

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM
NANOEMULSÃO DE PRÓPOLIS VERDE NO SÍTIO DE
EXTRAÇÃO DENTAL DE RATAS COM OS PRINCIPAIS
FATORES DE RISCO PARA OSTEONECROSE DOS
MAXILARES ASSOCIADA À TERAPIA MEDICAMENTOSA

JÉSSICA DE OLIVEIRA ALVARENGA FREIRE
EDILSON ERVOLINO
JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM
NANOEMULSÃO DE PRÓPOLIS VERDE NO SÍTIO DE
EXTRAÇÃO DENTAL DE RATAS COM OS PRINCIPAIS
FATORES DE RISCO PARA OSTEONECROSE DOS
MAXILARES ASSOCIADA À TERAPIA MEDICAMENTOSA

JÉSSICA DE OLIVEIRA ALVARENGA FREIRE

ORIENTADOR: PROF. ASSOC. EDILSON ERVOLINO

CO-ORIENTADOR: PROF. TIT. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Assoc. Edilson Ervolino

Co-orientador: Prof. Tit. José Maurício Sforcin

BOTUCATU - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Freire, Jéssica de Oliveira Alvarenga.

Efeito do tratamento local com nanoemulsão de própolis verde no sítio de extração dental de ratas com os principais fatores de risco para osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa / Jéssica de Oliveira Alvarenga Freire. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Edilson Ervolino

Coorientador: José Maurício Sforcin

Capes: 20600003

1. Osteonecrose. 2. Exodontia. 3. Nanoestruturas. 4. Ácido zoledrônico. 5. Própole.

Palavras-chave: Ácido zoledrônico; Exodontia; Nanoestruturas; Osteonecrose associada a bisfosfonatos; Própolis.

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, em especial ao **Instituto de Biociências de Botucatu** e à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, pela oportunidade de cursar a graduação e a pós-graduação em instituições de extremo prestígio e reconhecimento.

Ao **Programa de Biologia Geral e Aplicada**, pela oportunidade de cursar o Mestrado e por todo o aprendizado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos **animais**, por quem temos o maior respeito, por possibilitarem a realização dessa e de outras pesquisas, sempre com o objetivo de melhorar a vida das pessoas.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, por permitir a condução desse trabalho.

Ao meu querido orientador **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, que nos é exemplo de integridade e competência e por quem tenho admiração e gratidão eternas, por ter me conduzido até aqui.

Ao meu co-orientador **Prof. Assoc. José Maurício Sforcin**, por toda ajuda e por confiar em nosso trabalho.

À **Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari**, pela parceria e ajuda na condução do trabalho.

À **Profa. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto**, pela amizade, ajuda e convivência ao longo dos últimos anos.

À **Profa. Cristiane Duque**, pelo aceite de participação da banca e por ser uma inspiração desde a época da minha graduação.

Aos membros do Laboratório de Osteobiologia Aplicada à Odontologia e meus amigos, **Luan Felipe Toro, Vinícius Franzão Ganzaroli, Eduardo Quintão Manhanini Souza, Isabella Zacarin Guiati, Jéssica Silva Santana, Luy de Abreu Costa e Glauco Silveira** por toda ajuda na execução desse trabalho e pela amizade.

À **disciplina de Histologia e Embriologia** do curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, por todo o aprendizado e pela oportunidade de vivenciar a docência.

À minha família **Kely Regina de Oliveira, Jorge Carlos B. Garcia e Jean de O. A. Freire**, por serem minha base e contribuírem com meu crescimento pessoal, me permitindo chegar até aqui.

Ao **Guilherme Maciel Soares**, pela dedicação e companheirismo sem medidas.

A **Deus**, por me guiar e me proteger ao longo dessa trajetória e me levar a realizações muito maiores que as desejadas por mim.

A ciência é muito mais que um corpo de conhecimentos. É uma maneira de pensar.

Carl Sagan

Índice

Lista de abreviações	6
Lista de figuras	9
Lista de gráficos	9
Resumo.....	10
Abstract	12
1 Introdução	14
2 Objetivo.....	20
3 Metodologia	21
3.1 Delineamento experimental	21
3.1.1 Grupos experimentais	21
3.1.2 Anestesia geral.....	22
3.1.3 Periodontite experimental	22
3.1.4 Protocolo medicamentoso com zoledronato	23
3.1.5 Exodontia e tratamentos locais pós-operatórios	23
3.1.6 Nanoemulsão de própolis verde.....	23
3.1.7 Eutanásia e obtenção das amostras	25
3.1.8 Processamento histológico e microtomia das amostras	25
3.1.9 Coloração	26
3.1.10 Reação imunoistoquímica (técnica da imunoperoxidase indireta).....	26
3.2 Análise dos dados	28
3.2.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico extra e intrabucal.....	28
3.2.2 Análises microscópicas.....	28
3.2.3 Análise estatística	30
4 Resultados	31
4.1 Análise da condição geral de saúde dos animais e exame extra e intrabucal.....	31
4.2 Análise histopatológica.....	31
4.3 Porcentagem de tecido ósseo neoformado no sítio de extração dental	35
4.4 Porcentagem de tecido ósseo não vital nas adjacências do sítio de extração dental	36
4.5 Análise imunoistoquímica.....	37
4.5.1 TGF- β 1	37
4.5.2 VEGF.....	39
4.5.3 OCN.....	41
4.5.4 BMP-2/4	43
4.5.5 NF κ B.....	45
4.5.6 TRAP	47

5 Discussão.....	49
6 Conclusão.....	57
Referências bibliográficas	58
Anexo 1	64

Lista de abreviações

µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
ALP	<i>alkhaline phosphatase</i>
aPDT	<i>antimicrobial photodynamic therapy</i>
ATP	adenosina trifosfato
BFs	bisfosfonatos
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Col I	colágeno I
COX-2	ciclooxigenase-2
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
FCA	Faculdade de Ciências Agrônômicas
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
FPP	farnesil pirofosfato
FPPS	farnesil pirofosfato sintase
GGPP	geranil geranil pirofosfato
GL	grau Lussac
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GSH	glutathiona reduzida
GSSH	glutathiona oxidada
HE	hematoxilina-eosina
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IL	interleucina
INF-γ	interferon gama
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IV	intravenoso
IκB	<i>inhibitor kappa B</i>
kg	quilograma
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
N-BFs	bisfosfonatos nitrogenados
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
OCN	osteocalcina
ONM	osteonecrose dos maxilares
ONM-M	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa
OPG	osteoprotegerina
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PRP	plasma rico em plaquetas
PSR	picro sirius red
PTONF	porcentagem de tecido ósseo neoformado
PTONV	porcentagem de tecido ósseo não vital
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
Runx-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis fator alpha</i>

TRAP*tartrate-resistant acid phosphatase*
VCAM-1*vascular cellular adhesion molecule-1*
VEGF*vascular endothelial growth factor*

Lista de figuras

FIGURA 1: Esquema apresentando o delineamento experimental do estudo.....	22
FIGURA 2: Imagens dos tempos operatórios de ligadura e exodontia	24
FIGURA 3: Imagens dos tempos operatórios de aplicação da nanoemulsão de própolis verde de baixa viscosidade.....	24
FIGURA 4: Esquema representativo das regiões de interesse das análises histopatológica (a), histométrica da PTONF (b) e histométrica da PTONV (c)	29
FIGURA 5: Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios.....	33
FIGURA 6: Aspecto histológico das adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios.....	34
FIGURA 7: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TGF- β 1 na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).....	38
FIGURA 8: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).....	40
FIGURA 9: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).....	42
FIGURA 10: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP-2/4 na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).....	44
FIGURA 11: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para NF κ B na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).....	46
FIGURA 12: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).....	48

Lista de gráficos

GRÁFICO 1: Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia.....	35
GRÁFICO 2: Porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia.....	36
GRÁFICO 3: Padrão de imunomarcacão para TGF- β 1 no sítio de extração dental	37
GRÁFICO 4: Padrão de imunomarcacão para VEGF no sítio de extração dental	39
GRÁFICO 5: Padrão de imunomarcacão para OCN no sítio de extração dental	41
GRÁFICO 6: Padrão de imunomarcacão para BMP-2/4 no sítio de extração dental.....	43
GRÁFICO 7: Padrão de imunomarcacão para NF κ B no sítio de extração dental	45
GRÁFICO 8: Padrão de imunomarcacão para TRAP no sítio de extração dental	47

Resumo

Os bisfosfonatos são medicamentos antirreabsortivos empregados para tratamento de doenças/lesões osteolíticas, cujo uso tem como efeito adverso a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). O estabelecimento de terapias preventivas efetivas e seguras para a ONM-M é importante, pois seu tratamento pode ser pouco resolutivo. A própolis é um material resinoso produzido por abelhas que apresenta ações antimicrobiana, bioestimulatória, imunomodulatória, anti-inflamatória e antioxidante. Seu uso sob forma de nanoemulsão, com objetivo de melhora de solubilidade, absorção e efeitos, pode se constituir em uma promissora estratégia terapêutica preventiva para a ONM-M. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da administração local de nanoemulsão de própolis verde no sítio de extração dental de ratas com os principais fatores de risco da ONM-M. Sessenta ratas foram divididas em seis grupos experimentais: VEI, VEI-PRO1, VEI-PRO2, ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2. Grupos VEI foram tratados com veículo (solução de cloreto de sódio 0,9%) e grupos ZOL com zoledronato (100µg/kg) durante todo período experimental (7 semanas). Em todos os animais, o primeiro molar inferior esquerdo foi submetido à periodontite induzida por ligadura e extraído. Os grupos VEI e ZOL não receberam nenhum tratamento local após a exodontia. Nos grupos VEI-PRO1 e ZOL-PRO1 foi realizada administração local de nanoemulsão de própolis verde de baixa viscosidade e nos grupos VEI-PRO2 e ZOL-PRO2, nanoemulsão de própolis verde de alta viscosidade. Foram realizadas 10 sessões de tratamento local, começando imediatamente após a exodontia e a cada 48 horas. No 28º dia pós-operatório, as ratas foram submetidas à eutanásia. As hemimandíbulas esquerdas seguiram para as análises: clínica intra e extrabucal; histopatológica do sítio de extração dental e da mucosa sobrejacente; histométrica de porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTONF) e de porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) no sítio de extração dental e adjacências; e imunoistoquímica para TGF-β1, VEGF, BMP-2/4, OCN, TRAP e NF-κB. Os dados foram submetidos análise estatística com nível de significância de 5%. ZOL apresentou reparo severamente comprometido, reduzida PTONF e alta PTONV. VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2 apresentaram padrões de reparo, PTONF, PTONV e padrões de imunomarcção semelhantes. ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 tiveram reparo mais favorável, maior PTONF e menor PTONV comparados com ZOL. Os padrões de imunomarcção para ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 foram mais parecidos com VEI que com ZOL. Assim, a nanoemulsão de própolis verde foi capaz de melhorar o curso do reparo alveolar e prevenir o desenvolvimento de lesões osteonecróticas em ratas com os principais fatores de risco para a ONM-M.

Palavras-chave: Osteonecrose associada a bisfosfonatos, Ácido Zoledrônico, Exodontia, Própolis, Nanoestruturas.

Abstract

Bisphosphonates are anti-resorptive drugs used to treat osteolytic diseases/lesions, whose use has the adverse effect of drug medication-associated osteonecrosis of the jaw (MRONJ). The establishment of effective and safe preventive therapies for MRONJ is important, as its treatment may not be effective. Propolis is a resinous material produced by bees that has antimicrobial, biostimulatory, immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant actions. Its use in the form of a nanoemulsion, with the objective of improving solubility, absorption and effects, may constitute a promising preventive therapeutic strategy for MRONJ. The aim of the present study was to evaluate the effect of local administration of green propolis nanoemulsion at the dental extraction site of rats with the main risk factors for MRONJ. Sixty female rats were divided into six experimental groups: VEI, VEI-PRO1, VEI-PRO2, ZOL, ZOL-PRO1 and ZOL-PRO2. VEI groups were treated with vehicle (0.9% sodium chloride solution) and ZOL groups with zoledronate (100µg/kg) throughout the experimental period (7 weeks). In all animals, the lower left first molar was subjected to ligature-induced periodontitis and extracted. The VEI and ZOL groups received no local treatment after tooth extraction. In the VEI-PRO1 and ZOL-PRO1 groups, local administration of low-viscosity green propolis nanoemulsion was performed and in the VEI-PRO2 and ZOL-PRO2 groups, high-viscosity green propolis nanoemulsion was administered. Ten local treatment sessions were performed, starting immediately after tooth extraction and every 48 hours. On the 28th postoperative day, the rats were euthanized. The left hemimandibles were processed to allow them to be performed: intra and extraoral clinical analysis; histopathological analysis of the tooth extraction site and overlying mucosa; histometric analysis of the percentage of newly formed bone tissue (PNFBT) and the percentage of non-vital bone tissue (PNVBT) in the tooth extraction site and surrounding areas; and immunohistochemistry for TGF-β1, VEGF, BMP-2/4, OCN, TRAP e NF-κB. Data were submitted to statistical analysis with a significance level of 5%. ZOL showed severely compromised repair, reduced PNFBT and high PNVBT. VEI, VEI-PRO1 and VEI-PRO2 showed similar repair patterns, PNFBT, PNVBT and immunostaining patterns. ZOL-PRO1 and ZOL-PRO2 had more favorable repair, higher PNFBT and lower PNVBT compared to ZOL. The immunostaining patterns for ZOL-PRO1 and ZOL-PRO2 were more similar to VEI than to ZOL. Thus, the green propolis nanoemulsion was able to improve the course of alveolar repair and prevent the development of osteonecrotic lesions in rats with the main risk factors for MRONJ.

Key-words: Bisphosphonate Associated Osteonecrosis, Zoledronic Acid, Tooth Extraction, Propolis, Nanostructures.

1 Introdução

Os bisfosfonatos (BFs) são uma classe de drogas efeito inibitório sobre a reabsorção óssea. A estrutura química dos BFs apresenta um esqueleto com um átomo central de carbono ligado a dois grupos fosfato, o qual, além da afinidade por cristais de hidroxiapatita, permite a ligação de dois outros grupos. Um desses grupos (R1) está relacionado com a afinidade pelos cristais de hidroxiapatita, colaborando na seletividade e captação da molécula pelo tecido ósseo, e o outro (R2) está relacionado com a potência antirreabsortiva (DRAKE et al., 2008; ROGERS et al., 2011; RUSSEL et al., 1999). A presença de nitrogênio no grupo R2 determina dois tipos de BFs: não-nitrogenados e nitrogenados (N-BFs). Essa sutil diferença estrutural é responsável por diferenças na potência e no mecanismo de ação (CHADHA et al., 2013; RUSSEL et al., 1999). Durante o processo reabsortivo, os BFs ligados à matriz óssea são liberados na lacuna de Howship após a desmineralização e acabam sendo extensamente endocitados pelos osteoclastos. Após ganharem o ambiente intracelular, os BFs não-nitrogenados e os N-BFs inibem a atividade osteoclástica por diferentes mecanismos. Os BFs não-nitrogenados são enzimaticamente ligados a moléculas de adenosina trifosfato (ATP) recém-sintetizadas, formando análogos não hidrolisáveis de ATP. O acúmulo dessas moléculas não funcionais interfere no metabolismo energético e causa citotoxicidade, resultando em apoptose dos osteoclastos (EBETINO et al., 2011; ROGERS et al., 2011; RUSSEL et al., 1999; RUSSEL, 2011).

Os N-BFs, por sua vez, conseguem bloquear a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS), integrante da via do mevalonato, responsável pela biossíntese de colesterol e lipídios isoprenóides, como o farnesil pirofosfato (FPP) e o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). O FPP e o GGPP são importantes para a prenilação de algumas GTPases, como Ras, Rho, Rac e Rab, responsáveis pela regulação de diversos processos celulares, como arranjo do citoesqueleto e da morfologia celular, arranjo da membrana plasmática, tráfego vesicular e apoptose (DRAKE et al., 2008; DUNFORD et al., 2011; HALL, 1998; KAVANAGH et al., 2006; RUSSEL et al., 1999; LUCKMAN et al., 1998). Os osteoclastos se tornam inativos e eventualmente entram em apoptose. Apesar dos osteoclastos maduros serem a principal célula afetada devido à proximidade a grandes concentrações de BFs liberados na reabsorção, essas drogas também exercem efeitos inibitórios sobre recrutamento e diferenciação de precursores de osteoclastos (RUSSEL et al., 1999).

A possibilidade de variação nos grupos R1 e, principalmente, R2 permitiu a síntese de vários BFs, com diferentes potências antirreabsortivas. Os N-BFs, tipo mais empregado

atualmente, são notadamente mais potentes e, dentre eles, o zoledronato é o de maior potência, cerca de 10.000 vezes mais potente que o primeiro BF empregado clinicamente, o etidronato (RUSSEL et al., 1999).

Por sua capacidade antirreabsortiva, são empregados clinicamente para tratamento de distúrbios metabólicos ósseos com aumentada reabsorção, como osteoporose, doença de Paget e osteogênese imperfeita, com finalidade de diminuir perda óssea e evitar complicações, e na terapia oncológica de mieloma múltiplo e de alguns tumores osteotrópicos, com finalidade de reduzir dor e destruição óssea e hipercalcemia e prevenir metástase óssea (DRAKE et al., 2008; MARX et al., 2005; RUSSEL, 2011). Os planos de tratamento com BFs (tipo de BF, dose, frequência e duração do tratamento) variam em função da patologia para a qual serão empregados. De maneira geral, diferenciam-se os pacientes que utilizam BF para controle de distúrbios que geram osteopenia e osteoporose, daqueles que o utilizam para complementação da terapia oncológica, em razão dessa última requerer doses mais altas e maior frequência de administração (ALLEN et al., 2009; GOMEZ FONT et al., 2008).

Em 2003, um relato inédito trouxe à tona uma condição até então desconhecida cuja principal característica era a presença de necrose óssea nos maxilares (MARX, 2003). Todos os pacientes tinham em comum o tratamento com BFs. A partir de então, tal condição passou a ser cada vez mais relatada e chamada de osteonecrose dos maxilares (ONM), sendo considerada um importante efeito adverso dos BFs (FICARRA et al., 2005; HELLSTEIN, MAREK, 2005; MIGLIORATI, 2005; RUGGIERO et al., 2004; SANNA et al., 2005; VANNUCCHI et al., 2005). A Associação Americana de Cirurgia Bucomaxilofacial a definiu como “presença de osso exposto em região maxilofacial por mais de 8 semanas em pacientes submetidos a tratamento prévio e/ou atual com droga antirreabsortiva e sem histórico de radioterapia de cabeça e pescoço” (RUGGIERO et al., 2022). A presença de necrose óssea pode estar acompanhada de dor, inchaço, mau cheiro, secreção purulenta, e fístula (RUGGIERO et al., 2006; RUGGIERO, 2007). O diagnóstico é essencialmente clínico e exames imaginológicos podem auxiliar, embora os achados não sejam específicos. Em 2009, estágios de evolução da doença foram estabelecidos, a fim de auxiliar no diagnóstico e manejo. Dessa forma, foi estabelecido que no estágio I há osso necrótico exposto e ausência de dor ou sinais de infecção (assintomático); no estágio II há osso necrótico exposto acompanhado de dor e/ou sinais de infecção; no estágio III há osso necrótico exposto com dor e/ou sinais de infecção e algumas das seguintes complicações: fístula oro-cutânea, fratura patológica, envolvimento do seio maxilar ou acometimento da borda inferior ou ramo da mandíbula. Ainda, existe um estágio 0,

no qual não há achados clínicos, mas já existem alterações imaginológicas (RUGGIERO et al., 2022).

A ONM acomete mais mulheres com idade avançada e está mais associada com o uso de BF's potentes em altas doses administrados por via IV, como no caso daqueles que complementam a terapia oncológica (MARTINS et al., 2021; RUGGIERO et al., 2006). A incidência varia de 0,001 a 0,01% em pacientes recebendo dosagem para tratamento da osteoporose, porém atinge 1 a 15% dos pacientes recebendo dosagem para terapia oncológica (ALLEN, 2009; KHAN et al., 2015). Alguns fatores de risco têm sido apontados, como uso de corticosteróides ou quimioterápicos e presença de diabetes mellitus (KHAN et al., 2015; RUGGIERO et al., 2006).

Existe forte associação entre o desenvolvimento de ONM e a realização de exodontia, sendo essa considerada um importante fator desencadeante da doença (FICARRA et al., 2005; KHAN et al., 2015; MARTINS et al., 2021; MARX et al., 2005; RUGGIERO et al., 2004; RUGGIERO et al., 2006). Outros fatores desencadeantes apontados são presença de doença dentária de origem infecciosa/inflamatória, como a periodontite, e trauma causado por próteses dentárias mal adaptadas (HELLSTEIN, MAREK, 2005; KHAN et al., 2015; MARX et al., 2005; MIGLIORATI, BRENNAN, PETERSON, 2019; RUGGIERO, 2006). Ainda, a ONM pode ter desenvolvimento espontâneo, porém mais raramente (HELLSTEIN, MAREK, 2005). Desde os relatos iniciais, a necessidade de reparo ósseo, seja por presença de inflamação crônica, trauma ou realização de algum procedimento mais invasivo, somada à dificuldade do tecido ósseo em realizá-lo de forma adequada foram propostos como pontos-chave na patofisiologia da doença (AGHALOO, HAZBOUN, TETRADIS, 2015; ALLEN, BURR, 2009; CHANG, HAKAM, McCAULEY, 2018; HELLSTEIN, MAREK, 2005; MARX et al., 2005; RUGGIERO et al., 2004; RUGGIERO et al., 2006). A inibição da reabsorção pelos BF's reduz a taxa de remodelação óssea, composta por dois processos – reabsorção de áreas danificadas e neoformação óssea – interligados e dependentes entre si, comprometendo a renovação e reparo do tecido ósseo e resultando em acúmulo de áreas de tecido não vital.

No entanto, a patofisiologia da ONM é bastante complexa e não pode ser completamente explicada por esse mecanismo. E, mesmo que ainda não seja totalmente compreendida, outros fatores etiopatogênicos foram propostos. Os BF's têm efeitos antiangiogênicos, causando redução na densidade de microvasos e na expressão de fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth fator, VEGF), podendo interferir no reparo e defesa e causar necrose avascular; têm efeitos citotóxicos sobre células dos tecidos moles sobrejacente,

atrasando reparo e prolongando tempo de exposição óssea; e facilitam a adesão de microrganismos ao tecido ósseo exposto, embora ainda não se tenha clareza sobre a infecção ser um fator etiopatogênico ou um evento secundário à necrose. Ainda, os BFs desregulam a resposta imune local, prejudicando a defesa e o reparo tecidual (AGHALOO, HAZBOUN, TETRADIS, 2015; ALLEN, 2009; ALLEN, BURR, 2009; CHANG, HAKAM, McCAULEY, 2018; HELLSTEIN, MAREK, 2005; MARX et al., 2005; RUGGIERO et al., 2004; RUGGIERO et al., 2006).

Atualmente, não existem protocolos bem estabelecidos de tratamento da ONM. Antibioticoterapia, bochechos com clorexidina e debridamento cirúrgico minimamente invasivo de lesões refratárias são recomendados (KHAN et al., 2015; YAROM et al., 2019). As lesões, porém, são de difícil e lenta resolução, e muitas vezes sequer respondem ao tratamento (MIGLIORATI, 2005). O debridamento pode levar ao aumento das lesões em vez de sua resolução, e à necessidade de ressecções ósseas de áreas cada vez maiores (GOMEZ FONT et al., 2008). A prevenção é extensamente recomendada. Pacientes devem passar por tratamento odontológico prévio ao início do tratamento com BFs, para remoção de focos infecciosos/inflamatórios, e devem manter bons níveis de higiene bucal durante o tratamento com antirreabsortivos, evitando os fatores desencadeantes da doença (MARX et al., 2005; RUGGIERO et al., 2006; WOOLTORTON, 2005). Caso sejam necessárias intervenções mais invasivas durante o tratamento, é recomendada antibioticoterapia profilática (CABRAS et al., 2021; RUGGIERO et al., 2006; YAROM et al., 2019). No entanto, o real papel da infecção no desenvolvimento da ONM ainda é incerto, o que torna a antibioticoterapia, seja profilática ou terapêutica, uma conduta empírica e, por vezes, falha (ALLEN, 2009; CABRAS et al., 2021; HOEFERT et al., 2011; LOPEZ-JORNET et al., 2011). Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos deve ser desencorajado devido à resistência bacteriana. Nesse sentido, esforços têm sido feitos na busca por alternativas preventivas mais eficazes e com mínimo ou nenhum efeito adverso.

A própolis é um composto natural produzido por abelhas a partir da coleta de resinas da flora local e usada para estruturar e proteger a colmeia de invasores e contaminação. Há muito é utilizada com fins terapêuticos, ainda que esse uso fosse baseado no empirismo (KUCCHARZEWSKI et al., 2013; SFORCIN, 2016). O avanço da pesquisa, porém, já estabeleceu diversas de suas propriedades biológicas, como efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, imunomodulador e antitumor (MEIMANDI-PARIZI et al., 2018; MORAWIEC et al., 2015; SANTOS et al., 2008; SFORCIN, 2016).

A composição química da própolis é complexa, com mais de 300 compostos já identificados em diferentes amostras, e intimamente relacionada à sua origem botânica e, portanto, geográfica (DE MÉLO SILVA et al., 2020; SFORCIN, 2016). Além disso, pode sofrer variações sazonais devido às mudanças da flora frente às diferentes estações do ano. As propriedades biológicas da própolis estão relacionadas à sua composição química, logo amostras de própolis de diferentes localizações geográficas apresentam diferentes propriedades químicas e biológicas (SFORCIN, 2016).

A própolis verde produzida em Botucatu-SP tem a *Baccharis dracunculifolia* D.C. como principal fonte vegetal, seguida do *Eucalyptus citriodora* Hook e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (BACHIEGA et al., 2012). A composição química dessa própolis foi analisada previamente e foram detectados alguns ácidos aromáticos (ácido hidroxicinâmico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 3-prenil-p-cumárico e ácido 3,5-diprenil-p-cumárico), flavonóides (kaempferol, 5,6,7-trihidroxi-3,4-dimetoxiflavona e aromadendrina-4'-metil-éter), óleos essenciais e di e triterpenos (BANKOVA et al., 1998). A dose letal 50 da própolis é de 2 a 7,3 g/kg em camundongos (SFORCIN, 2007). A concentração segura para uso em humanos é 1,4mg/kg/dia e casos de alergia são raros (SFORCIN, 2007).

Diversas aplicações terapêuticas da própolis têm sido propostas e estudadas, inclusive dentro da Odontologia, e os resultados são bastante promissores. Santos et al., (2008) observaram que a própolis foi eficiente no tratamento da estomatite protética associada à candidíase. Morawiec et al. (2015), avaliando a própolis na descontaminação oral pós-operatória, reportaram que ela foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de microrganismos e, além disso, reduzir a resposta inflamatória e acelerar a formação de tecido de granulação e epitelização das feridas cirúrgicas. A ação da própolis na doença periodontal também tem sido avaliada em vários estudos que mostraram efeitos positivos na redução da inflamação e na prevenção da perda óssea alveolar (ARAL et al., 2015; FREIRES et al., 2018; TOKER et al., 2008).

A própolis apresenta baixa absorção e biodisponibilidade e pobre efluxo transcelular no intestino (EKEUKU, CHIN, 2021). Sua preparação em nanoemulsão visa contornar essas problemáticas e obter o máximo de benefícios do seu uso. A Nanotecnologia é uma expoente área interdisciplinar que estuda materiais em escala nanométrica e que vem ganhando espaço dentro da Farmacologia no desenvolvimento de carregamento de fármacos. A síntese de fármacos associados com nanocarreadores pode melhorar algumas de suas propriedades físico-químicas, como absorção, estabilidade química e biodisponibilidade, e potencializar seus

efeitos biológicos (BOULAIZ et al., 2011; ZHANG et al., 2008). As nanoemulsões são um tipo de sistema de carregamento. São compostas de dois líquidos imiscíveis entre si, na qual, com auxílio de um surfactante (tensoativo), um deles está disperso no outro em formato de gotas (CHOI, McCLEMENTS, 2020; GARAVAND et al., 2021; PORTO, ALMEIDA, VICENTINI, 2020). São produzidas a partir de alta agitação responsável pela dispersão de uma fase líquida aquosa a uma fase oleosa constituída por óleo essencial, com adição de um surfactante (PORTO, ALMEIDA, VICENTINI, 2020). As nanoemulsões podem melhorar a absorção, solubilidade e biodisponibilidade do fármaco; facilitar seu transporte pela membrana celular; aumentar a área de superfície, potencializando as interações do fármaco com membranas biológicas; proteger o fármaco dentro o organismo; controlar a liberação; e aumentar a capacidade de carregamento do fármaco (ABOALNAJA et al., 2016; GARAVAND et al., 2021; MANZOOR et al., 2021).

Dessa maneira, considerando que será cada vez mais comum a presença nos consultórios de pacientes sob tratamento com BFs e que necessitam de tratamento odontológico, principalmente devido ao envelhecimento da população e ao fato dos BFs serem uma das poucas opções de tratamento para diversas osteopatias, e que a ONM-M é uma condição de difícil tratamento e de considerável severidade, podendo reduzir em muito a qualidade de vida dos pacientes, é de grande importância a busca por terapias que sejam efetivas na prevenção do desenvolvimento da ONM-M. A própolis parece ser benéfica e ter capacidade de estimulação do reparo tecidual e modulação da inflamação, apresentando potencial para ser empregada como terapia preventiva da ONM-M. Visando a melhoria de suas características e até a potencialização de seus efeitos, será empregada sob forma de nanoestruturada.

2 Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do uso local da própolis verde nanoestruturada em duas viscosidades diferentes no reparo alveolar e na prevenção da ONM em ratas senescentes tratadas com alta dosagem de zoledronato.

3 Metodologia

Foram empregadas 60 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) obtidas do Biotério Central do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBB/Unesp) aos 12 meses de idade. Os animais foram transferidos e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA/Unesp) até a idade de 17 meses, quando o experimento teve início. Para o experimento, apenas ratas acíclicas foram empregadas. O acondicionamento dos animais durante o tempo de envelhecimento e de experimentação foi realizado em gaiolas plásticas (4 animais por caixa) com livre demanda de água e ração industrializada e sob condições ambientes de ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura ambiente média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar em $55\% \pm 5\%$ e sistema de exaustão com 20 trocas de ar por hora. Durante o tempo de envelhecimento, os animais foram manualmente manipulados por operadores durante alguns segundos por semana com o objetivo de habituação à manipulação e aos operadores e redução do estresse durante as etapas experimentais seguintes. Todo o experimento foi planejado e executado de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, elaborado pelo Comitê do Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos da América (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011). O projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FOA/Unesp (Protocolo 2020-00399; Anexo 1).

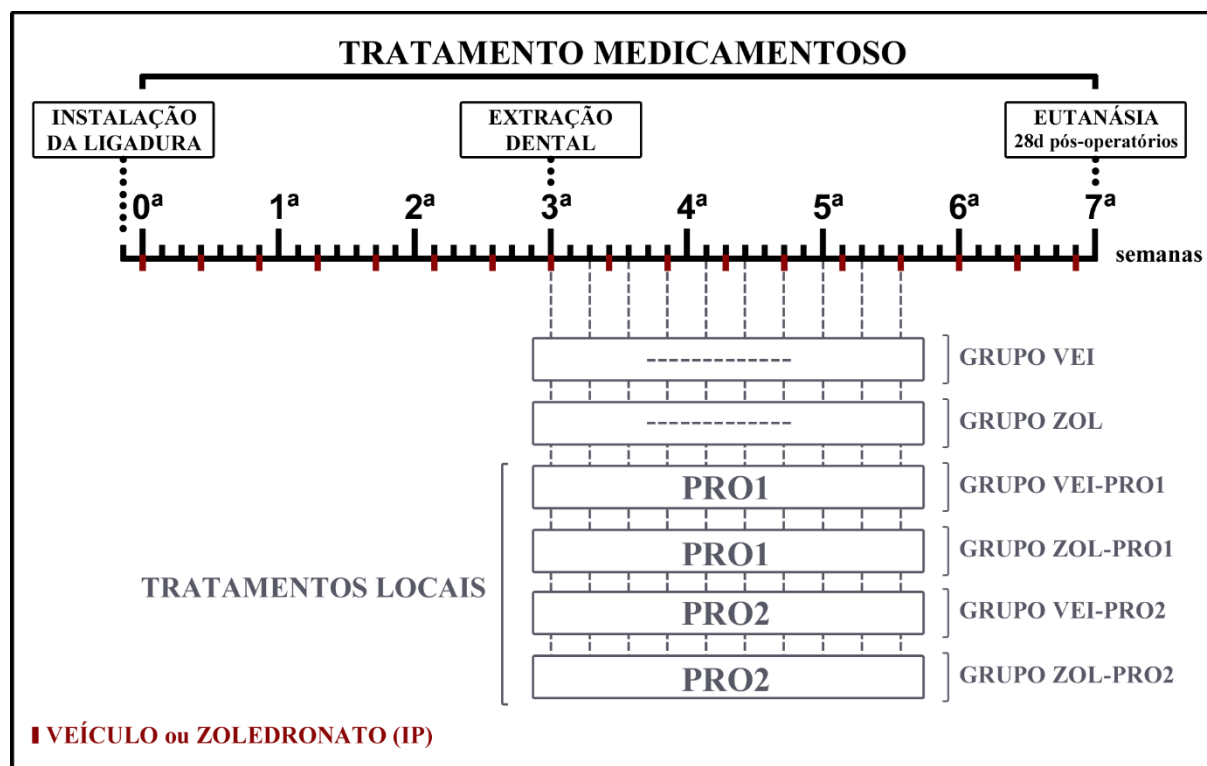
3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Grupos experimentais

Os animais ($n=60$) foram aleatoriamente divididos em 6 grupos experimentais (10 animais cada), divididos de acordo com o uso de veículo ou zoledronato, execução ou não de tratamento local e o tipo de tratamento local realizado após a exodontia. Sendo assim, foram formados os seguintes grupos: ZOL (zoledronato e nenhum tratamento local), ZOL-PRO1 (zoledronato e tratamento local com nanoemulsão de própolis verde mais fluida), ZOL-PRO2 (zoledronato e tratamento local com nanoemulsão de própolis mais viscosa), VEI (veículo e nenhum tratamento local), VEI-PRO1 (veículo e tratamento local com nanoemulsão de própolis verde mais fluida) e VEI-PRO2 (tratamento local com nanoemulsão de própolis mais viscosa). No dia anterior ao início do experimento, uma ligadura foi instalada no primeiro molar inferior esquerdo dos animais. Em seguida foi iniciado o tratamento com veículo ou zoledronato, o qual teve uma duração total de 7 semanas. No 21º dia de experimento, foi realizada a exodontia do

primeiro molar inferior esquerdo e tiveram início as sessões de tratamento local com própolis nos animais de grupos PRO. Ao final das 7 semanas, foi realizada a eutanásia dos animais (FIGURA 1).

FIGURA 1: Esquema apresentando o delineamento experimental do estudo.



3.1.2 Anestesia geral

Para a instalação das ligaduras, exodontia, tratamentos locais pós-operatórios e eutanásia, os animais foram submetidos à anestesia geral com associação de cloridrato de cetamina (80 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil), por via intramuscular.

3.1.3 Periodontite experimental

Para indução da periodontite experimental, foram instaladas ligaduras de fio de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior dos animais, em posição ligeiramente intrassulcular, onde permaneceram até a exodontia (3 semanas). A presença da ligadura acarreta o acúmulo de biofilme bacteriana na junção dento-gengival, levando à instalação de processo inflamatório (FIGURA 2.A).

3.1.4 Protocolo medicamentoso com zoledronato

A administração de zoledronato ou veículo foi realizada através de via intraperitoneal com injeções de 0,45 ml. Os animais de grupos VEI receberam 0,45 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, e os animais de grupos ZOL receberam 0,45 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% acrescido de zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) em concentração de 100 µg/kg. O protocolo medicamentoso teve duração de 7 semanas e as injeções foram aplicadas a cada 3 dias, de modo que a dose semanal recebida pelo animal simula a dose empregada em humanos para terapia oncológica.

3.1.5 Exodontia e tratamentos locais pós-operatórios

Para a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo, os animais foram anestesiados e posicionados em mesa operatória adequada. Foram realizadas as etapas operatórias de antisepsia da região com gluconato de clorexidina a 0,12%, sindesmotomia, luxação, exodontia e inspeção e curetagem alveolar, com instrumentais odontológicos adaptados (FIGURA 2.B,C,D). Imediatamente após a exodontia foi realizada a primeira sessão de tratamento local com própolis. Para tanto, 300 µl de nanoemulsão de própolis verde foram depositados sobre o alvéolo dentário e adjacências com auxílio de uma micropipeta (FIGURA 3). Aguardou-se 5 minutos e então o excesso localizado sobre mucosa foi delicadamente removido com auxílio de algodão estéril, tomando-se o cuidado de não remover a própolis do interior do alvéolo dentário. A região não foi enxaguada. Os tempos operatórios foram exatamente os mesmos para os grupos que receberam nanoemulsão mais fluida e nanoemulsão mais viscosa. Foram realizadas mais 9 sessões de tratamento local, a cada 2 dias (dia sim, dia não). Os animais que não receberam tratamento local com própolis foram igualmente anestesiados e posicionados em mesa operatória para fins de padronização. No entanto, nenhum tratamento local foi executado para que o coágulo sanguíneo se mantivesse intacto, permitindo que o reparo alveolar seguisse o curso natural.

3.1.6 Nanoemulsão de própolis verde

A própolis verde empregada no estudo foi produzida por abelhas *Apis mellifera L.* no apiário localizado na Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCA/Unesp). Telas propolisadoras foram utilizadas para obtenção das amostras, que posteriormente foram congeladas para facilitar a remoção da própolis. Para preparação do extrato, 30 g de própolis foram adicionadas a etanol 70%, completando o volume para 100 ml, ao abrigo de luz e sob

agitação moderada. Após uma semana, foi filtrado o extrato e a concentração final foi calculada após a obtenção do peso seco da solução (10 mg/ml).

O extrato alcoólico de própolis verde foi encapsulado em nanoestruturas lipídicas. Para obter um alto teor de sólidos destes extratos, foram utilizadas nanoemulsões compostas por óleo, extrato de própolis (5-11% m/v) e tensoativos (10-20%) e fase aquosa, composta por água com ou sem tensoativo, foi vertida na fase oleosa contendo óleo e o extrato de própolis verde com ou sem tensoativo, sob agitação magnética. O sistema foi mantido sob agitação por 4-8h.

FIGURA 2: Imagens dos tempos operatórios de ligadura e exodontia. **A:** ligadura instalada; **B:** manobra de luxação; **C:** exodontia; **D:** aspecto do alveólo imediatamente após a exodontia.

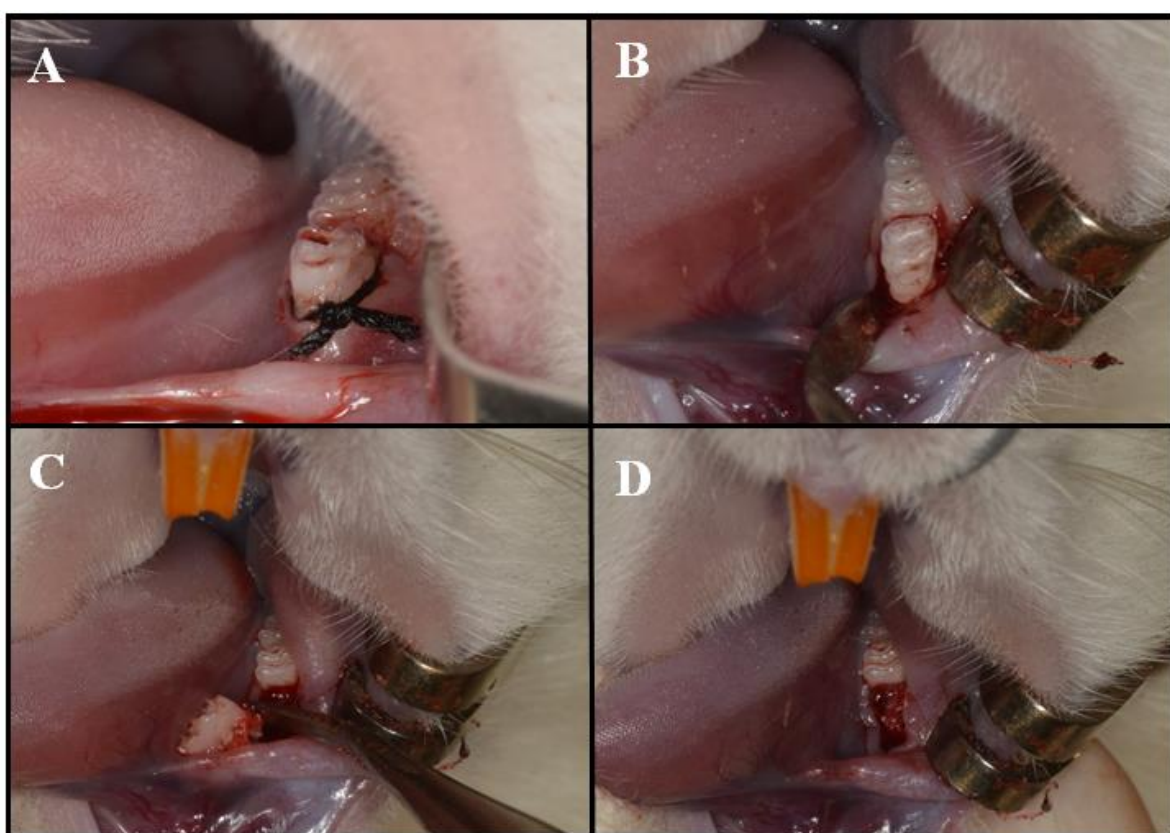


FIGURA 3: Imagens dos tempos operatórios de aplicação da nanoemulsão de própolis verde de baixa viscosidade. **A:** aspecto do alveólo no 8º dia pós-operatório; **B:** aplicação da nanoemulsão de própolis verde de baixa viscosidade sobre o alveólo e adjacências; **C:** volume total de nanoemulsão depositado.



3.1.7 Eutanásia e obtenção das amostras

Para eutanásia, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com 100 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% e 100 µl de heparina, seguido de 500 ml de solução fixadora de formaldeído a 4% (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em tampão fosfato salino (*phosphate-buffered saline*, PBS – Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA), 0,1M, pH 7,4. As hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e pós-fixadas na mesma solução fixadora por 48 horas.

3.1.8 Processamento histológico e microtomia das amostras

Após a fixação, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas e seguiram para a desmineralização em solução de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - Sigma, Saint Louis, MO, USA) em PBS por 70 dias (trocas de solução a cada 10 dias). Após, foram submetidas ao processamento histológico convencional, seguindo as etapas: lavagem em água corrente por 24 horas, desidratação em série crescente de etanol (etanol 70° GL por 1 hora, etanol 80° GL por 30 minutos, etanol 90° GL por 30 minutos, etanol 95° GL por 1 hora, etanol 100° GL I por 1 hora, etanol 100° GL II por 1 hora e etanol 100° GL III por 1 hora), diafanização em xilol (etanol 100° GL/xilol por 1 hora, xilol I por 40 minutos, xilol II por 40 minutos e xilol III por 40 minutos) e impregnação em parafina histológica em estufa a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (parafina I por 1 hora, parafina II por 1 hora e parafina III por 1 hora). As peças foram incluídas em parafina de forma que a face medial da hemimandíbula ficasse paralela à superfície do bloco de parafina (posicionada para baixo no momento da inclusão). A microtomia foi realizada seguindo-se um plano de corte paralelo ao plano méso-distal do espaço previamente ocupado pelo primeiro molar inferior e progredindo de lingual para vestibular, de modo que nos cortes histológicos fosse possível visualizar bem os espaços alveolares das raízes mesial e distal, a região de septo interradicular e as cristas ósseas alveolares mesial e distal. A porção mesial do segundo molar inferior foi tomada como referência. De cada animal foram obtidos um total de 16 cortes histológicos seriados de 5 µm cada. Seguiu-se a padronização de: os 2 primeiros cortes foram separados para a coloração por Hematoxilina e Eosina (HE), os próximos 5 cortes foram separados para reação imunoistoquímica, os próximos 2 cortes, para HE, os próximos 5, para reação imunoistoquímica, e, por fim, os últimos 2 cortes foram separados para coloração por HE. Assim, foi possível obter cortes das porções mais lingual, média e vestibular da área de interesse para a coloração por HE, nas quais a arquitetura tecidual pode ser melhor visualizada, de modo que a totalidade do alvéolo e adjacências pôde ser analisada. Os cortes histológicos

foram colocados sobre lâminas de vidro silanizadas (Platinum Line® StarFrost, Mercedes Medical LLC., Sarasota/FL, EUA).

3.1.9 Coloração

Os cortes foram submetidos à coloração por HE. Os cortes foram submetidos à desparafinização inicial em estufa a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Após, passaram por desparafinização em xilol (xilol I por 5 minutos, xilol II por 5 minutos e xilol III por 10 minutos), hidratação em série crescente de etanol (etanol 100° GL I por 2 minutos, etanol 100° GL II por 2 minutos, etanol 100° GL III por 2 minutos, etanol 95° GL por 2 minutos, etanol 90° GL por 2 minutos, etanol 70° GL por 2 minutos e água filtrada por 5 minutos), coloração pela Hematoxilina de Harris (1,5 minutos), lavagens em água filtrada, coloração pela Eosina com floxina (10 minutos), e lavagens em água filtrada, desidratação em série crescente de etanol (etanol 70° GL por 2 minutos, etanol 90° GL por 2 minutos, etanol 100° GL I por 2 minutos e etanol 100° GL II por 2 minutos) e diafanização em xilol (etanol 100° GL/xilol por 1 minuto, xilol I por 5 minutos, xilol II por 5 minutos e xilol III por 10 minutos). A seguir, foram protegidos com meio de montagem (Permount - Fisher Scientific, Hampton, Nova Hampshire, EUA) e lamínula de vidro (Olen - Kasvi, São José do Pinhais, PR, BRA).

3.1.10 Reação imunoistoquímica (técnica da imunoperoxidase indireta)

A reação imunoistoquímica para marcação das seguintes proteínas: fator de crescimento transformador $\beta 1$ (*transforming growth factor $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$), fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), proteína morfogenética óssea 2/4 (*bone morphogenetic protein 2/4*, BMP-2/4), osteocalcina (OCN), fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF κ B) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (*tartrate-resistant acid phosphatase*, TRAP) foi realizada pela técnica da imunoperoxidase indireta. Para tal, os cortes foram submetidos à desparafinização inicial em estufa a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, seguida pela desparafinização em sequência de xilol (xilol-I por 5 minutos, xilol-II por 5 minutos e xilol-III por 10 minutos) e hidratação pelo etanol em série decrescente (100° GL I por 2 minutos, 100° GL II por 2 minutos, 100° GL III por 2 minutos, 95° GL por 2 minutos e 70° GL por 2 minutos). Foram então lavados em PBS durante 5 minutos, PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) durante 5 minutos, e em PBS, novamente, durante mais 5 minutos. A seguir foram para a etapa de recuperação antigênica, a qual foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 10mM e pH 6,0 (Antigen Retrieval Buffer, Spring Bioscience Corporation, Pleasanton/CA,

EUA), colocadas em câmara pressurizada (Decloaking Chamber®, Biocare Medical LLC., Concord/CA, EUA), alcançando a temperatura máxima de 95°C durante 5 minutos, seguida pelo resfriamento gradual até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram imersos em solução de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS durante 60 minutos, e em solução de 4% de leite em pó desnatado em PBS durante 60 minutos, para o bloqueio da peroxidase e da biotina endógenas, respectivamente. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado em solução de 1,5% de soro albumina bovino (*bovine serum albumine*, BSA) em PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 durante 12 horas. Entre cada uma das etapas, as lâminas foram lavadas em PBS, PBS com Triton® X-100 e PBS novamente (5 minutos cada).

As lâminas foram divididas em seis lotes, sendo que cada lote foi incubado por 24 horas com um volume de 190 µl/lâmina dos seguintes anticorpos primários: anti-TGF-β1 (SC-146, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-VEGF (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-BMP-2/4 (SC-137087, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-OCN (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-NFκB (CÓDIGO); e anti-TRAP (SC-376875, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Todos os anticorpos primários acima listados foram preparados em diluente específico (S3022; Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako North America Inc., Carpinteria/CA, EUA), na concentração de 1:100 (TGF-β1, VEGF, BMP-2/4 e OCN) ou de 1:200 (TRAP e NFκB). As lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (190 µl/lâmina) por 90 minutos. A seguir, foram incubadas com 190 µl/lâmina de estreptavidina conjugada à peroxidase (K0675; Streptavidin-HRP, Dako North America Inc.) por 90 minutos. Todas as soluções contendo os anticorpos secundários biotilados foram preparadas na concentração de 1:200, no mesmo diluente específico utilizado para a preparação dos anticorpos primários.

A revelação foi realizada utilizando-se como cromógeno o composto 3,3'-diaminobenzidina (K3468; Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako North America Inc.) durante 45 segundos (para TGF-β1), 40 segundos (para VEGF), 120 segundos (para BMP-2/4) ou 120 segundos (para OCN), 60 segundos (para NFκB), e 40 segundos (para TRAP). Para a contracoloração, as lâminas foram lavadas em água, imersas em Hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavados em água para retirada do excesso de corante, desidratados pelo etanol em série crescente (70°GL por 2 minutos, 95°GL por 2 minutos, 100°GL I por 2 minutos, 100°GL II por 2 minutos, 100°GL III por 2 minutos), diafanizados em sequência de xilol (etanol 100°GL/xilol por 2 minutos, xilol I por 5 minutos, xilol II por 5 minutos, xilol III por 10 minutos),

recobertos por meio de montagem (Permout - Fisher Scientific, Hampton, Nova Hampshire, EUA) e lamínula de vidro (Olen - Kasvi, São José do Pinhais, PR, BRA). Como controle negativo da reação, as lâminas foram submetidas às mesmas etapas descritas, suprimindo-se apenas a utilização dos anticorpos primários. Todas as etapas da reação imunoistoquímica basearam-se no protocolo descrito por Ervolino et al. (2019) e Garcia et al. (2014).

3.2 Análise dos dados

3.2.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico extra e intrabucal

Durante todo o período experimental, a condição geral de saúde dos animais foi observada. Após a eutanásia, foi realizada inspeção visual da condição extra e intrabucal dos animais.

3.2.2 Análises microscópicas

As análises microscópicas foram realizadas com auxílio de microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss) conectado a um microcomputador e acoplado a uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera). A região analisada compreendeu o sítio de extração dental, ou seja, a área previamente ocupada pelo primeiro molar inferior e suas adjacências, incluindo o tecido mole sobrejacente.

Para a análise histológica foi realizada uma descrição que levou em consideração os seguintes parâmetros: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial; 4) padrão de celularidade e de estruturação do tecido conjuntivo; 5) padrão de celularidade e de estruturação do tecido ósseo.

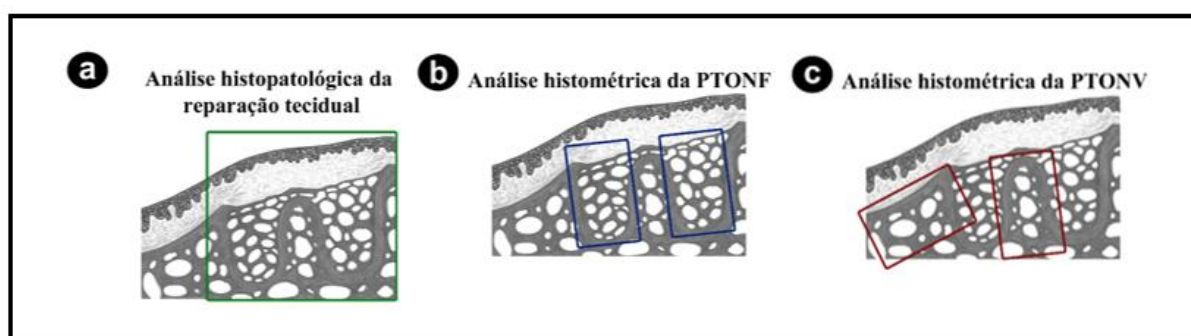
Para a análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTONF) e da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV), imagens foram capturadas (com um aumento de 200x) e a mensuração foi realizada com auxílio do programa de análise de imagens Image J. Para a análise da PTONF, as duas regiões de interesse foram os espaços previamente ocupados pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior. Para facilitar e padronizar a captura das imagens, retângulos com dimensões de 710 µm x 530 µm delimitando as regiões de interesse foram traçados. Aqui, cada um dos dois retângulos teve como limite as paredes do alvéolo e o topo da crista óssea alveolar, de modo que a maior base do retângulo estava paralela ao longo eixo do alvéolo (FIGURA 4). A PTONF foi calculada considerando a área ocupada por tecido ósseo em relação a área total da imagem capturada (100%).

Para a análise histométrica da PTONV, as duas regiões de interesse compreenderam o septo interradicular e a porção óssea à mesial do primeiro molar inferior. Igualmente, os retângulos foram traçados, um tendo o septo interradicular no seu centro e sua base maior paralela ao alvéolo, e outro compreendendo a região óssea edêntula à mesial do alvéolo, com sua base maior paralela à cortical óssea (FIGURA 4). A PTONV foi calculada considerando a área ocupada por tecido não vital, em relação a área total de tecido ósseo (100%), já descontadas as áreas de espaços medulares. Todas as mensurações foram expressas como média $\pm$ desvio-padrão.

Para análises imunoistoquímicas, um histologista cego aos tratamentos atribuiu um escore de 0 a 3 de acordo com a intensidade da marcação para cada um dos espécimes. Os valores foram expressos como mediana $\pm$ desvio interquartis.

Para TGF- β 1, VEGF, BMP-2/4, OCN, NF κ B e TRAP foi analisada toda a área da mandíbula que continha o sítio de extração dental, compreendendo a mesma região que foi efetuada a análise histopatológica. Nesta região foi efetuada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarkação para TGF- β 1, VEGF, BMP-2/4, OCN e NF κ B, onde: ESCORE 0, imunomarkação nula, ausência de células imunorreativas e ausência de imunomarkação na matriz extracelular; ESCORE 1, baixo padrão de imunomarkação, aproximadamente 20% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular; ESCORE 2, moderado padrão de imunomarkação, aproximadamente 40% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular, ESCORE 3, alto padrão de imunomarkação, aproximadamente 60% das células imunorreativas e moderada ou forte marcação na matriz extracelular. Para TRAP: ESCORE 0, imunomarkação nula, ausência de células TRAP-positivas; ESCORE 1, 1 - 7 células TRAP-positivas por mm²; ESCORE 2, 8 - 14 células TRAP-positivas por mm², ESCORE 3, mais de 14 células TRAP-positivas por mm².

FIGURA 4: Esquema representativo das regiões de interesse das análises histopatológica (a), histométrica da PTONF (b) e histométrica da PTONV (c).



3.2.3 Análise estatística

A estatística foi realizada com auxílio do programa BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). Para a análise histométrica da PTONF e PTONV foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Para as análises imunoistoquímicas foram empregados os testes de Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados

4.1 Análise da condição geral de saúde dos animais e exame extra e intrabucal

As condições gerais e o peso corporal dos animais dos grupos VEI, VEI-PRO1, VEI-PRO2, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 se mantiveram dentro de um padrão de normalidade e constantes durante todo o período experimental. Os animais do grupo ZOL apresentaram uma leve diminuição no peso corporal, especialmente após a exodontia, a qual se manteve até o final do período experimental.

Ao exame clínico intrabucal, em ZOL observou-se uma loja cirúrgica mais ampla que nos demais grupos experimentais, cuja mucosa sobrejacente não se reconstituiu. Em alguns espécimes destes grupos havia exposição óssea e ampliação ainda maior do sítio de extração. Nos grupos VEI, VEI-PRO1, VEI-PRO2, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 houve reparação completa, ou quase completa, do sítio de extração dental, com uma loja cirúrgica bem menor e recoberta total ou parcialmente por tecidos moles.

4.2 Análise histopatológica

As figuras 5 e 6 mostram o aspecto histológico do interior do sítio de extração dental e do tecido ósseo adjacente ao sítio de extração dental, respectivamente.

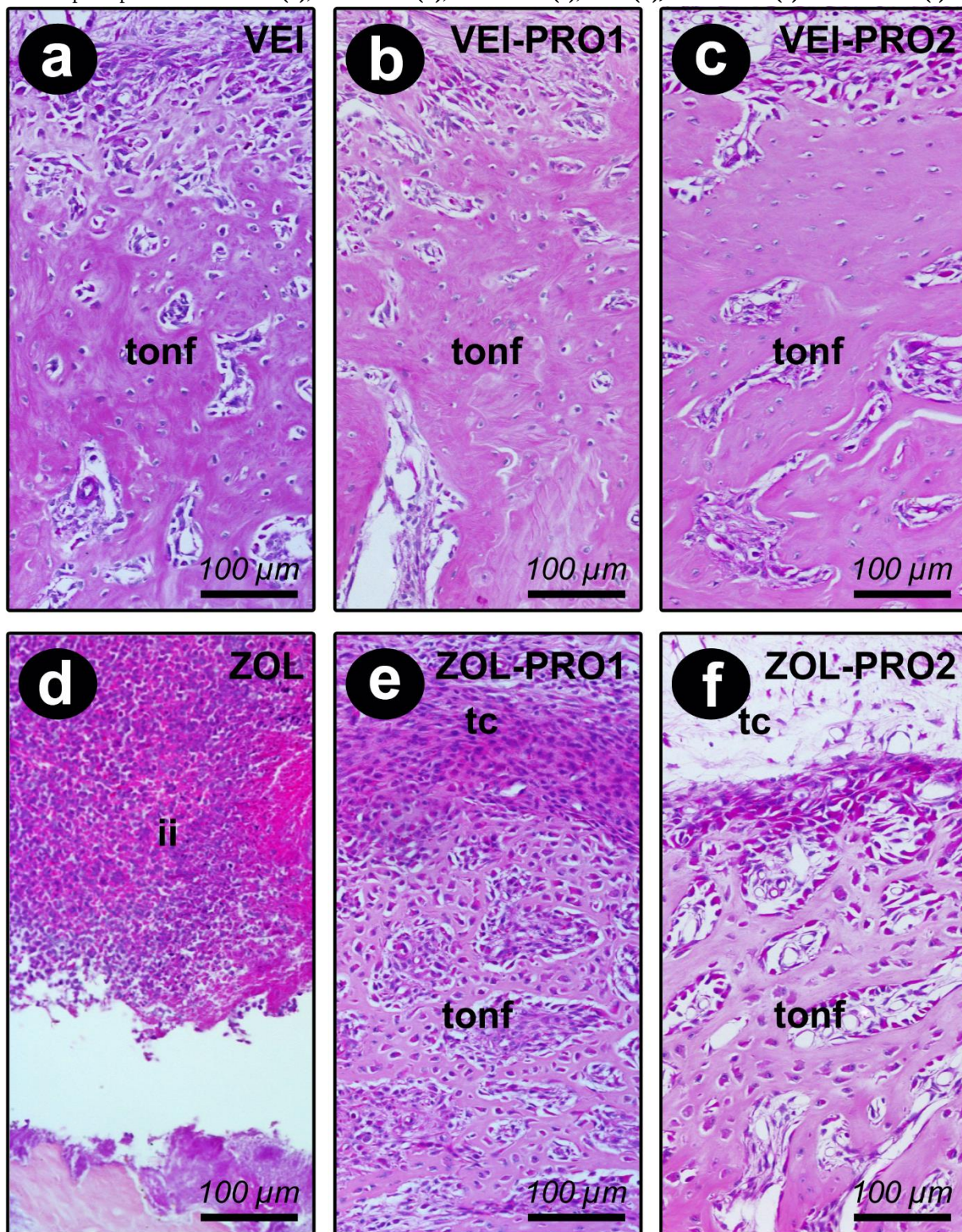
No grupo ZOL foi observado uma ampla loja cirúrgica, com presença de nenhuma, ou pequena quantidade de tecido ósseo neoformado em alguns pontos. No tecido ósseo situado nas adjacências do alvéolo dental constatou-se a presença de grande quantidade de tecido ósseo não vital, caracterizado por apresentar grande quantidade de lacunas vazias ou contendo apenas remanescentes de osteócitos. Neste tecido, grande parte dos espaços medulares se mostrava ocupada por grande quantidade de células inflamatórias e restos celulares. Em sua superfície observou-se grande concentração de células inflamatórias e biofilme. A mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental se mostrava composta por uma fina faixa de tecido epitelial restrita exclusivamente às margens da ferida cirúrgica e por um tecido conjuntivo exposto e com um abundante infiltrado inflamatório, predominantemente composto por células mononucleadas e alguns polimorfonucleares.

Os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-PRO1, VEI-PRO2) apresentavam características histopatológicas muito similares entre si. A maior parte dos alvéolos dentais se mostrava ocupada por tecido ósseo neoformado, cuja quantidade foi similar entre tais grupos, no entanto, os grupos VEI-PRO1 e VEI-PRO2 apresentavam um tecido ósseo composto por trabéculas ósseas mais espessas, denotando um nível de maturação maior que no grupo VEI. O

tecido ósseo situado nas adjacências dos alvéolos dentais se mostrou com a integridade totalmente preservada. A mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental se mostrou composta por um epitélio de variada espessura que recobria toda, ou grande parte, da ferida cirúrgica. Esse tecido se apoiava em um tecido conjuntivo constituídos por grande quantidade de fibroblastos, uma quantidade de moderada a elevada de fibras colágenas e intensamente vascularizado. Raras foram as células inflamatórias observadas na lâmina própria desta mucosa.

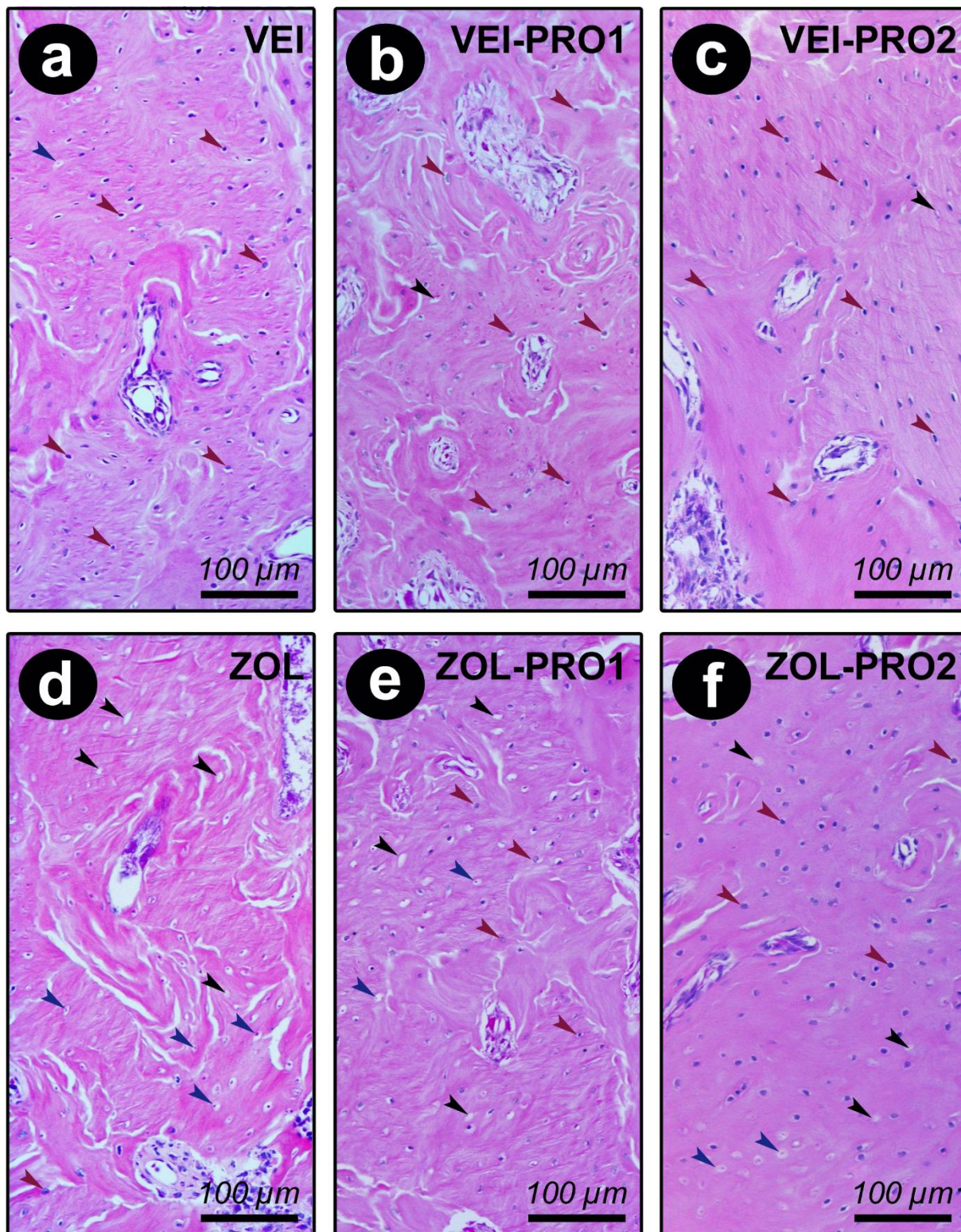
Nos grupos ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 as características histopatológicas se mostravam bastante semelhantes entre si. Na maioria dos espécimes, grande parte do sítio de extração dental se mostrava ocupada por tecido ósseo. Nestes dois grupos observou-se trabéculas ósseas extremamente delgadas e recobertas por osteoblastos em franca atividade. Quando tais grupos são comparados com os grupos tratados com o veículo, fica muito evidente que nível de maturação do tecido ósseo neoformado é muito menor em ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, o que denota um atraso do processo de reparação tecidual. Nas adjacências do alvéolo dental se observava variada quantidade de tecido ósseo não vital, o qual qualitativamente se mostrava muito semelhante aquele observado no grupo ZOL, todavia quantitativamente em uma proporção muitas vezes menor que neste grupo. A mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental se mostrava, na maioria dos espécimes, recoberta parcialmente por um delgado epitélio. Esse tecido se apoiava em uma lâmina própria contendo fibroblastos, fibras colágenas e algumas células inflamatórias e alguns vasos sanguíneos.

FIGURA 5: Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – d) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo neoformado no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d), ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).



Abreviações e símbolos: ii, infiltrado inflamatório; tc, tecido conjuntivo, tonf, tecido ósseo neoformado. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 μm.

FIGURA 6: Aspecto histológico das adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – d) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo situado nas adjacências do sítio de extração dental em VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d), ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).

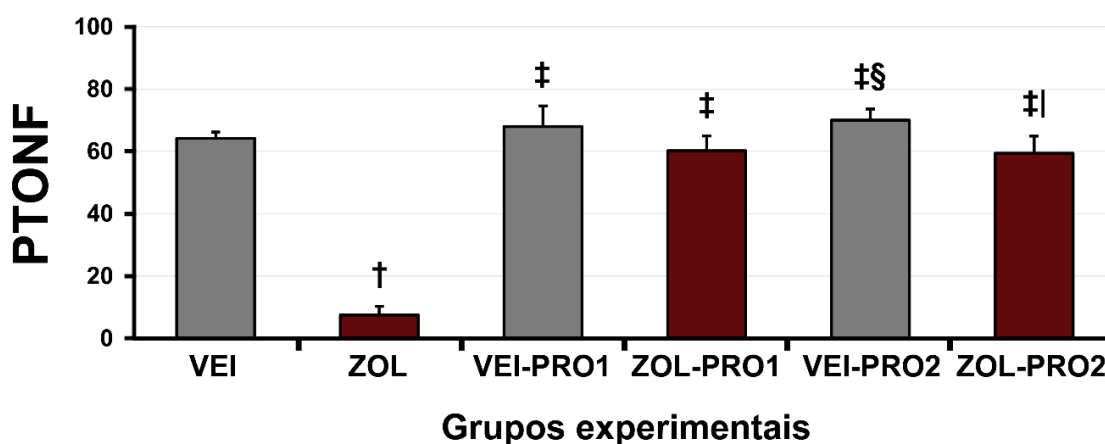


Símbolos: setas vermelhas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; setas azuis, lacunas com remanescentes celulares. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.

4.3 Porcentagem de tecido ósseo neoformado no sítio de extração dental

A PTONF em todos os grupos experimentais está apresentada no Gráfico 1. O grupo ZOL apresentou menor PTONF quando comparado com os demais grupos experimentais. Em ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, a PTONF foi menor que em VEI-PRO2. Não houve diferença estatística na PTONF quando os grupos VEI, VEI-PRO1, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 são comparados entre si.

GRÁFICO 1: Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia.

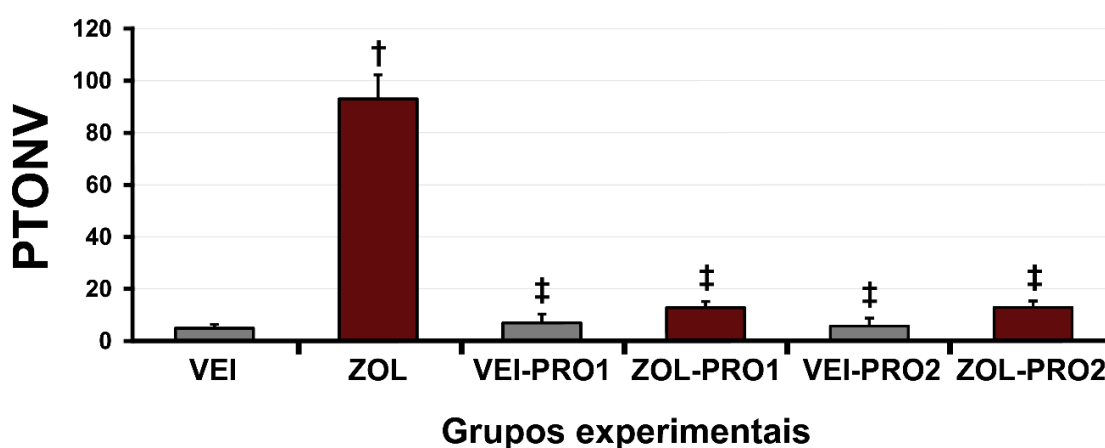


Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ‡|, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; ‡\$, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

4.4 Porcentagem de tecido ósseo não vital nas adjacências do sítio de extração dental

A PTONV em todos os grupos experimentais está apresentada no Gráfico 2. Em ZOL, a PTONV foi maior que nos demais grupos experimentais. Quando os grupos VEI, VEI-PRO1, VEI-PRO2, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 são comparados entre si, não se constata diferenças estatisticamente significativas.

GRÁFICO 2: Porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia.



Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

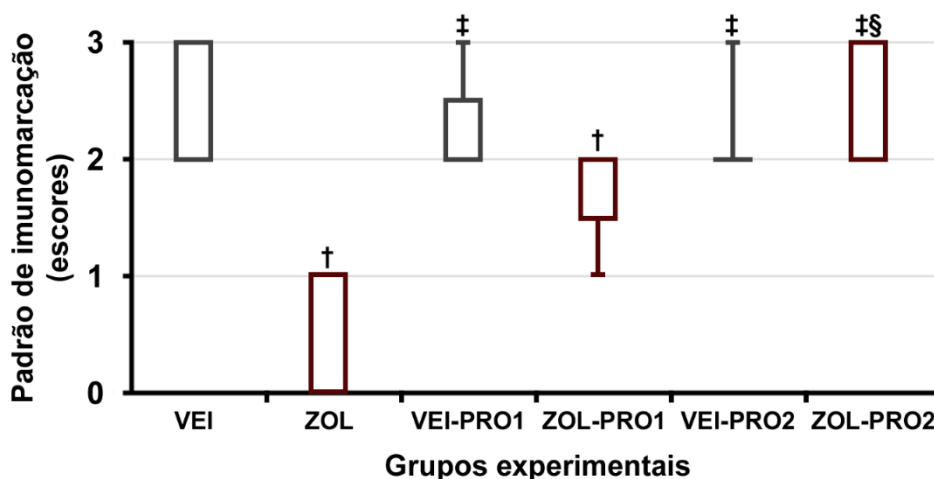
4.5 Análise imunoistoquímica

4.5.1 TGF- β 1

O padrão de imunomarcção para TGF- β 1 no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no gráfico 3 e na figura 7. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção). Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção).

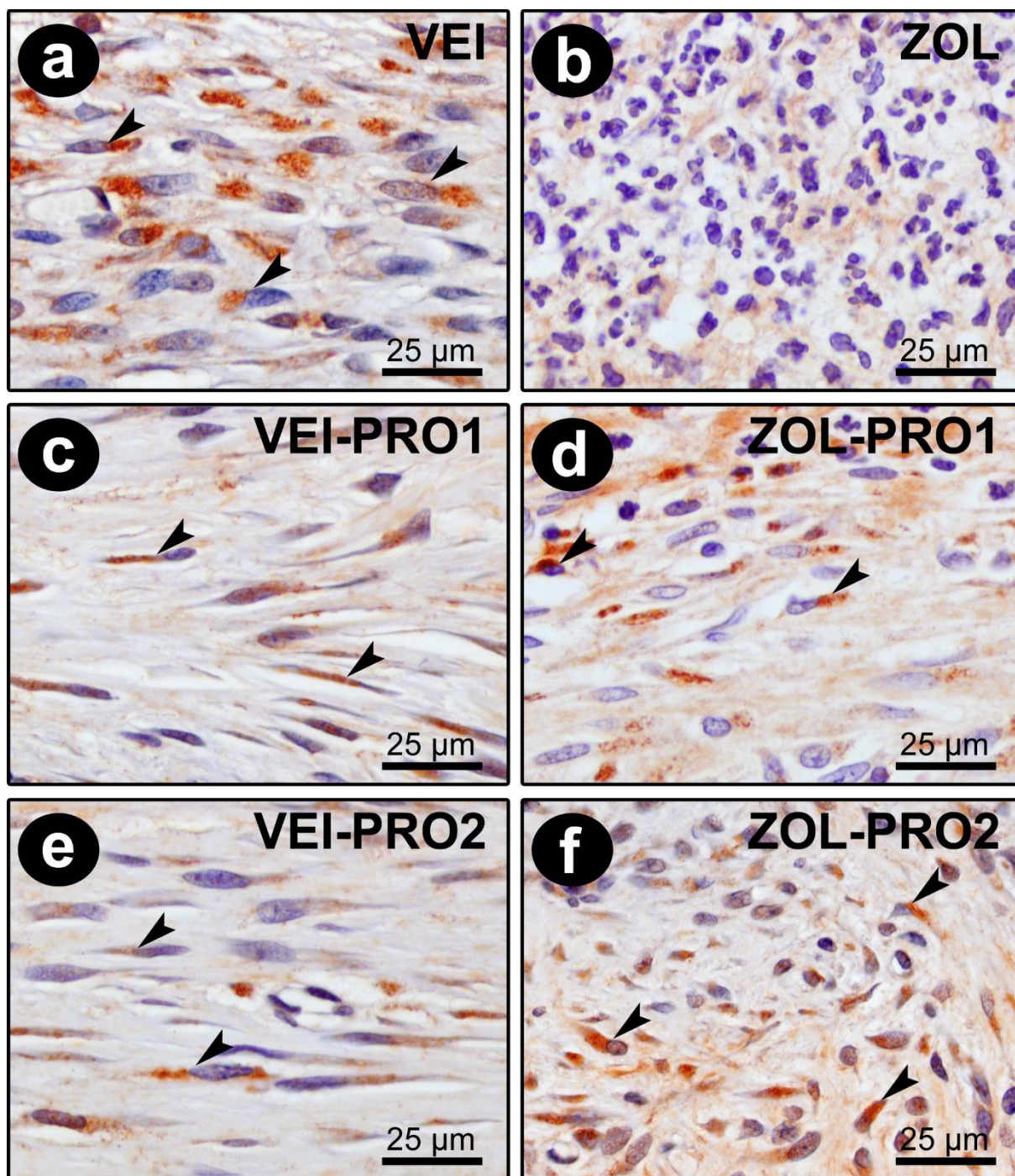
O grupo ZOL apresentou um padrão de imunomarcção para TGF- β 1 menor que todos os demais grupos. Entre VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2, não houve diferença estatisticamente significativa. ZOL-PRO1 apresentou um padrão de imunomarcção menor que ZOL-PRO2.

GRÁFICO 3: Padrão de imunomarcção para TGF- β 1 no sítio de extração dental.



Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

FIGURA 7: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TGF- β 1 na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).



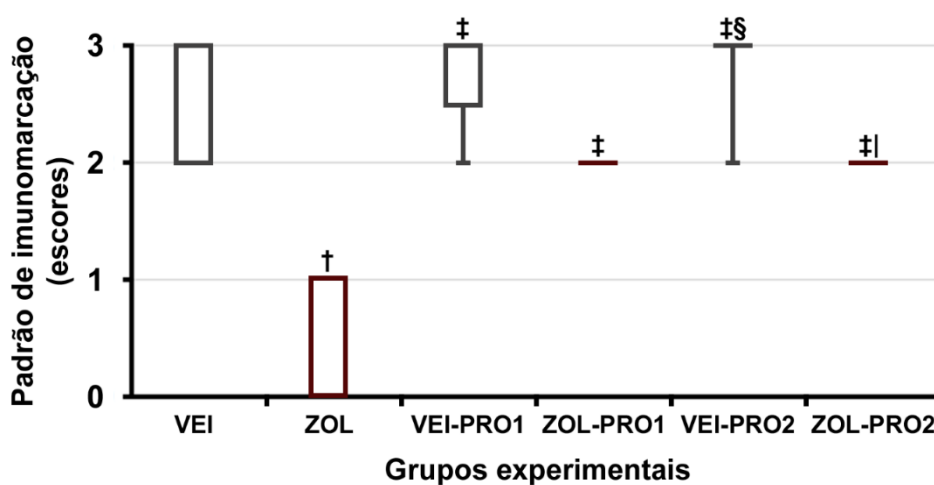
Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células TGF- β 1-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m.

4.5.2 VEGF

O padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no gráfico 4 e na figura 8. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção) e 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção). Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção).

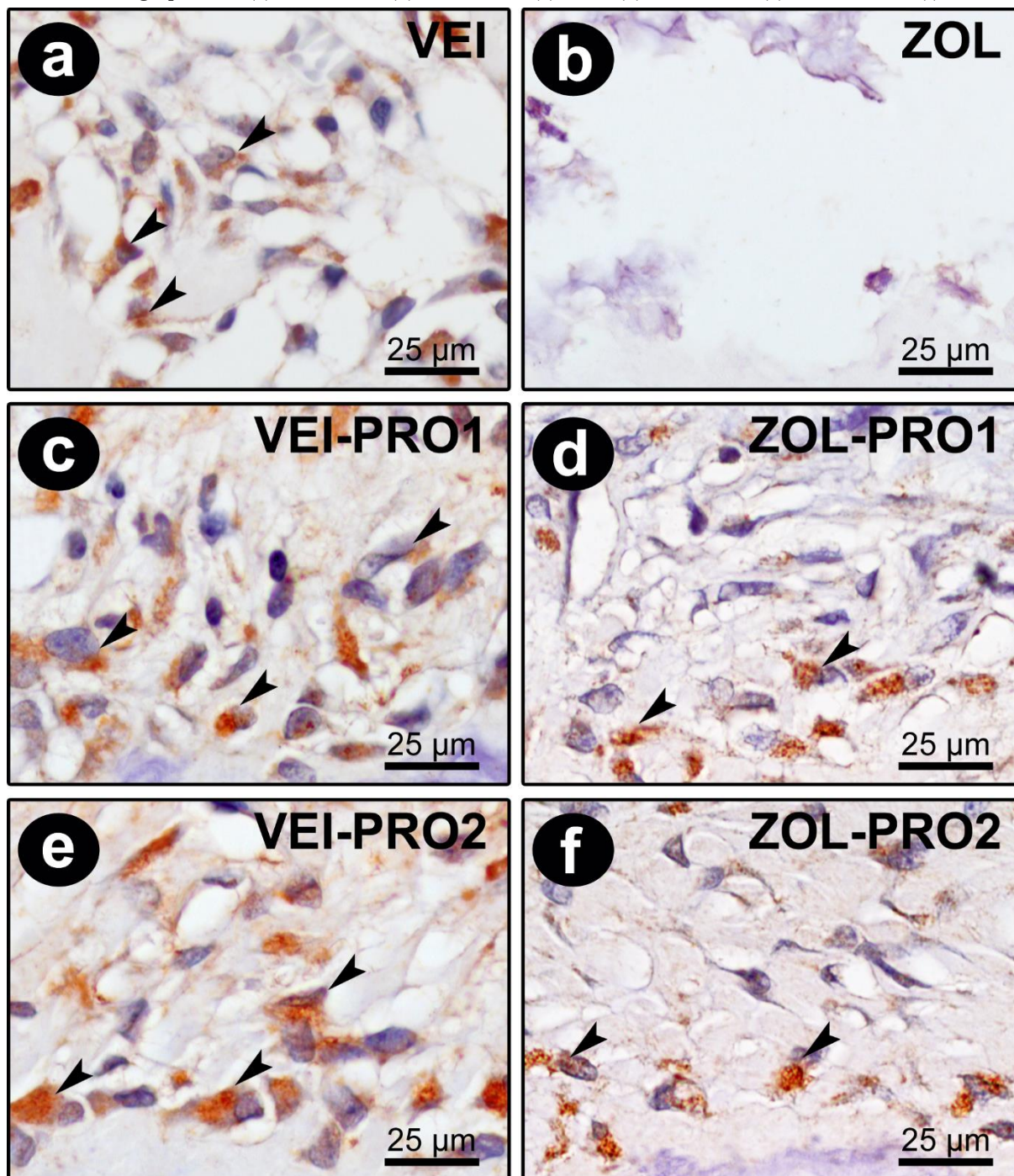
O grupo ZOL apresentou um padrão de imunomarcção para VEGF menor que todos os demais grupos. O padrão de imunomarcção para VEGF em ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 foi menor que em VEI-PRO2.

GRÁFICO 4: Padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental.



Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

FIGURA 8: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).



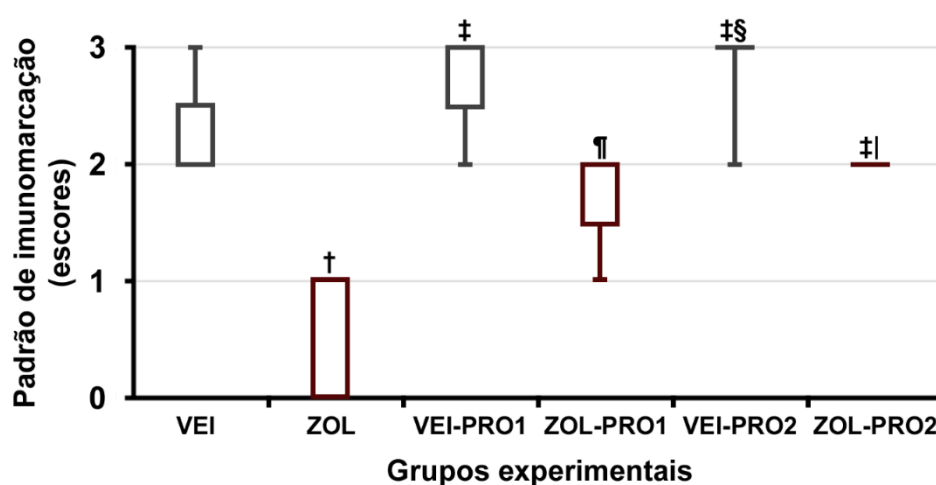
Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células VEGF-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

4.5.3 OCN

O padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no gráfico 5 e na figura 9. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção) e 3 (3 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção). Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção).

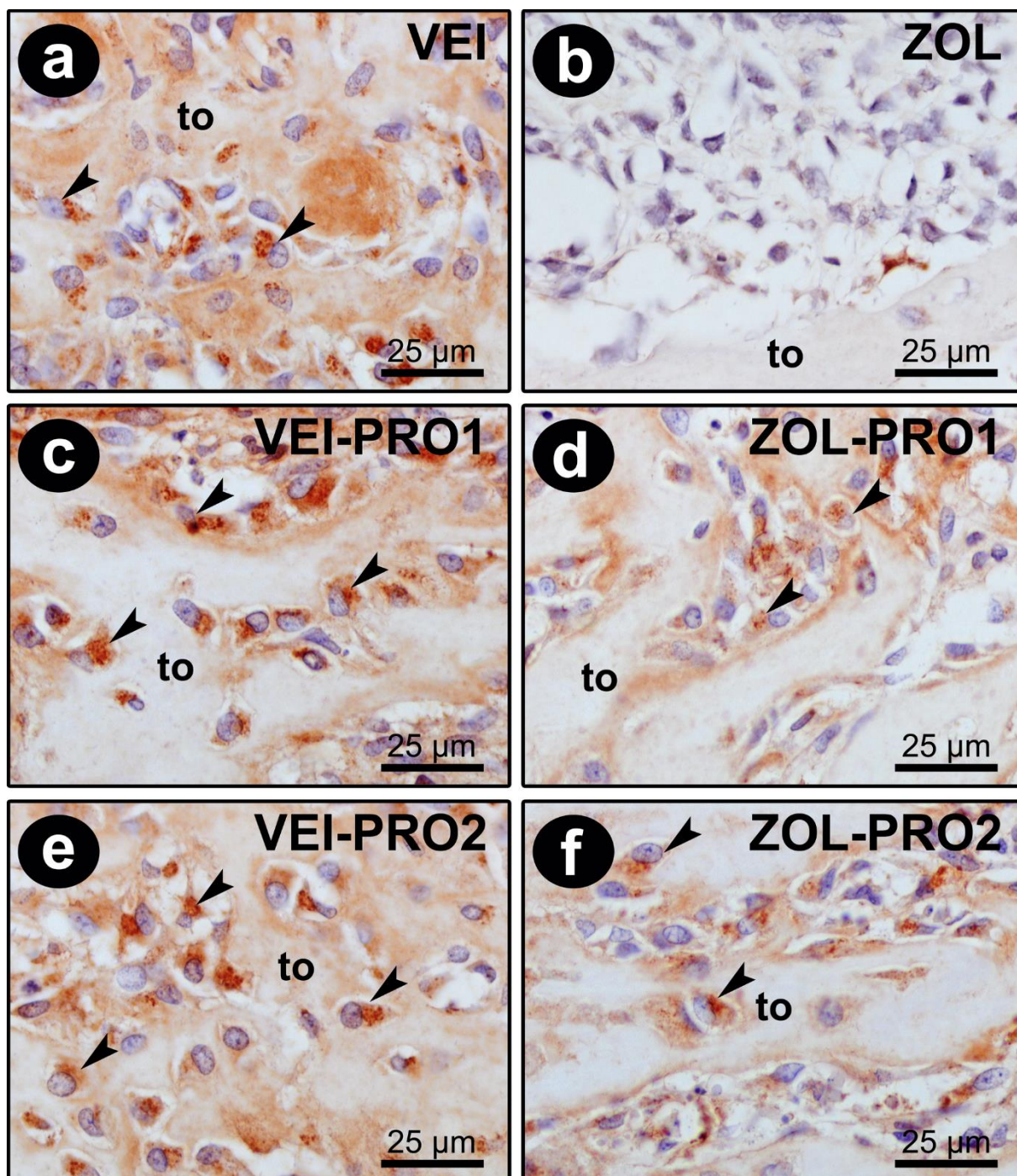
O grupo ZOL apresentou um padrão de imunomarcção para OCN menor que o apresentado pelos grupos VEI, VEI-PRO1, VEI-PRO2 e ZOL-PRO2. O padrão de imunomarcção para OCN em ZOL-PRO1 foi menor que em VEI-PRO1 e VEI-PRO2. O grupo ZOL-PRO2 apresentou um padrão de imunomarcção menor que o apresentado por VEI-PRO2.

GRÁFICO 5: Padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental.



Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

FIGURA 9: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).



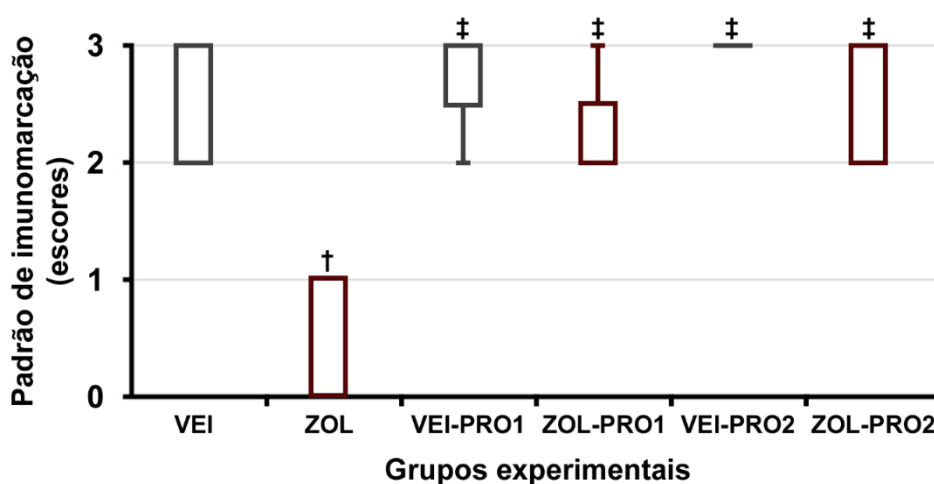
Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células OCN-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

4.5.4 BMP-2/4

O padrão de imunomarcção para BMP2/4 no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no gráfico 6 e na figura 10. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção) e 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção). Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção).

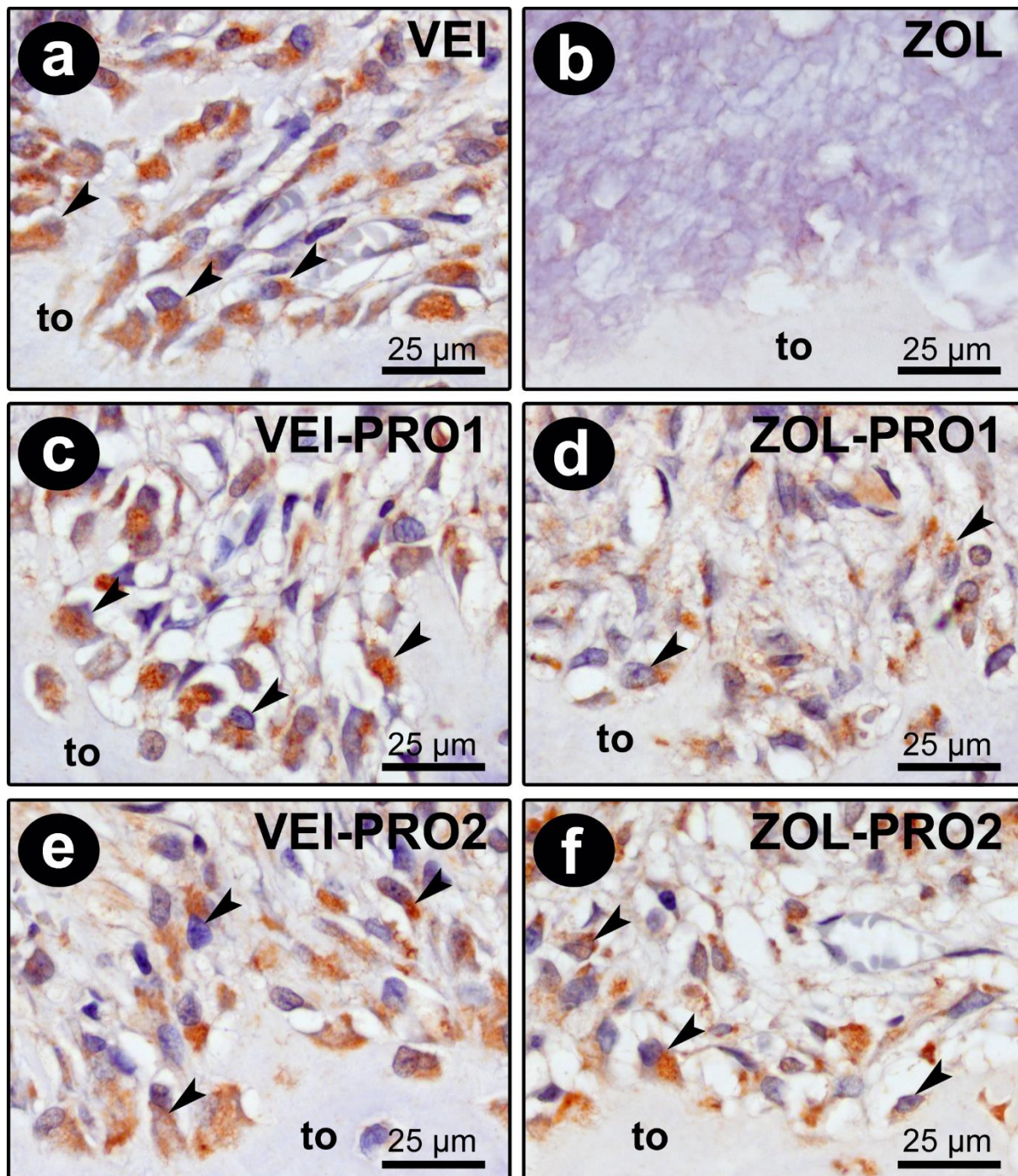
O grupo ZOL apresentou um padrão de imunomarcção para BMP2/4 menor que todos os demais grupos.

GRÁFICO 6: Padrão de imunomarcção para BMP-2/4 no sítio de extração dental.



Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; ||, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

FIGURA 10: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).



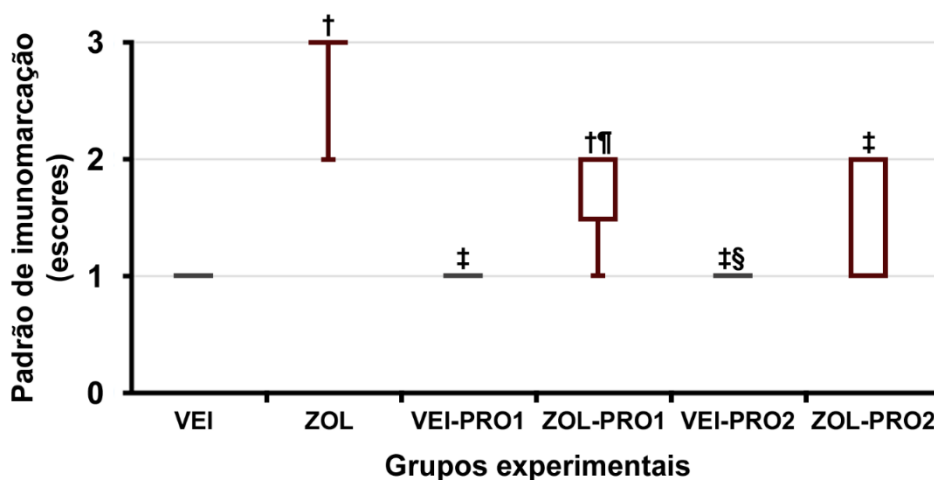
Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células BMP-2/4-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

4.5.5 NFκB

O padrão de imunomarcação para NFκB no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no gráfico 7 e na figura 11. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcação), 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcação) e 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcação). Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcação), 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcação) e 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcação).

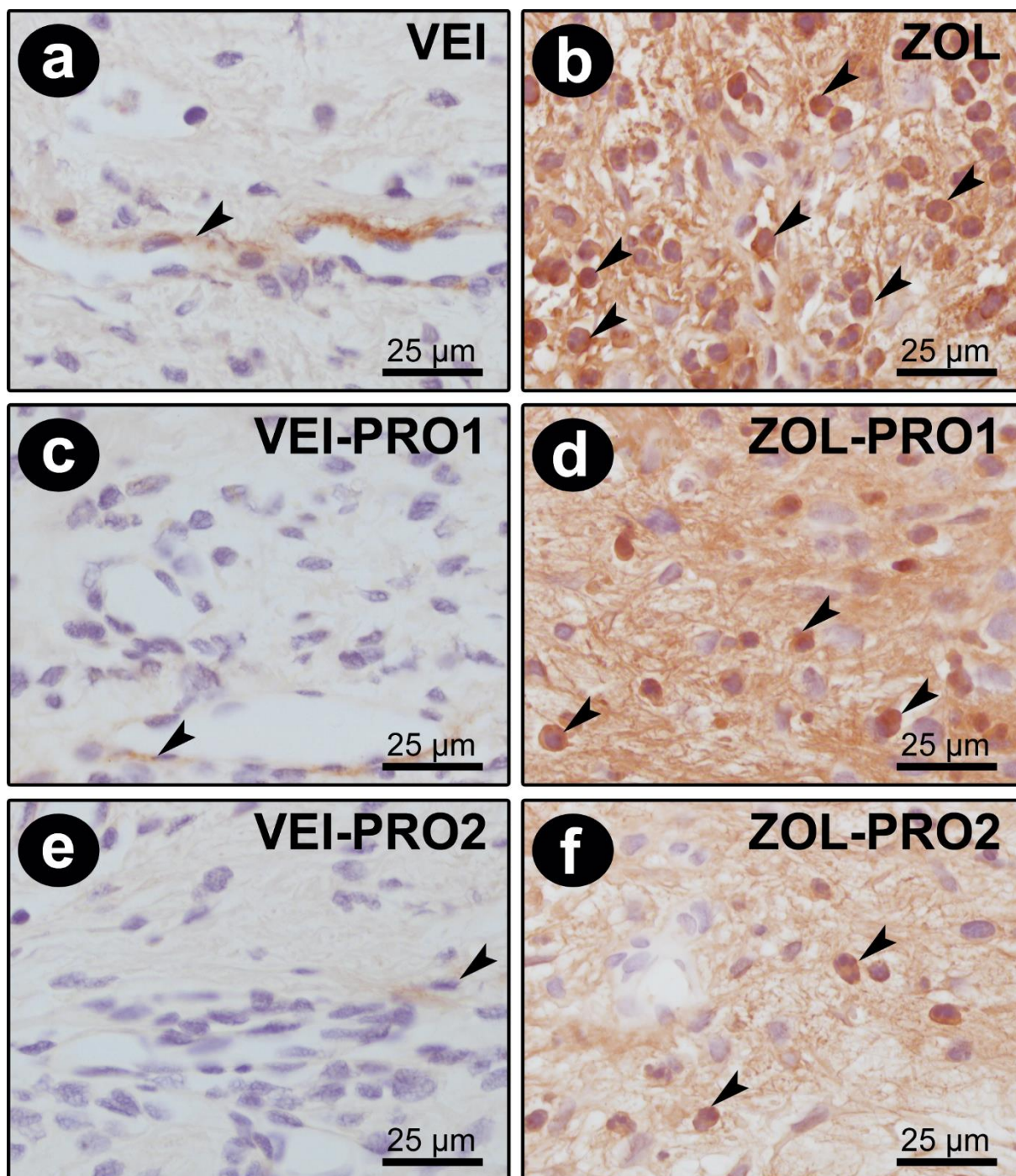
O grupo ZOL apresentou um padrão de imunomarcação para NFκB maior que todos os demais grupos. O padrão de imunomarcação para NFκB em ZOL-PRO1 foi maior que em VEI-PRO1 e VEI-PRO2.

GRÁFICO 7: Padrão de imunomarcação para NFκB no sítio de extração dental.



Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

FIGURA 11: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para NF κ B na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).



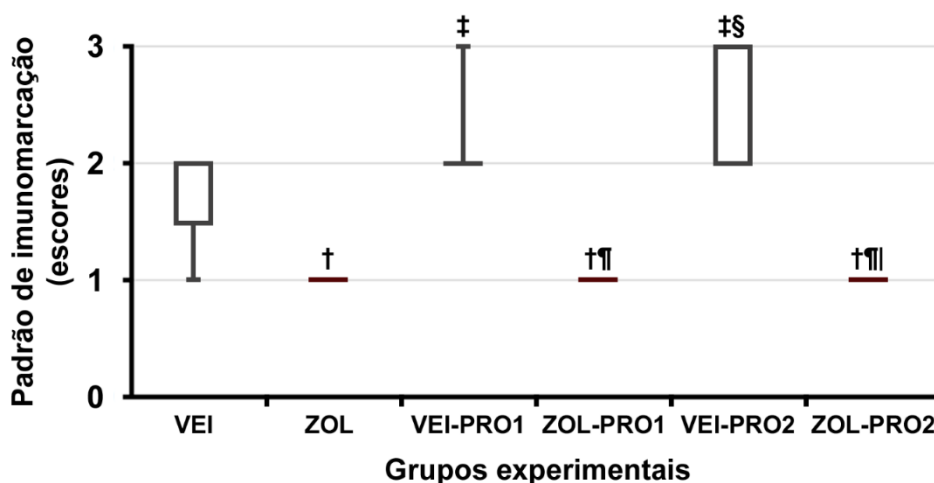
Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células NF κ B-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm.

4.5.6 TRAP

O padrão de imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no gráfico 8 e na figura 12. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção). Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2, a mediana e o desvio interquartis foi, respectivamente, de 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção).

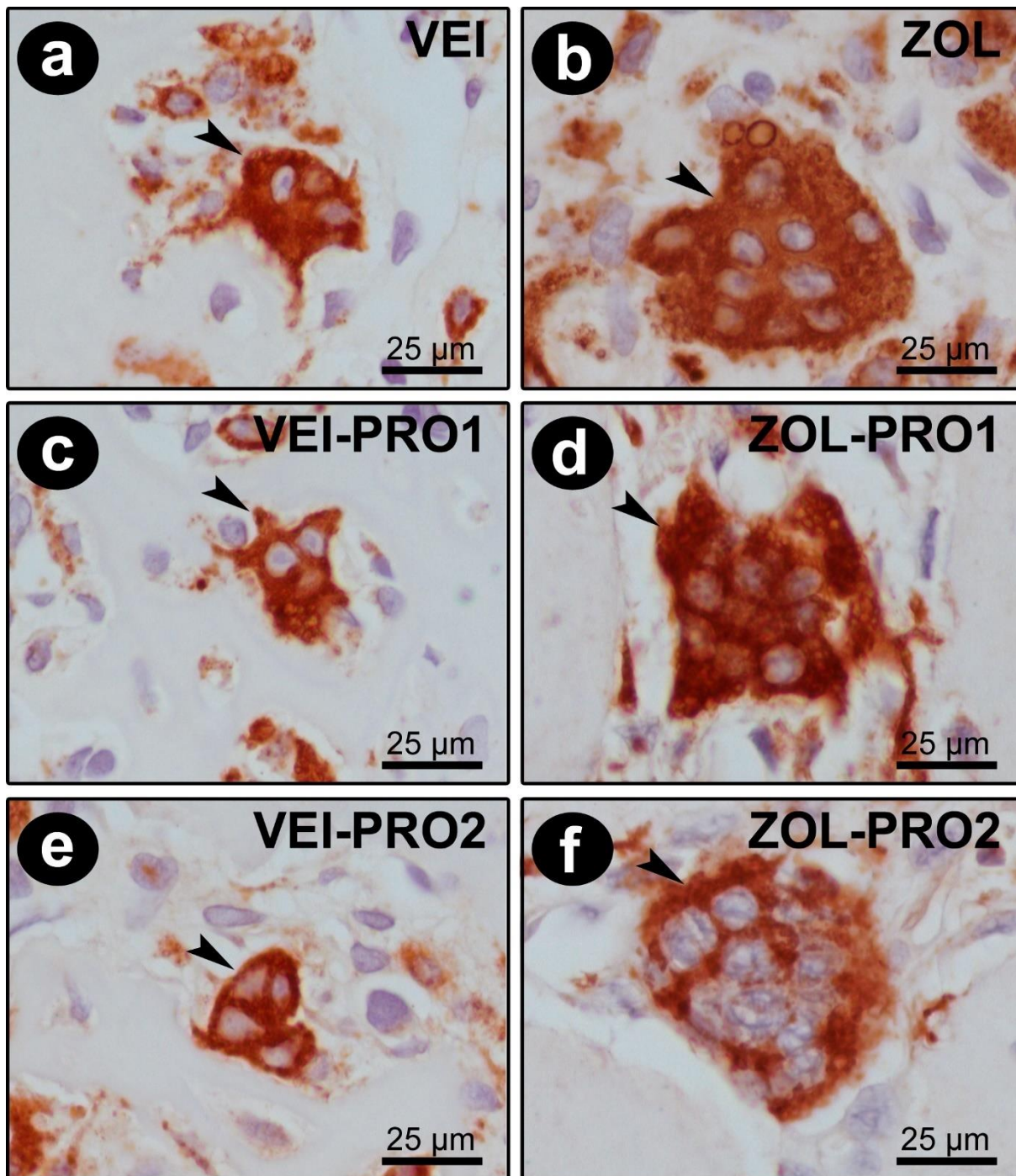
Os grupos tratados com zoledronato (ZOL, ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2) apresentaram um menor padrão de imunomarcção para TRAP quando comparados com os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2).

GRÁFICO 8: Padrão de imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental.



Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO1; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PRO1; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PRO2.

FIGURA 12: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), VEI-PRO1 (b), VEI-PRO2 (c), ZOL (d) ZOL-PRO1 (e) e ZOL-PRO2 (f).



Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células TRAP-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

5 Discussão

Historicamente, os BFs têm sido empregados com grande êxito para o controle de destruição óssea nas mais variadas situações clínicas (RUSSEL, 2011). O uso de BFs cada vez mais potentes e em doses mais altas fez despontar um importante efeito adverso, com relevância sobretudo para a Odontologia: a ONM (DRAKE et al., 2008). Avanços no entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da ONM têm sido realizados, mas a complexidade da doença ainda dificulta a definição da sua etiopatologia. Simultaneamente à busca pelo entendimento da patofisiologia, estudos buscando por protocolos terapêuticos e/ou preventivos mais efetivos que os atuais têm sido realizados.

A prevenção da ONM é amplamente recomendada devido à dificuldade de resposta ao tratamento que lesões já estabelecidas apresentam (MARX et al., 2005). A recomendação atual é a realização de antibioticoterapia profilática nos casos em que pacientes fazendo uso de BFs necessitem de intervenções odontológicas mais invasivas, mas não é efetiva em todos os casos (CABRAS et al., 2021; HOEFERT et al., 2011). Terapias alternativas ou adjuvantes têm sido estudadas, principalmente aquelas que são capazes de simultaneamente promover a bioestimulação tecidual, modular a resposta inflamatória, e exercer ação antimicrobiana. As várias propriedades biológicas da própolis são reconhecidas e exploradas em diversas áreas, dentro e fora da Odontologia. Notadamente, suas ações anti-inflamatória, imunomodulador e bioestimuladora vêm a ser interessante para a prevenção da ONM. No presente estudo, optou-se por empregar a própolis de forma tópica em formulação de nanoemulsão, cuja finalidade é melhorar sua absorção e potencializar seus efeitos.

O emprego de modelos animais e modelos *in vitro* têm sido bastante explorados nas pesquisas sobre tratamento e prevenção da ONM. O presente modelo animal foi delineado pelo nosso grupo de pesquisa e tem sido empregado em diversos estudos. Ele busca simular o perfil de paciente de risco da ONM e, por isso, empregou animais fêmeas senescentes (17 meses). A escolha por ratas acíclicas teve a finalidade de mimetizar as condições hormonais das mulheres desse perfil de risco, as quais reconhecidamente têm importante influência sobre o metabolismo ósseo. A dose de BFs empregada simula a dose recebida por humanos no tratamento oncológico, a qual tem maior associação com a ocorrência de ONM, e, assim como a via administrativa, está bem documentada (ANESI et al., 2019; BI et al., 2010; ERVOLINO et al., 2019; STATIKIEVIZ et al., 2018; TORO et al., 2019). O emprego de exodontia de dente com comprometimento periodontal simula uma situação clínica rotineira e bastante associada com o desenvolvimento de ONM (MARX et al., 2015). Tanto a presença de quadro

inflamatório/infeccioso decorrente da periodontite quanto a realização de exodontia exigem esforços do organismo para reparo e são fatores desencadeantes de ONM (RUGGIERO et al., 2004; MARX et al., 2005 MIGLIORATI, BRENNAN, PETERSON, 2019). A ONM é uma condição documentada em humanos, e, sendo assim, optou-se por descrever sua ocorrência em ratos como lesões semelhantes à ONM. Foram consideradas lesões semelhantes à ONM em ratos: a presença de loja cirúrgica apresentando sinais clínicos e histológicos de grande comprometimento de reparação tecidual e presença de grande quantidade de tecido ósseo não vital nas adjacências do alvéolo dentário ao longo de 28 dias pós-operatórios, em ratos tratados com antirreabsortivo e que nunca foram expostos à radiação X.

O grupo ZOL apresentou grande comprometimento do reparo tecidual, reduzida PTONF e tecido mole sobrejacente mal estruturado e com presença de extenso infiltrado inflamatório. Tais achados corroboram estudos anteriores que demonstram o efeito negativo dos BFs sobre osteoblastos e seus precursores, com redução da viabilidade celular e alteração da morfologia e atividade celular (BASSO et al., 2013). Estudos *in vitro* têm demonstrado menor expressão de Runx-2, importante para diferenciação de osteoblastos, e colágeno I, BMP 2 e 7, fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*, ALP) e OCN, importantes para síntese e mineralização da matriz óssea, em osteoblastos tratados com BFs, de modo dose-dependente (BASSO et al., 2013; LÓPEZ, LESTON, JORNET, 2018; MANZANO-MORENO et al., 2018. PATNTIRAPONG et al., 2021). BFs também exercem efeito citotóxico sobre queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (AGHALOO et al., 2015; ALLEN, BURR, 2009; BASSO et al., 2016; PABST et al, 2012; WALTER et al., 2010), o que compromete sobremaneira o reparo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental. De fato, o grupo ZOL apresentou ausência de epitélio sobre a ferida cirúrgica e tecido conjuntivo desestruturado. A presença de mucosa íntegra é uma das primeiras barreiras protetoras do sistema imune inato, de modo que a exposição prolongada do tecido ósseo facilita sua contaminação e dificulta seu reparo (WILLIAMS et al., 2014). Cabras et al. (2021) e Matsumoto et al. (2017) relataram redução da ocorrência de ONM quando houve aproximação das bordas cirúrgicas e bom fechamento da ferida após exodontia.

O grupo ZOL apresentou PTONV muito maior que todos os demais grupos, e alguns espécimes apresentaram presença de lesões semelhantes à ONM ao exame clínico. A inibição da atividade clástica causada pelos BFs pode ser observada pela alteração da morfologia celular (células maiores e hipernucleadas, com ausência de borda corrugada e desacopladas da matriz óssea) (RUSSEL et al., 1999). A imunomarcagem para TRAP nos três grupos tratados com

zoledronato não apresentou diferença estatisticamente significativa quando tais grupos são comparados entre si. Tais grupos apresentaram menor imunomarcagem para TRAP quando comparados com VEI, o que é reflexo da ação do zoledronato. Esses dados corroboram dados prévios do nosso grupo, que também demonstraram menor marcação de TRAP em grupos tratados com zoledronato em comparação com grupos controle (ERVOLINO et al., 2019; TORO et al., 2019). A menor atividade de osteoclastos prejudica a remoção de áreas danificadas, necessária para a posterior deposição de osso, de forma que o resultado final é o acúmulo de áreas não vitais e o comprometimento do reparo ósseo (ALLEN 2009, MIGLIORATI, BRENNAN, PETERSON, 2009). Ruggiero et al (2004), em um dos relatos mais iniciais sobre a ONM, já apontavam a redução do turnover ósseo como um importante mecanismo patogênico. A ação citotóxica direta aos osteócitos tem sido sugerida, porém ainda não foi comprovada (AGUIRRE, CASTILLO, KIMMEL, 2021).

O infiltrado inflamatório no grupo ZOL apresentou-se intenso e se estendia por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo. Sabe-se que os BFs causam disfunção da resposta imune local, tendo efeito sobre células imunes e causando desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. A expressão de várias citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ pode ser afetada (ZHANG et al., 2021). Os BFs também interferem na polarização de macrófagos inflamatórios, alterando a taxa de M1/M2 (WEHRHAN et al., 2017; ZHANG et al., 2021). Macrófagos M1 têm ação pró-inflamatória, com notada habilidade de destruição de patógenos e apresentação de antígenos. Expressam diversas citocinas pró-inflamatórias e algumas enzimas como ciclooxygenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) (VIOLA et al., 2019). Macrófagos M2, por sua vez, têm ação anti-inflamatória/resolutiva, estando relacionados com controle da inflamação, fagocitose de restos celulares apoptóticos e condução do reparo, por meio da expressão de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento (VIOLA et al., 2019). BFs estimulam a polarização de M1 e inibem a de M2 por mais de um mecanismo e o bloqueio desses mecanismos se mostrou efetivo em reduzir a incidência de ONM (QU et al., 2020; WEHRHAN et al., 2017; ZHANG et al., 2013; ZHU et al., 2019). A influência dos BFs sobre outras células e mecanismos da resposta imune tem sido cada vez melhor compreendida e ainda há muito para ser explorado. O resultado da ação dos BFs é o prolongamento e exacerbação do estado pró-inflamatório, que causa danos teciduais e impede a fase resolutiva subsequente. Ademais, tal desregulação também é influenciada por infecções locais. Embora ainda não se tenha clareza sobre a infecção ser um fator etiopatogênico ou um evento secundário à necrose, sabe-se que a infecção de áreas

necróticas inevitavelmente ocorre, sendo a presença de bactérias em biópsias de ONM muito comum (MARX et al., 2015). A polarização de macrófagos M1 é estimulada pela presença de lipopolissacarídeo (LPS), de modo que, sendo evento primário ou não, a infecção estimula a persistência de quadro inflamatório e atrasa o reparo. Desse modo, a associação de inflamação exacerbada e prolongada, reparo prejudicado e susceptibilidade a infecção em um tecido debilitado pela diminuição de seu turnover e acúmulo de microfraturas, localizado em ambiente com rica microbiota, submetido a cargas mecânicas mastigatórias e recoberto apenas por mucosa pode culminar em desfechos trágicos como a ONM.

O uso da própolis na prevenção da ONM tem o objetivo de usar de sua capacidade imunomoduladora, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante para auxiliar na melhora do reparo tecidual. No presente estudo, os grupos ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 apresentaram redução do infiltrado inflamatório, comparado com o grupo ZOL. Existe variabilidade nos resultados dos estudos sobre a ação da própolis na expressão de diversas citocinas pró e anti-inflamatórias, o que provavelmente se deve à variabilidade na composição da própolis de diferentes origens geográficas e também aos diferentes delineamentos experimentais. No entanto, apesar dessa variabilidade, a capacidade da própolis em reduzir expressão de IL-1 β , IL-6 e IL-12 (citocinas pró-inflamatórias) e aumentar de IL-10, IL-4 e TGF- β (citocinas anti-inflamatórias) é amplamente relatada (ALANAZI et al., 2020; BUENO-SILVA et al., 2015; BUENO-SILVA et al., 2017; ELKHENANY, EL-BADRI, DHAR, 2019; SZLISZKA et al., 2013). A própolis também reduz a expressão de COX-2 e de lipoxigenase (LOX) (ALANAZI et al., 2020; ASGHARPOUR et al., 2019; EKEUKU, CHIN, 2021; PAHLAVANI et al., 2020) e a produção de prostaglandinas e leucotrienos (BANSKOTA, TEZUKA, KADOTA, 2001; EKEUKU, CHIN, 2021; SFORCIN, 2007; PAHLAVANI et al., 2020).

Além da modulação de diversos mediadores inflamatórios, estudos mostram que a própolis também poderia reduzir a polarização e a atividade de macrófagos M1. A própolis reduz a expressão de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), estimulador da polarização de M1 (BUENO-SILVA et al., 2015; BUENO-SILVA et al., 2017; ELKHENANY, EL-BADRI, DHAR, 2019; SZLISZKA et al., 2013). Além disso, a própolis reduz a produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a expressão de iNOS (ALANAZAI et al., 2020; ASGHARPOUR et al., 2019; BUENO-SILVA et al., 2015; BUENO-SILVA et al., 2017; BÚFALO et al., 2013; PASUPULETI et al., 2017; SZLISZKA et al., 2013). A produção de NO e de EROs faz parte dos mecanismos microbicidas dos fagócitos. O NO é produzido pela iNOS

no citosol e difundido para fora da célula, e tem efeito citotóxico sobre parasitas e células hospedeiras tumorais e normais. As EROs são produzidas a partir de O_2 num processo chamado explosão respiratória e agem por dano oxidativo a estruturas celulares. Para evitar que as EROs causem dano à célula hospedeira, existem vários mecanismos antioxidantes agindo fora dos fagossomos. No entanto, em condições de resposta inflamatória exacerbada ou prolongada, a produção excessiva de EROs e NO podem causar lesão tecidual. Além de reduzir a produção de EROs, a própolis tem importante ação antioxidante, graças a presença de flavonoides, colaborando com a redução do estresse oxidativo que pode ser causado pela atividade dos macrófagos. Alanazi et al. (2020) e Pahlavani et al. (2020) relataram que a própolis aumentou os níveis de glutathione reduzida (GSH), marcando maior atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase.

As EROs e o NO também agem como sinais inflamatórios, estimulando a expressão de molécula de adesão celular vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), importantes para a diapedese, e a ativação de NF κ B (ALANAZI et al., 2020; HUSSAIN et al., 2016, WEST et al., 2011), de modo que a inflamação é cada vez mais intensificada.

O NF κ B é o principal fator de transcrição de vários mediadores pró-inflamatórios. Sem estímulo, está presente no citoplasma ligado ao seu inibidor natural, o I κ B. A ativação clássica do NF κ B acontece mediante ativação de receptores do tipo toll (*toll-like receptors*, TLR), por ligação a padrões moleculares associados a danos (*damage associated molecular pattern*, DAMP) ou a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), ou de receptores de fatores de crescimento e de citocinas. A ativação desses receptores leva a fosforilação do I κ B, que segue para degradação em proteassomos. O NF κ B livre no citosol segue para o núcleo, onde se liga ao DNA, ativando a expressão de vários genes pró-inflamatórios (BÚFALO et al., 2013, BRASILEIRO FILHO, 2019). No grupo ZOL, houve maior ativação de NF κ B comparado com todos os demais grupos. No grupo ZOL-PRO1, a imunomarcagem para NF κ B foi menor que em ZOL e maior que em VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2. ZOL-PRO2, VEI, VEI-PRO1 e VEI-PRO2 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si. Assim, podemos sugerir que a própolis não reduziu os níveis normais de ativação de NF κ B, mas foi capaz de impedir a ativação exacerbada associada ao zoledronato.

A capacidade da própolis de inibir a ativação de NF κ B tem sido bastante relatada (ASGHARPOUR et al., 2019; BUENO-SILVA et al., 2015; BÚFALO et al., 2013; CONTE et al., 2021; CÔRREA et al., 2017; PAHLAVANI et al., 2020; XUAN et al., 2019), com destaque

para o éster fenetílico do ácido cafeico (*caffeic acid phenethyl ester*, CAPE) (ANG et al., 2009; PAHLAVANI et al., 2020; SFORCIN 2007), um composto encontrado em algumas própolis. A própolis parece atrasar a degradação do I κ B, inibindo a translocação nuclear do NF κ B (ANG et al., 2009; NIE et al., 2017; XUAN et al., 2019). Assim, a própolis colaboraria com o controle da fase pró-inflamatória exacerbada nos animais tratados com zoledronato, agindo em vários pontos desse processo, desde a inibição da expressão de mediadores inflamatórios até a migração e atividade de várias células inflamatórias.

A imunomarcção de TGF- β 1 em ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 foi maior que em ZOL. ZOL-PRO2 foi maior que ZOL-PRO1, com valores comparáveis aos de VEI. Quanto à imunomarcção de VEGF, os grupos ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 não diferiram entre si e se mostraram maiores que o grupo ZOL. O grupo VEI-PRO2 apresentou maior imunomarcção para VEGF que ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2. TGF- β 1 é um importante fator de crescimento relacionado com a proliferação de fibroblastos, queratinócitos, tecido ósseo e, juntamente com o VEGF, vasos sanguíneos. BFs reduzem os níveis de TGF- β 1 e VEGF, supostamente pela redução da polarização de macrófagos M2, uma vez que essas células são importantes fontes desses fatores de crescimento (WEHRHAN et al., 2017). Alanazi et al. (2020) relataram que a própolis teria a capacidade de estimular a polarização de macrófagos M2, o que poderia explicar os maiores valores de TGF- β 1 e VEGF nos grupos ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2. Valores esses que estão de acordo com a literatura, que mostra que a própolis aumentou os níveis de TGF- β 1 (ANSORGE, REINHOLD, LENDECKEL, 2003; ELKHENANY, EL-BADRI, DHAR, 2019; RAHAYU et al., 2020; SFORCIN, 2007) e de VEGF (LIMA ET AL., 2014; KRESNOADI, LUNARDHI, AGUSTONO, 2020; KURAMOTO et al., 2019; RAHAYU 2020).

A modulação da inflamação permite que o organismo avance para a fase de reparo, favorecendo o restabelecimento da mucosa e o reparo alveolar. Pasupuleti et al. (2017) relataram que a própolis aumenta a quantidade de colágeno tipo I durante cicatrização de feridas e modula a expressão de fibronectina, melhorando a migração de queratinócitos e favorecendo formação de tecido de granulação. No histopatológico, é possível observar que os grupos ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 apresentaram maior recobrimento mucoso da ferida, com tecido conjuntivo mais celularizado e melhor estruturado e redução significativa do infiltrado inflamatório.

Os grupos ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 apresentaram neoformação óssea no interior do alvéolo. As trabéculas ósseas eram mais delgadas que as dos três grupos VEI, no entanto o reparo foi muito melhor que o do grupo ZOL. A PTONF desses grupos foi maior que em ZOL e não diferiu de VEI. O grupo VEI-PRO2 apresentou PTONF maior que ZOL-PRO1 e ZOL-

PRO2. Alguns estudos relataram maior formação de tecido ósseo e número de osteoblastos em animais tratados com própolis (KRESNOADI, LUNARDHI, AGUSTONO, 2020; KRESNOADI et al., 2020; MEIMANDI-PARIZI et al., 2018; SOMSANITH et al., 2018). No entanto, ainda não existem informações sólidas o suficiente para afirmarmos que a própolis tem ação estimuladora direta sobre diferenciação e atividade de osteoblastos e neoformação óssea. Sabe-se que o estresse oxidativo e a inflamação crônica com excessivos níveis de citocinas pró-inflamatórias perturbam o equilíbrio da homeostase óssea (DAR et al., 2018; GRUBER, 2019, EKEUKU, CHIN, 2021; LIN et al., 2017). Dessa forma, poderia ser questionado se a ação da própolis seria indireta, permitindo que o organismo coordenasse o reparo ósseo ao modular a resposta inflamatória.

De qualquer forma, a própolis colaborou com a neoformação óssea, como mostram os resultados do histopatológico e do histométrico e também as imunomarcações para BMP-2/4 e OCN. ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 apresentaram maior imunomarcação para BMP-2/4 que ZOL, com ZOL-PRO2 não diferindo de VEI. ZOL-PRO1 apresentou maior quantidade de OCN que ZOL, mas sem diferença estatística. ZOL-PRO2 apresentou maior imunomarcação para OCN comparado com ZOL. VEI-PRO2 apresentou maior imunomarcação para OCN que ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2. Esses dados corroboram os da literatura, que mostram maiores níveis de OCN, BMP-2 e BMP-7 em tratamentos com própolis (EKEUKU, CHIN, 2021; KRESNOADI, WIDJAJA, LAKSONO, 2021; KRESNOADI et al., 2020; SOMSANITH et al., 2018).

Apesar dos achados sobre a ação da própolis sobre diferenciação e atividade osteoblástica ainda serem inconclusivos, sua ação sobre osteoclastos é melhor documentada. Ao inibir a ativação do NFκB, a própolis não apenas modula a resposta inflamatória, como também inibe a osteoclastogênese e ativação osteoclástica induzida pela inflamação (ANG et al., 2009; EKEUKU, CHIN, 2021). A ligação do receptor ativador de fator nuclear kappa B (*receptor activator of nuclear factor kappa B*, RANK) da membrana de precursores de osteoclastos com seu ligante (*receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*, RANKL) ativa o NFκB, que regula alguns genes envolvidos na diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos (ABU-AMER, 2013). Essa propriedade da própolis não pôde ser avaliada no presente estudo, uma vez que nos grupos VEI-PRO1 e VEI-PRO2 não havia processo inflamatório exacerbado e sim uma ferida em processo de reparação tecidual.

A própolis foi capaz de promover redução na imunomarcação de NFκB nos grupos tratados com zoledronato. Porém não foi possível observar o reflexo disso na imunomarcação de TRAP nos grupos tratados com zoledronato, uma vez que os valores de TRAP nesses grupos

são significativamente baixos em função da potente ação inibitória do zoledronato sobre os osteoclastos. Sendo assim, o padrão de imunomarcagem de TRAP nos grupos ZOL-PRO1 e ZOL-PRO2 se devem à ação do zoledronato, de modo que qualquer efeito da própolis sobre esse parâmetro fica ofuscado.

De modo geral, o grupo ZOL-PRO2 mostrou-se superior ao ZOL-PRO1 em alguns parâmetros avaliados. Acredita-se que a discreta diferença em alguns resultados se deve à diferença de viscosidade das duas nanoemulsões, de modo que a alta viscosidade permitiu que a nanoemulsão no grupo ZOL-PRO2 se mantivesse em posição por mais tempo, o que favoreceu a absorção dos compostos ativos. Assim, em se tratando do desenvolvimento de um medicamento, é importante considerar também algumas de suas propriedades físicas. Acredita-se que a nanoemulsão de baixa viscosidade seja mais indicada para situações nas quais se efetua a irrigação da área, o que não foi o caso do presente estudo, no qual ela foi apenas depositada sobre a ferida cirúrgica. Ou seja, no caso de reparo alveolar, a nanoemulsão de alta viscosidade parece performar melhor.

A indicação de uso da própolis na medicina convencional ainda esbarra no grande problema da variabilidade de composição de própolis de diferentes origens geográficas. A padronização na composição é um pré-requisito básico para a incorporação de um medicamento na rotina clínica, de modo que se possa seguir protocolos testados e obter resultados previsíveis. Assim, baseando-se nos resultados do presente estudo, estudos clínicos empregando própolis na prevenção da ONM-M podem ser propostos, porém a ressalva quanto a essa questão deve sempre ser levada em consideração. O estudo da própolis na prevenção da ONM-M, somado aos crescentes estudos de Osteoimunologia, pode ter levantado questões muito interessantes acerca da patogenia da doença para as quais cabe maior investigação. O conhecimento da ação da própolis sobre vários mecanismos imunes e reparativos e o impacto disso na melhora do reparo em animais tratados com zoledronato pode ajudar a evidenciar alguns pontos que até então não tinham tanta atenção e que podem ser bastante relevantes para a compreensão dessa doença tão complexa.

6 Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo, é possível concluir que o uso local de nanoemulsão de própolis verde (tanto com baixa viscosidade quanto com alta viscosidade) no sítio de extração dental de ratas senescentes tratadas com altas doses de zoledronato favoreceu a reparação alveolar e evitou a ocorrência de lesões semelhantes à ONM. Ainda, o uso de nanoemulsão com alta viscosidade apresentou algumas vantagens em algumas das análises do presente estudo.

Referências bibliográficas

- ABOALNAJA KO et al. Utilization of nanoemulsions to enhance bioactivity of pharmaceuticals, supplements, and nutraceuticals: Nanoemulsion delivery systems and nanoemulsion excipient systems. **Expert Opin Drug Deliv.** 2016 Sep;13(9):1327-36. doi: 10.1517/17425247.2016.1162154.
- ABU-AMER Y. NF- κ B signaling and bone resorption. **Osteoporos Int.** 2013 Sep;24(9):2377-86. doi: 10.1007/s00198-013-2313-x.
- AGHALOO T, HAZBOUN R, TETRADIS S. Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** 2015 Nov;27(4):489-96. doi: 10.1016/j.coms.2015.06.001.
- AGUIRRE JI, CASTILLO EJ, KIMMEL DB. Biologic and pathologic aspects of osteocytes in the setting of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). **Bone.** 2021 Dec;153:116168. doi: 10.1016/j.bone.2021.116168.
- ALANAZI S et al. Temperate Propolis Has Anti-Inflammatory Effects and Is a Potent Inhibitor of Nitric Oxide Formation in Macrophages. **Metabolites.** 2020 Oct 14;10(10):413. doi: 10.3390/metabo10100413.
- ALI KM, SALEH Z, JALAL J. Effect of local propolis irrigation in experimental periodontitis in rats on inflammatory markers (IL-1 β and TNF- α) and oxidative stress. **Indian J Dent Res.** 2020 Nov-Dec;31(6):893-898. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_909_19.
- ALLEN MR, BURR DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **J Oral Maxillofac Surg.** 2009 May;67(5 Suppl):61-70. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.007.
- ALLEN MR. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: moving from the bedside to the bench. **Cells Tissues Organs.** 2009;189(1-4):289-94. doi: 10.1159/000151371.
- ANESI A et al. From Osteoclast Differentiation to Osteonecrosis of the Jaw: Molecular and Clinical Insights. **Int J Mol Sci.** 2019 Oct 4;20(19):4925. doi: 10.3390/ijms20194925.
- ANG ESM et al. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF-kappaB and NFAT activity. **J Cell Physiol.** 2009 Dec;221(3):642-9. doi: 10.1002/jcp.21898.
- ANSORGE S, REINHOLD D, LENDECKEL U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. **Z Naturforsch C J Biosci.** 2003;58(7-8):580-9. doi: 10.1515/znc-2003-7-823.
- ARAL CA et al. Alveolar Bone Protective and Hypoglycemic Effects of Systemic Propolis Treatment in Experimental Periodontitis and Diabetes Mellitus. **J Med Food.** 2015;18(2):195-201.
- ASGHARPOUR F et al. Propolis attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through intracellular ROS and NO levels along with downregulation of IL-1 β and IL-6 expressions in murine RAW 264.7 macrophages. **J Food Biochem.** 2019 Aug;43(8):e12926. doi: 10.1111/jfbc.12926.
- BACHIEGA TF et al. The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages. **Phytother. Res.** 2012 Sep;26(9):1308-13. doi: 10.1002/ptr.3731.
- BANKOVA V et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie.** 1998;29:361-367. doi: 10.1051/apido:19980406.
- BANSKOTA AH, TEZUKA Y, KADOTA S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother Res.** 2001 Nov;15(7):561-71. doi: 10.1002/ptr.1029.
- BASSO FG et al. Response of a co-culture model of epithelial cells and gingival fibroblasts to zoledronic acid. **Braz Oral Res.** 2016 Nov 28;30(1):e122. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0122.
- BASSO FG et al. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. **Gerontology.** 2013;59(6):534-41. doi: 10.1159/000351194.
- Bi Y et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **Am J Pathol.** 2010 Jul;177(1):280-90. doi: 10.2353/ajpath.2010.090592.

- BOULAIZ H. et al. Nanomedicine: Application Areas and Development Prospects. **Int. J. Mol. Sci.** 2011;12:3303-21.
- BRASILEIRO FILHO G. Bogliolo – Patologia Geral. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- BUENO-SILVA B et al. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. **PLoS One**. 2015 Dec 14;10(12):e0144954. doi: 10.1371/journal.pone.0144954.
- BUENO-SILVA B et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **J Ethnopharmacol**. 2017 Jul 31;207:100-107. doi: 10.1016/j.jep.2017.06.015.
- BÚFALO MC et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **J Ethnopharmacol**. 2013 Aug 26;149(1):84-92. doi: 10.1016/j.jep.2013.06.004.
- CABRAS M et al. Lack of evidence in reducing risk of MRONJ after teeth extractions with systemic antibiotics. **J Oral Sci**. 2021;63(3):217-226. doi: 10.2334/josnusd.21-0016.
- CHADHA GK et al. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. **J Oral Implantol**. 2013;39(4):510-520.
- CHANG J, HAKAM AE, McCAULEY LK. Current Understanding of the Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaw. **Curr Osteoporos Rep**. 2018 Oct;16(5):584-595. doi: 10.1007/s11914-018-0474-4.
- CHOI SJ, McCLEMENTS DJ. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic nutraceuticals: strategies for improving their formulation, stability, functionality and bioavailability. **Food Sci Biotechnol**. 2020 Jan 24;29(2):149-168. doi: 10.1007/s10068-019-00731-4.
- CONTE FL et al. Propolis from southeastern Brazil produced by *Apis mellifera* affects innate immunity by modulating cell marker expression, cytokine production and intracellular pathways in human monocytes. **J Pharm Pharmacol**. 2021;73(2):135-144.
- CÔRREA FRS et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NF κ B. **Biomed Pharmacother**. 2017 Feb;86:162-171. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.018.
- DAR HY et al. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. **Front Biosci (Landmark Ed)**. 2018 Jan 1;23:464-492. doi: 10.2741/4600.
- DE MÉLO SILVA IS et al. Encapsulation of Red Propolis in Polymer Nanoparticles for the Destruction of Pathogenic Biofilms. **AAPS PharmSciTech**. 2020;21(2):49.
- DOMAZETOVIC V et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clin Cases Miner Bone Metab**. 2017 May-Aug;14(2):209-216. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.209.
- DRAKE MT, CLARKE BL, KHOSLA S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc**. 2008;83(9):1032-1045.
- DUNFORD JE et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. 2001;296(2):235-242.
- EBETINO FH et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**. 2011;49(1):20-33.
- EKEUKU SO, CHIN KY. Application of Propolis in Protecting Skeletal and Periodontal Health-A Systematic Review. **Molecules**. 2021 May 25;26(11):3156. doi: 10.3390/molecules26113156.
- ELKHENANY H, EL-BADRI N, DHAR M. Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells. **Biomed Pharmacother**. 2019 Jul;115:108861. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108861.

- ERVOLINO E et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**. 2019 Mar;120:101-113. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014.
- FICARRA G et al. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. **J Clin Periodontol**. 2005 Nov;32(11):1123-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00842.x.
- FLEISCH H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. **Metab Bone Dis Relat Res**. 1981;3(4-5):279-87. doi: 10.1016/0221-8747(81)90044-8.
- FRANCIS MD, RUSSELL RG, FLEISCH H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. **Science**. 1969 Sep 19;165(3899):1264-6. doi: 10.1126/science.165.3899.1264.
- FREIRES IA et al. The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. **Arch Oral Biol**. 2018 Mar;87:196-203. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.019.
- GARAVAND F et al. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. **Food Chem**. 2021 Dec 1;364:130376. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130376.
- GOMEZ FONT R, MARTINEZ GARCIA ML, OLMOS MARTINEZ JM. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. **Update. Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**. 2008;13(5):e318-324.
- GONZÁLEZ-SERRANO J et al. Application of propolis extract, nanovitamin C and nanovitamin E to prevent alveolar osteitis after impacted lower third molar surgery. A randomized, double-blind, split-mouth, pilot study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 2021 Mar 1;26(2):e118-e125. doi: 10.4317/medoral.23915.
- GRUBER R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. **J Clin Periodontol**. 2019 Jun;46 Suppl 21:52-69. doi: 10.1111/jcpe.13056.
- HALL A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**. 1998;279(5350):509-14.
- HELLSTEIN JW, MAREK CL. Bisphosphonate osteochemonecrosis (bis-phossy jaw): is this phossy jaw of the 21st century? **J Oral Maxillofac Surg**. 2005 May;63(5):682-9. doi: 10.1016/j.joms.2005.01.010.
- HOEFERT S, EUFINGER H. Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J Oral Maxillofac Surg**. 2011;69:362-380.
- HUSSAIN T et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxid Med Cell Longev**. 2016;2016:7432797. doi: 10.1155/2016/7432797.
- KAVANAGH KL et al. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006;103(20):7829-34.
- KHAN AA et al. 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.
- KRESNOADI U et al. The potential of natural propolis extract combined with bovine bone graft in increasing heat shock protein 70 and osteocalcin on socket preservation. **Eur J Dent**. 2020 Feb;14(1):31-37. doi: 10.1055/s-0040-1701921.
- KRESNOADI U, LUNARDHI LC, AGUSTONO B. Propolis extract and bovine bone graft combination in the expression of VEGF and FGF2 on the preservation of post extraction socket. **J Indian Prosthodont Soc**. 2020 Oct-Dec;20(4):417-423. doi: 10.4103/jips.jips_106_20.
- KRESNOADI U, WIDJAJA J, LAKSONO H. Ethanol extract of propolis-bovine bone graft combination as a prospective candidate for socket preservation: Enhancing BMP7 and decreasing NFATc1. **Saudi Dent J**. 2021 Dec;33(8):1055-1062. doi: 10.1016/j.sdentj.2021.05.003. Epub 2021 May 27.
- KUCHARZEWSKI M et al. Stan Scheller: The Forerunner of Clinical Studies on Using Propolis for Poor and Chronic Nonhealing Wounds. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2013.
- KURAMOTO H et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induces VEGF Expression and Production in Rat Odontoblastic Cells. **Biomed Res Int**. 2019 Dec 20;2019:5390720. doi: 10.1155/2019/5390720.

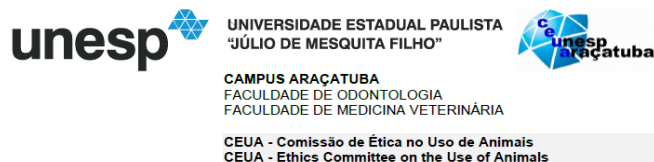
- LIMA LDC et al. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. **BMC Complement Altern Med.** 2014;14:177. doi: 10.1186/1472-6882-14-177.
- LIN T-H et al. NF- κ B as a therapeutic target in inflammatory-associated bone diseases. **Adv Protein Chem Struct Biol.** 2017;107:117-154. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.11.002.
- LOPES-ROCHA R et al. Effect of topical propolis and dexamethasone on the healing of oral surgical wounds. **Wound Healing Southern Africa.** 2012;5(1):25-30.
- LÓPEZ E, LESTON J, LÓPEZ JORNET P. Epigallocatechin-3-gallate reduces damage to osteoblast-like cells treated with Zoledronic acid. **Arch Oral Biol.** 2018 Oct;94:27-32. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.06.018.
- LOPEZ-JORNET P et al. Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: A study of the changes in the jaws. **J Oral Maxillofac Surg.** 2011;69:2488-2493.
- LUCKMAN SP et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. **J. Bone Miner. Res.** 1998;13(4):581-589.
- MAGRO-FILHO O, DE CARVALHO AC. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **J Nihon Univ Sch Dent.** 1990;32(1):4-13.
- MAGRO-FILHO O, DE CARVALHO AC. Topical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. Cytological and clinical evaluation. **J Nihon Univ Sch Dent.** 1994;36(2):102-11.
- MANZANO-MORENO FJ et al. Bisphosphonate Modulation of the Gene Expression of Different Markers Involved in Osteoblast Physiology: Possible Implications in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Int J Med Sci.** 2018 Feb 12;15(4):359-367. doi: 10.7150/ijms.22627.
- MANZOOR MF et al. Novel extraction, rapid assessment and bioavailability improvement of quercetin: A review. **Ultrason Sonochem.** 2021 Oct;78:105686. doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105686.
- MARTINS LHI et al. Frequency of osteonecrosis in bisphosphonate users submitted to dental procedures: A systematic review. **Oral Dis.** 2021 Aug 17. doi: 10.1111/odi.14003.
- MARX RE et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg.** 2005 Nov;63(11):1567-75. doi: 10.1016/j.joms.2005.07.010.
- 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.
- MATSUMOTO A et al. Primary wound closure after tooth extraction for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients under denosumab. **Clin Oral Investig.** 2017 Jan;21(1):127-134. doi: 10.1007/s00784-016-1762-y.
- MEIMANDI-PARIZI A et al. Propolis extract a new reinforcement material in improving bone healing: An in vivo study. **Int J Surg.** 2018 Aug;56:94-101. doi: 10.1016/j.ijvsu.2018.06.006.
- MIGLIORATI CA, BRENNAN MT, PETERSON DE. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. **J Natl Cancer Inst Monogr.** 2019 Aug 1;2019(53):lgz009. doi: 10.1093/jncimonographs/lgz009.
- MIGLIORATI CA. Bisphosphonate-associated oral osteonecrosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2005 Feb;99(2):135. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.10.001.
- MORAWIEC T et al. The Assessment of Oral Microflora Exposed to 3% Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis Preparation Used for Hygiene Maintenance following Minor Oral Surgeries. **Biomed Res Int.** 2015.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press.
- NIE J et al. Caffeic acid phenethyl ester (propolis extract) ameliorates insulin resistance by inhibiting jnk and nf- κ b inflammatory pathways in diabetic mice and hepg2 cell models. **J Agric Food Chem.** 2017 Oct 18;65(41):9041-9053. doi: 10.1021/acs.jafc.7b02880.

- PABST AM et al. The influence of geranylgeraniol on human oral keratinocytes after bisphosphonate treatment: An in vitro study. **J Craniomaxillofac Surg.** 2015 Jun;43(5):688-95. doi: 10.1016/j.jcms.2015.03.014.
- PAHLAVANI N et al. Molecular and cellular mechanisms of the effects of Propolis in inflammation, oxidative stress and glycemic control in chronic diseases. **Nutr Metab (Lond).** 2020 Aug 12;17:65. doi: 10.1186/s12986-020-00485-5.
- PASUPULETI VR et al. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. **Oxid Med Cell Longev.** 2017;2017:1259510. doi: 10.1155/2017/1259510.
- PATNTIRAPONG S et al. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. **J Oral Pathol Med.** 2012 Oct;41(9):713-20. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01154.x.
- PORTO AS, ALMEIDA IV, VICENTINI VEP. Nanoemulsions formulated for topical use: a study of synthesis and toxicity. **Revista Fitos.** 2020; 14(4): 513-527. doi: 10.17648/2446-4775.2020.1060.
- QU X et al. Determination of the molecular mechanism by which macrophages and $\gamma\delta$ -T cells contribute to ZOL-induced ONJ. **Aging.** 2020;12(20):20743-52. doi: 10.18632/aging.104006.
- RAHAYU RP et al. Combinations of propolis and Ca(OH)₂ in dental pulp capping treatment for the stimulation of reparative dentin formation in a rat model. **F1000Res.** 2020 Apr 29;9:308. doi: 10.12688/f1000research.22409.1.
- ROGERS MJ et al. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone.** 2011 Jul;49(1):34-41. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008.
- RUGGIERO SL et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. **J Oral Maxillofac Surg.** 2022 May;80(5):920-943. doi: 10.1016/j.joms.2022.02.008.
- RUGGIERO SL et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **J Oral Maxillofac Surg.** 2004 May;62(5):527-34. doi: 10.1016/j.joms.2004.02.004.
- RUGGIERO SL et al. Practical guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. **J Oncol Pract.** 2006 Jan;2(1):7-14. doi: 10.1200/JOP.2006.2.1.7.
- RUGGIERO SL. Guidelines for the diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Clin Cases Miner Bone Metab.** 2007 Jan;4(1):37-42.
- RUSSELL RG et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. **J Bone Miner Res.** 1999 Oct;14 Suppl 2:53-65. doi: 10.1002/jbmr.5650140212.
- RUSSELL RG. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone.** 2011 Jul;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.
- SANNA G et al. Jaw avascular bone necrosis associated with long-term use of biphosphonates. **Ann Oncol.** 2005 Jul;16(7):1207-8. doi: 10.1093/annonc/mdi206.
- SANTOS VR et al. Efficacy of Brazilian Propolis Gel for the Management of Denture Stomatitis: a Pilot Study. **Phytother. Res.** 2008;22:1544 –47.
- SEHN E et al. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Anal Chim Acta.** 2009;635(1):115-20.
- SFORCIN JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytother Res.** 2016;30(6):894-905.
- SFORCIN JM. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol.** 2007 Aug 15;113(1):1-14. doi: 10.1016/j.jep.2007.05.012
- SOMSANITH N et al. Enhancing of osseointegration with propolis-loaded tio₂ nanotubes in rat mandible for dental implants. **Materials (Basel).** 2018 Jan 1;11(1):61. doi: 10.3390/ma11010061.

- STATKIEVICZ C et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. **J. Photochem. Photobiol. B.** 2018;184:7-17.
- SZLISZKA E et al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2013;2013:976415. doi: 10.1155/2013/976415.
- TOKER H et al. A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.** 2008;79(6):1089-94.
- TORO LF et al. Application of Autologous Platelet-Rich Plasma on Tooth Extraction Site Prevents Occurrence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws in Rats. **Sci Rep.** 2019 Jan 10;9(1):22. doi: 10.1038/s41598-018-37063-y.
- VANNUCCHI AM et al. Osteonecrosis of the jaw associated with zoledronate therapy in a patient with multiple myeloma. **Br J Haematol.** 2005 Mar;128(6):738. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05382.x.
- VIOLA A et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Front Immunol.** 2019 Jul 3;10:1462. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462.
- WALTER C et al. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. **Clin Oral Investig.** 2010 Feb;14(1):35-41. doi: 10.1007/s00784-009-0266-4.
- WEHRHAN F et al. Macrophage and osteoclast polarization in bisphosphonate associated necrosis and osteoradionecrosis. **J Craniomaxillofac Surg.** 2017 Jun;45(6):944-953. doi: 10.1016/j.jcms.2017.02.023.
- WEST AP et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature.** 2011 Apr 28;472(7344):476-80. doi: 10.1038/nature09973.
- WILLIAMS DW et al. Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and anti-receptor activator of NF- κ B ligand antibody in mice. **Am J Pathol.** 2014 Nov;184(11):3084-93. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.010.
- WOOLTORTON E. Patients receiving intravenous bisphosphonates should avoid invasive dental procedures. **CMAJ.** 2005 Jun 21;172(13):1684. doi: 10.1503/cmaj.050640.
- XUAN H et al. Anti-inflammatory effects of Chinese propolis in lipopolysaccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells by suppressing autophagy and MAPK/NF- κ B signaling pathway. **Inflammopharmacology.** 2019 Jun;27(3):561-571. doi: 10.1007/s10787-018-0533-6.
- YAROM N et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: MASCC/ISOO/ASCO Clinical Practice Guideline. **J Clin Oncol.** 2019 Sep 1;37(25):2270-2290. doi: 10.1200/JCO.19.01186.
- ZHANG L et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clin Pharmacol Ther.** 2008;83(5):761-9.
- ZHANG Q et al. IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Clin Cancer Res.** 2013 Jun 15;19(12):3176-88. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0042.
- ZHANG R, ZHANG Z, McCLEMENTS DJ. Nanoemulsions: An emerging platform for increasing the efficacy of nutraceuticals in foods. **Colloids Surf B Biointerfaces.** 2020 Oct;194:111202. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111202.
- ZHANG W et al. The Role of the Immune Response in the Development of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Front Immunol.** 2021 Feb 25;12:606043. doi: 10.3389/fimmu.2021.606043.
- ZHU W et al. 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.
- ZOHERY AA et al. Egyptian propolis compared to nanohydroxyapatite graft in the treatment of Class II furcation defects in dogs. **J Periodontol.** 2018 Nov;89(11):1340-1350. doi: 10.1002/JPER.17-0685. Epub 2018 Sep 4.

Anexo 1

Protocolo de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do efeito do tratamento local com nanopartículas de própolis no sítio de extração dental de ratas que apresentam os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa", Processo FOA nº 00399-2020, sob responsabilidade de Edilson Ervolino apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Outubro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Outubro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Novembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the effect of the local treatment with propolis nanoparticle in the dental sockets of rats with the major risk factors for medication related osteonecrosis of the jaws", Protocol FOA nº 00399-2020, under the supervision of Edilson Ervolino presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 02, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 02, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 02, 2022.


Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br