact on Bone Remodeling: Technical Review. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Nov 2;8:584198. doi: 10.3389/fbioe.2020.584198. PMID: 33224935; PMCID: PMC7667152
43. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, Noguchi T, Shen WR, Qi J, Nara Y, Pramusita A, Kinjo R, Mizoguchi I. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 21;21(14):5169. doi: 10.3390/ijms21145169. PMID: 32708317; PMCID: PMC7404053.
44. Favot CL, Forster C, Glogauer M. The effect of bisphosphonate therapy on neutrophil function: a potential biomarker. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 May;42(5):619-26. doi: 10.1016/j.ijom.2012.12.011. Epub 2013 Feb 8. PMID: 23578802.
45. Hyvönen PM, Kowolik MJ. Influence of dichloromethylene bisphosphonate on the in vitro phagocytosis of hydroxyapatite particles by rat peritoneal exudate cells: an electron microscopic and chemiluminescence study. *Ann Rheum Dis.* 1992 Feb;51(2):203-9. doi: 10.1136/ard.51.2.203. PMID: 1532298; PMCID: PMC1005659.
46. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, Garrett-Sinha L, Raghavan S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 May;66(5):839-47. doi: 10.1016/j.joms.2008.01.026. PMID: 18423269; PMCID: PMC2426967.
47. Ozel AB, Dagsuyu E, Aydın PK, Bagan I, Bulan OK, Yanardag R, Yarat A. Brain Boron Level, DNA Content, and Myeloperoxidase Activity of Metformin-Treated Rats in Diabetes and Prostate Cancer Model. *Biol Trace Elem Res.* 2022 Mar;200(3):1164-1170. doi: 10.1007/s12011-021-02708-z. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33860456.

48. Satoh T, Otsuka A, Contassot E, French LE. The inflammasome and IL-1 β : implications for the treatment of inflammatory diseases. *Immunotherapy*. 2015;7(3):243-54. doi: 10.2217/imt.14.106. PMID: 25804477.
49. Zhu W, Xu R, Du J, Fu Y, Li S, Zhang P, Liu L, Jiang H. Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *FASEB J*. 2019 Apr;33(4):5208-5219. doi: 10.1096/fj.201801791RR. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30624969.
50. Zhang Q, Yu W, Lee S, Xu Q, Naji A, Le AD. Bisphosphonate Induces Osteonecrosis of the Jaw in Diabetic Mice via NLRP3/Caspase-1-Dependent IL-1 β Mechanism. *J Bone Miner Res*. 2015 Dec;30(12):2300-12. doi: 10.1002/jbmr.2577. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26081624; PMCID: PMC4941639.
51. Incio J, Suboj P, Chin SM, Vardam-Kaur T, Liu H, Hato T, Babykutty S, Chen I, Deshpande V, Jain RK, Fukumura D. Metformin Reduces Desmoplasia in Pancreatic Cancer by Reprogramming Stellate Cells and Tumor-Associated Macrophages. *PLoS One*. 2015 Dec 7;10(12):e0141392. doi: 10.1371/journal.pone.0141392. PMID: 26641266; PMCID: PMC4671732.
52. Ding L, Liang G, Yao Z, Zhang J, Liu R, Chen H, Zhou Y, Wu H, Yang B, He Q. Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget*. 2015 Nov 3;6(34):36441-55. doi: 10.18632/oncotarget.5541. PMID: 26497364; PMCID: PMC4742188.
53. Yang F, Qin Y, Wang Y, Meng S, Xian H, Che H, Lv J, Li Y, Yu Y, Bai Y, Wang L. Metformin Inhibits the NLRP3 Inflammasome via AMPK/mTOR-dependent Effects in Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Biol Sci*. 2019 Mar 10;15(5):1010-1019. doi: 10.7150/ijbs.29680. PMID: 31182921; PMCID: PMC6535781.
54. Haloul M, Oliveira ERA, Kader M, Wells JZ, Tominello TR, El Andaloussi A, Yates CC, Ismail N. mTORC1-mediated polarization of M1 macrophages and their accumulation in the liver correlate with immunopathology in fatal ehrlichiosis. *Sci Rep*. 2019 Oct 1;9(1):14050. doi: 10.1038/s41598-019-50320-y. PMID: 31575880; PMCID: PMC6773708.