



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Laís Medeiros Cardoso

**Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases
da matriz em modelo *in vitro***

Araraquara

2024



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Laís Medeiros Cardoso

Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo *in vitro*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso

Araraquara

2024

C268b Cardoso, Laís Medeiros
Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo in vitro / Laís Medeiros Cardoso. -- Araraquara, 2024
62 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Fernanda Gonçalves Basso

1. Fibroblastos. 2. Osteoblastos. 3. Ácido zoledrônico. 4. Implantes dentários. 5. Metaloproteinases da matriz. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Laís Medeiros Cardoso

Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo *in vitro*

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso

2º examinador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

3º examinador: Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto

4º examinador: Prof^a. Dr^a. Telma Blanca Lombardo Bedran

Araraquara, 03 de junho de 2024.

DADOS CURRICULARES

Laís Medeiros Cardoso

NASCIMENTO: 21 de janeiro de 1994, Matão, São Paulo.

FILIAÇÃO: Susana Maria de Medeiros
Edson Wilson Cardoso

2012/2016: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2017/2019: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Área de Concentração em Prótese) – Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2019/2024: Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Concentração em Reabilitação Oral) – Nível Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2022/2023: Doutorado Sanduíche na University of Michigan/School of Dentistry (USA)

Dedico este trabalho à minha família que esteve presente em todos os momentos,
me apoiando e inspirando.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo presente da vida e por todas as oportunidades que me foram dadas.

À minha **mãe Susana**, que sempre me guiou e inspirou nas escolhas de minha vida. Obrigada pelo apoio incondicional e por acreditar nos meus sonhos.

À minha **vó Maria Aparecida** e **irmã Beatriz**, pela força, carinho e amparo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu **pai Edson**, que me apoiou durante essa jornada com carinho.

À minha orientadora **Profª. Drª. Fernanda Gonçalves Basso**, pela paciência, confiança, incentivo, amizade e ensinamentos, contribuindo para meu crescimento profissional. Muito obrigada por me apresentar em 2013 o universo da pesquisa científica e estar presente em minha vida desde então, sendo um exemplo admirável de pessoa, pesquisadora e professora.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** e à **Profª. Drª. Josimeri Hebling**, por todo o apoio profissional, pelos ensinamentos, orientação e paciência.

À **Profª. Drª. Taisa Nogueira Pansani**, pela dedicação, inspiração, amizade e disposição em sempre me ajudar durante todos esses anos.

Ao **Prof. Dr. Marco Cícero Bottino**, por me receber e acolher durante o período de Doutorado sanduíche na University of Michigan, seu apoio e orientação foram essenciais para o meu crescimento profissional e para o desenvolvimento de um trabalho inovador. Essa experiência internacional contribuiu imensamente para meu desenvolvimento como pesquisadora.

Aos meus amigos do Doutorado sanduíche na University of Michigan, que tornaram a jornada mais fácil e leve, especialmente **Abdel, Ana Beatriz, Carolina, Caroline, Gabriel, Luan e Renan**.

Às minhas amigas **Mariely e Ana Clara**, pela amizade de longa data e apoio durante o Doutorado.

Ao **Julio**, pelo apoio e incentivo durante a realização do Doutorado.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, nas pessoas da atual Diretora **Prof^a. Dr^a. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia** e Vice-diretora **Prof^a. Dr^a. Elaine Pereira da Silva Tagliaferro**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representada pelo Coordenador **Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri** e pela Vice-coordenadora **Prof^a. Dr^a Morgana Rodrigues Guimarães-Stabili**.

Aos **Professores** do Programa de Odontologia (Área de Concentração em Reabilitação Oral) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pelos ensinamentos e experiências vividas.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, **Alessandra, Cristiano e José Alexandre** por serem sempre pacientes e prestativos.

À todos os funcionários da **Biblioteca**, pela atenção e revisão desta dissertação.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/11211-6 Auxílio Pesquisa; 2019/16886-4 Bolsa Doutorado; 22/03788-7 Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - Doutorado), pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À **CAPES**: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo financiamento à esta pesquisa (CNPq 302108/2019-0 – PQ2).

A todos, que de alguma maneira contribuíram para a conquista dessa etapa em minha vida, muito obrigada.

*“It is good to love many things, for therein lies true strength;
whosoever loves much, performs and can accomplish much, and what
is done in love is well done.”*

*Vincent van Gogh**

* Van Gogh V. The complete letters of Vincent van Gogh. 2nd edition. Connecticut/USA: New York Graphic Society; 1959.

Cardoso LM. Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo *in vitro* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

O uso de bisfosfonatos (BFs) é indicado para o tratamento de doenças ósseas neoplásicas e metabólicas, controlando a reabsorção do tecido ósseo. Esses medicamentos apresentam alta capacidade de adesão aos tecidos mineralizados e, a partir de um evento traumático e/ou inflamatório, podem ser liberados. A instalação de implantes dentais osseointegrados em pacientes em tratamento com BF é controversa, pois a indução de um evento traumático no local pode desencadear áreas de osteonecrose. A super-expressão de enzimas metaloproteinases da matriz (MMPs) por células da mucosa oral e osteoblastos em contato com bisfosfonatos, também pode interferir negativamente na osseointegração e formação do selamento biológico dos implantes. Assim, a modulação da atividade das MMPs poderia favorecer tais eventos teciduais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de dois inibidores de MMPs – Proantocianidinas (PA) (extrato natural da semente de uva *Vitis vinífera*) e Naringenina (NA) (sintética), no controle da síntese e atividade dessas enzimas por fibroblastos gengivais humanos (HGF) e osteoblastos (Ob; Saos-2) cultivados sobre superfícies de titânio e tratados com o BF ácido zoledrônico (AZ). Discos de titânio foram individualmente acondicionados em placas de cultura de células, e sobre estes, foram cultivados HGF ou Ob em meio de cultura DMEM + 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com concentração não citotóxica de PA ou NA, previamente definida, por 24 horas, seguido da adição do AZ (5 µM) em DMEM sem SFB. Após diferentes períodos de contato, foram avaliadas a adesão e proliferação celular (microscopia de fluorescência direta), síntese de MMP-2 e MMP-9, bem como dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP)-1 e TIMP-2 (ELISA) e atividade gelatinolítica (zimografia *in situ*). A capacidade de mineralização pelos Ob foi avaliada por meio da atividade de fosfatase alcalina (ALP) após 7 dias de cultura. Os dados foram analisados pelos testes one-way ANOVA e Tukey post-hoc ($\alpha = 0,05$). O tratamento com AZ prejudicou a adesão e proliferação celular, além de aumentar a síntese ($p < 0,05$) e a atividade das MMPs; o pré-tratamento com os flavonoides controlou os efeitos gelatinolíticos induzidos pelo AZ, regulando negativamente a síntese e atividade de MMPs ($p < 0,05$) por HGF e Ob, além de favorecer a adesão e proliferação dessas células. Para HGF, o pré-tratamento com NA e PA não regulou positivamente a síntese de TIMP após exposição ao AZ ($p > 0,05$); para Ob, o TIMP-2 foi regulada positivamente ($p < 0,05$) pelos flavonoides, seguido de exposição ao AZ. A atividade de ALP em Ob foi marcadamente diminuída pelo AZ e o pré-tratamento com NA modulou levemente esse efeito ($p < 0,05$). Portanto, o pré-tratamento com os flavonoides investigados promove resultados interessantes na modulação dos efeitos deletérios do AZ, favorecendo a adesão e proliferação celular, regulando negativamente a síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9 por HGF e Ob e regulando positivamente o TIMP-2 por Ob.

Palavras-chave: Fibroblastos. Osteoblastos. Ácido zoledrônico. Implantes dentários. Metaloproteinases da matriz. Flavonoides.

Cardoso LM. Bisphosphonates and implantodontology: effect of matrix metalloproteinases inhibitors in *in vitro* model [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BPs) are used to treat neoplastic and metabolic bone diseases, controlling bone tissue resorption. These medications have high adhesion capacity to mineralized tissues and, from a traumatic and/or inflammatory event, can be released. Osseointegrated dental implants installation in patients undergoing BP treatment is uncertain, since a local traumatic event induction may trigger areas of osteonecrosis. Overexpression of matrix metalloproteinases (MMPs) enzymes by oral mucosal cells and osteoblasts in contact with bisphosphonates may also negatively interfere with osseointegration and biological sealing of dental implants. Thus, modulation of MMPs activity could improve such tissue events. The aim of this study was to evaluate the potential of two MMPs inhibitors – Proanthocyanidins (PA) (natural grape seed extract from *Vitis vinifera*) and Naringenin (NA) (synthetic), on controlling of these enzymes synthesis and activity by human gingival fibroblasts (HGF) and osteoblasts (Ob; Saos-2) seeded on titanium surfaces and treated with zoledronic acid (ZA) BP. Titanium discs were individually placed on cell culture plates, and HGF or Ob were seeded on the discs in DMEM culture medium + 10% fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. Then, the cells were treated with non-cytotoxic concentration of PA and NA, previously defined, for 24 hours, followed by the addition of ZA (5 μ M) in DMEM serum free. After different time-points of ZA contact, cells adhesion and proliferation (direct fluorescence microscopy), synthesis of MMP-2 and MMP-9, as well as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 (ELISA), and gelatinolytic activity (*in situ* zymography) by HGF and Ob were evaluated. Ob mineralization capacity was assessed by alkaline phosphatase (ALP) activity after 7 days of culture. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey post-hoc tests ($\alpha = 0.05$). The treatment with ZA impaired cell adhesion and proliferation, as well as increased the synthesis ($p < 0.05$) and activity of MMPs; the pre-treatment with flavonoids controlled the gelatinolytic effects induced by ZA, negatively regulating the synthesis and activity of MMPs ($p < 0.05$) by HGF and Ob, moreover, cells adhesion and proliferation was favored by flavonoids pre-treatment. For HGF, the pre-treatment with NA and PA did not upregulate TIMP synthesis after exposure to ZA ($p > 0.05$); for Ob, TIMP-2 was upregulated ($p < 0.05$) by flavonoids, followed by exposure to ZA. ALP activity in Ob was markedly decreased by ZA and NA pre-treatment slightly modulated this effect ($p < 0.05$). Therefore, the pre-treatment with the investigated flavonoids promotes interesting results in modulating the deleterious effects of ZA, favoring cell adhesion and proliferation, downregulating the synthesis and activity of MMP-2 and MMP-9 by HGF and Ob and upregulating TIMP- 2 by Ob.

Keywords: Fibroblasts. Osteoblasts. Zoledronic acid. Dental implants. Matrix metalloproteinases. Flavonoids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 PROPOSIÇÃO.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
4 MATERIAL E MÉTODO.....	22
4.1 Preparo de discos de titânio (Ti) e padronização de rugosidade para modelo <i>in vitro</i> de superfície de implante dentário.....	22
4.2 Cultura de fibroblastos de gengiva humana e osteoblastos.....	22
4.3 Modelo <i>in vitro</i> de superfície de implante dentário.....	23
4.4 Análise da viabilidade celular para seleção de concentração não-citotóxica de NA e PA.....	24
4.5 Design experimental.....	25
4.6 Análise da síntese de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.....	26
4.7 Análise da atividade gelatinolítica.....	28
4.8 Análise da adesão celular.....	28
4.9 Análise da proliferação celular.....	29
4.10 Análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	29
4.11 Análise estatística.....	29
5 RESULTADO.....	31
5.1 Seleção de concentração não-citotóxica de NA e PA sobre cultura de osteoblastos.....	31
5.2 Seleção do tempo de avaliação para as os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).....	32
5.3 Análise da rugosidade superficial dos discos de Ti.....	33
5.4 Efeito do pré-tratamento com NA e PA na síntese de MMPs e TIMPs.....	34
5.5 Análise da atividade gelatinolítica.....	37
5.6 Análise da adesão celular.....	38
5.7 Análise da proliferação celular.....	40

5.8 Análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	41
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A	59

1 INTRODUÇÃO

O ácido zoledrônico (AZ) é um bisfosfonato (BF) de uso intravenoso com potente ação farmacológica e afinidade aos ossos, especialmente aos ossos maxilares, onde um alto metabolismo ósseo é observado¹. Esse fármaco é recomendado para o tratamento da osteoporose, doença de Paget, tumor de célula gigante ósseo, hipercalcemia induzida por tumor, prevenção de metástases ósseas de tumores malignos e controle de mieloma múltiplo².

Dentre todos os BFs, o AZ apresenta a maior afinidade ao tecido ósseo e é comumente associado ao desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares associada à medicamentos (MRONJ)³⁻⁵. Essa condição patológica pode ser caracterizada clinicamente como osso exposto ou osso que pode ser sondado através de fístula(s) intraoral ou extraoral na região maxilofacial por mais de oito semanas, sem histórico de radioterapia nos maxilares ou doença metastática nos maxilares, associado a um tratamento atual ou anterior com agentes antirreabsortivos (como BFs) isoladamente ou em combinação com medicamentos imunomoduladores ou antiangiogênicos⁵. Embora o primeiro caso da MRONJ relacionada à BF tenha sido relatado em 2003⁶, a patogênese desta condição permanece incerta.

Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da MRONJ incluem o tipo de BF utilizado (potência e via de administração), duração do tratamento, fatores locais (presença de infecção ou inflamação), cirurgia dentoalveolar (extração dentária ou colocação de implante dentário) e comorbidades sistêmicas^{5,7}. Assim, a indicação de colocação de implantes dentários osseointegrados em pacientes que usam AZ permanece controversa, pois a administração intravenosa desse BF pode aumentar as chances de um paciente desenvolver MRONJ desencadeada pela colocação de implantes^{7,8}. Além disso, foi demonstrado anteriormente que pacientes com implantes dentários osseointegrados que iniciam terapia intravenosa com BFs apresentam risco aumentado de desenvolver MRONJ⁹.

Consequentemente, pacientes com histórico de regime de BFs, independentemente de ser utilizado para tratamento de osteoporose ou malignidade óssea, apresentam risco de desenvolvimento de MRONJ após a colocação de implantes dentários⁸. Outro fato importante a ser considerado é a ausência de biomarcadores validados para indicar ou não a instalação de implantes em pacientes

sob regime de BFs, o que significa que nenhum marcador de remodelação óssea pode prever o risco de MRONJ⁵.

Embora o efeito do AZ nos osteoclastos tenha sido bem estabelecido, os seus efeitos em outros tipos de células ainda não foram totalmente elucidados. Estudos demonstraram que esse fármaco causa efeitos citotóxicos em osteoblastos, diminuindo a capacidade de mineralização dessas células, que estão diretamente envolvidas nos processos de síntese e mineralização da matriz óssea, além de efeitos inibitórios na diferenciação osteoblástica, o que pode favorecer o desenvolvimento de MRONJ^{10,11}. O papel dos tecidos moles na patogênese da MRONJ também foi avaliado, uma vez que as principais características desta condição são a perda de cobertura dos tecidos moles e exposição óssea¹². Assim, a toxicidade sobre tecidos moles dos BFs tem sido indicada como um possível fator capaz de favorecer a MRONJ.

Outrossim, investigações demonstraram que o AZ pode aumentar os níveis de metaloproteinases da matriz (MMPs) por fibroblastos gengivais em um modelo *in vitro* de superfície de implante dentário^{13,14}, em osso alveolar em um modelo *in vivo*¹⁵ e na saliva de pacientes que desenvolveram MRONJ¹⁶. Dessa forma, o aumento da síntese e atividade de MMPs pode contribuir para o estabelecimento de MRONJ em pacientes sob terapia com AZ. As MMPs são enzimas responsáveis pela degradação e renovação da maioria dos componentes da matriz extracelular (MEC), apresentando a capacidade de fragmentar colágenos fibrilares em condições fisiológicas normais; entretanto, em condições patológicas, como doenças periodontais, o desequilíbrio entre as MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs) aumenta a degradação da MEC e a destruição tecidual¹⁷. No tecido periodontal, os TIMPs não são suficientes para regular negativamente as MMPs patologicamente elevadas¹⁸; assim, diferentes estratégias para regulação de MMPs estão sendo investigadas, como o uso de flavonoides.

Os flavonoides são compostos bioativos que compõem uma importante classe de metabólitos secundários vegetais de baixo peso molecular, apresentando estrutura polifenólica e ocorrendo amplamente em frutas, vegetais, ervas, bebidas, especiarias e óleos¹⁹. Entre os diferentes flavonoides, o potencial da naringenina (NA) e das proantocianidinas (PA) na regulação das MMPs foi demonstrado em modelos pré-clínicos²⁰⁻²⁵, bem como seu potencial para promover aumento da viabilidade celular e modulação de mediadores pró-inflamatórios por fibroblastos gengivais e

queratinócitos orais^{24,25}. NA e PA são encontrados em diferentes fontes naturais e dependendo de sua origem, condições de cultivo, clima e protocolo de extração, esses flavonoides podem ter formulações diferentes, resultando em efeitos terapêuticos variáveis, o que pode resultar em resultados não padronizados²⁶. Assim, flavonoides cujas variáveis sintéticas podem ser obtidas comercialmente, como a NA, são candidatos interessantes para uso em análises biológicas.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos individuais do pré-tratamento com PA natural, do extrato da semente de uva da espécie *Vitis vinifera*, e NA sintética na adesão e proliferação celular, síntese de MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B), TIMP-1 e TIMP-2, atividade gelatinolítica de MMPs por fibroblastos gengivais e osteoblastos humanos e atividade de fosfatase alcalina (ALP) por osteoblastos expostos ao AZ em um modelo *in vitro* de superfície de implante dentário.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito do pré-tratamento com dois tipos de inibidores de MMPs, as proantocianidinas (PA), isoladas da semente de uva, e a naringenina (NA), obtida sinteticamente, sobre a viabilidade e proliferação celular, síntese e atividade de MMPs e TIMPs por fibroblastos de gengiva humana e osteoblastos, bem como a capacidade de mineralização de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio (Ti) e expostos ou não ao AZ.

Objetivos Específicos

- a) Definir concentração de NA e PA que não apresentasse efeito citotóxico sobre fibroblastos e osteoblastos;
- b) Avaliar o efeito do pré-tratamento com NA e PA, em concentração não-citotóxica, sobre fibroblastos e osteoblastos cultivados sobre superfícies de Ti e tratados ou não com AZ sobre a:
 - Síntese de MMP-2, MMP-9 e inibidores teciduais de MMPs (TIMP)-1 e TIMP-2;
 - Atividade gelatinolítica;
 - Adesão e proliferação celular;
 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) relacionada à capacidade de mineralização dos osteoblastos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os bisfosfonatos (BFs) são fármacos análogos do pirofosfato inorgânico e amplamente empregados no tratamento de distúrbios metabólicos ósseos, como a osteoporose, além de tumores ósseos e metástases ósseas de tumores de mama e próstata²⁷. O ácido zoledrônico (AZ) é um BF intravenoso que contém nitrogênio em sua estrutura química e apresenta um mecanismo de ação associado à inibição da via do mavalonato^{3,5}. O bloqueio desta via impede que determinadas proteínas atuem nos locais adequados das células, levando a mudanças em muitos processos celulares, incluindo organização do citoesqueleto, tráfego vesicular e apoptose³; portanto, esse medicamento inibe a reabsorção óssea por interferir na osteoclastogênese, além de induzir a apoptose de osteoclastos maduros²⁸⁻³⁰.

O AZ é indicado para o tratamento da osteoporose, doença de Paget, tumor ósseo de células gigantes, hipercalcemia induzida por tumores, prevenção de metástases ósseas a partir de malignidades e controle do mieloma múltiplo². O AZ apresenta alta potência reabsorviva, alta biodisponibilidade (por ser administrado por via intravenosa) e quando se liga à hidroxiapatita do tecido ósseo, pode levar mais de 10 anos para ser metabolizado e, conseqüentemente, excretado^{3,4}. Além disso, dentre todos os BFs, o AZ é o que possui a maior afinidade de ligação ao tecido ósseo e é comumente associado à osteonecrose dos maxilares relacionada à medicamentos (MRONJ)³⁻⁵.

Em geral, os BFs, incluindo o AZ, afetam a remodelação óssea, a angiogênese, o processo infeccioso e inflamatório, bem como os tecidos moles, e esses efeitos podem contribuir para o desenvolvimento da MRONJ após o desencadeamento inicial da lesão⁵. A principal característica da MRONJ é a perda do recobrimento mucoso e exposição óssea¹², assim, os efeitos do AZ sobre as células da mucosa oral, como queratinócitos e fibroblastos, têm sido investigados atualmente.

A etiopatogenia da MRONJ, apesar de amplamente estudada, ainda não está completamente elucidada^{28,31-33}. Uma das hipóteses para tal lesão reside no fato de que os BFs não apresentam especificidade por células clásticas, podendo afetar negativamente outras células, como queratinócitos, fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais. Como resultado, entre outros efeitos, ocorre a redução da proliferação e indução de apoptose nestas células^{10,34-36}.

Sabe-se que diferentes fatores, como o tipo de BF utilizado (nitrogenado ou não-nitrogenado), estão relacionados ao surgimento destas áreas de necrose óssea³³. A presença do radical nitrogenado na molécula de pirofosfato confere a estas drogas maior adesão aos cristais de hidroxiapatita dos tecidos mineralizados, o que aumenta a potência de tais medicamentos³⁷. Além do tipo de BF, a via de administração, a qual pode ser oral ou intravenosa, também está relacionada ao desenvolvimento da MRONJ. Já foi demonstrado que a concentração de BFs nos tecidos orais é maior para aqueles administrados por via intravenosa, pois permanecem disponíveis para absorção pelos tecidos mineralizados a partir de sua administração, sem necessidade de metabolização³⁷. A dose, frequência e tempo de tratamento com BFs, bem como fatores locais, tais como a presença de focos de infecção, processos inflamatórios e traumas, também são importantes no desenvolvimento e manutenção da MRONJ^{12,28,31,33}.

Estudos *in vitro* demonstraram que a aplicação do AZ em diferentes concentrações consideradas clinicamente relevantes, definidas por meio de quantificação de níveis de AZ na saliva e tecido ósseo³⁸, apresentam toxicidade, isto é, redução da viabilidade das células da mucosa oral, a qual pode estar relacionada com indução de morte celular por apoptose em fibroblastos^{3,36,39-43}, que por sua vez é associada à inibição da via do mavalonato⁴⁴. Também tem sido observado aumento significativo na apoptose de queratinócitos induzido pelo AZ^{39,40}, porém não há consenso na literatura sobre esse efeito³.

Outro resultado causado pela exposição ao AZ é a redução da proliferação de células da mucosa oral^{39,41,42}, o que indica um mecanismo pelo qual esse BF impede a cicatrização completa da mucosa e contribui para a exposição prolongada de osso necrótico em pacientes com MRONJ, uma vez que a proliferação celular é fundamental para a cicatrização de feridas e restauração da barreira mucosa³. Esta resposta também pode estar relacionada à inibição da via do mavalonato pelo AZ, a qual é associada à proliferação celular⁴⁵.

Em relação à migração celular, não há consenso na literatura de que o AZ possa afetar essa função em fibroblastos ou queratinócitos orais *in vitro*^{3,46}. Dessa forma, acredita-se que a re-epitalização deficiente da mucosa oral em pacientes com MRONJ possa estar ligada à uma redução da proliferação celular e citotoxicidade causada pelo AZ³.

Ainda, estudos *in vitro* que utilizaram modelo tridimensional da mucosa oral, demonstraram que o tratamento com AZ reduz a espessura epitelial, a atividade metabólica celular e a cicatrização de feridas^{41,47,48}. Portanto, esses efeitos podem comprometer a atividade celular da camada epitelial oral, especialmente sua taxa de renovação tecidual, aumentando o potencial de ruptura espontânea da mucosa, o que pode torná-la mais suscetível à danos e contribuir para a progressão da MRONJ^{3,41}.

Sugere-se que as áreas onde há uma mucosa oral delgada, como tórus palatino e cristas da maxila e mandíbula, são propensas ao desenvolvimento de MRONJ devido ao contato íntimo da mucosa ao osso subjacente, onde se deposita os BFs. Logo, esses fatores anatômicos apresentam potencial para exacerbar os efeitos tóxicos desses medicamentos, evidenciando o papel dos tecidos moles no desenvolvimento da MRONJ⁴⁹.

Em geral, o tratamento com AZ tem demonstrado efeitos negativos sobre osteoblastos e células da mucosa oral, incluindo aumento da apoptose e diminuição da proliferação celular, relacionada a uma cicatrização deficiente, bem como inflamação crônica e remodelação óssea alterada⁵⁰. Deste modo, a MRONJ apresenta uma fisiopatologia multifatorial e influenciada por diferentes processos celulares, relações anatômicas, histórico médico e odontológico dos pacientes e risco de infecção⁵⁰.

Considerando a ampla utilização destes medicamentos na população, principalmente acima de 60 anos de idade^{33,51}, outro problema também observado é o insucesso de implantes osseointegrados em pacientes submetidos à terapia com BFs⁵²⁻⁵⁴. Este insucesso pode estar diretamente relacionado com a agressão causada durante o procedimento operatório, tendo em vista que o trauma local pode atuar como fator promotor da liberação de BFs do tecido ósseo para a área operatória, impedindo a cicatrização e a remodelação óssea⁵⁵. Além disso, estudos *in vitro* apresentaram resultados negativos quando essas drogas foram aplicadas sobre osteoblastos e células da mucosa em cultura^{10,34-36,39,46,56,57}. Por outro lado, estudos clínicos demonstraram resultados diversos e contraditórios quanto à instalação de implantes osseointegrados em pacientes em tratamento com BFs, com resultados que variam desde o aumento da estabilidade dos implantes, uma vez que o tratamento com BFs influencia no metabolismo ósseo, resultando em um tecido ósseo mais rígido, entretanto, ausência de cicatrização local e perda dos implantes também foi observada nesses estudos^{52-54,58}.

Outras investigações *in vitro* demonstraram os efeitos deletérios do AZ sobre células da mucosa oral semeadas sobre discos de titânio^{13,14}. Sabe-se que a indicação da instalação de implantes dentários osseointegrados em pacientes sob regime de AZ ainda é controversa, pois regimes com BFs intravenosos podem aumentar as chances de desenvolvimento de MRONJ desencadeada pela instalação dos implantes⁷.

Um provável mecanismo associado à essas falhas pode estar relacionado ao aumento da síntese e atividade das enzimas metaloproteinases da matriz (MMPs) por fibroblastos gengivais¹³. As MMPs são responsáveis pela degradação e remodelação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e sua superexpressão pode favorecer uma desorganização exacerbada do tecido conjuntivo e cicatrização peri-implantar dificultada¹³. As MMPs são reguladas negativamente por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que controlam a proteólise da MEC; portanto, o equilíbrio entre MMPs e TIMPs é crítico para a remodelação ideal dos tecidos^{59,60}.

O selamento biológico de implantes também pode ser prejudicado pelo AZ por meio de uma adesão e metabolismo deficientes de queratinócitos e fibroblastos à superfície de titânio^{14,61}, visto que a obtenção de um selamento biológico de alta qualidade pela adesão de células da mucosa oral às superfícies dos implantes é fundamental para a manutenção dos componentes protéticos dos implantes, pois promove uma barreira física e imunológica, prevenindo a invasão bacteriana e proporcionando estética satisfatória à esses componentes⁶².

Estudos futuros são necessários para determinar os efeitos do AZ e de outros tipos de BF na fisiopatologia da MRONJ, para favorecer o desenvolvimento de tratamentos eficientes para o manejo desta condição. Entretanto, a regulação de MMPs e TIMPs pode ter um impacto benéfico no processo de reparo peri-implantar, indicando um alvo terapêutico, que pode ser utilizado para novas propostas de tratamento, como o uso de flavonoides.

Diferentes compostos apresentam atividade inibitória sobre enzimas classificadas como collagenases/gelatinases, tal como o grupo das MMPs. As antocianinas/antocianidinas, como as proantocianidinas (PA), são compostos fenólicos naturais (também denominados de flavanonas ou flavonoides) que podem ser amplamente encontrados no reino vegetal, principalmente em frutas (acerola, maçã, cranberry, blueberry), nozes (amêndoa), sementes (uva), árvores (pinheiro bravo), flores (flor de longan), folhas (chá-verde e salsinha) e legumes (feijão comum e ervilha)⁶³⁻⁶⁵. Estes compostos têm apresentado resultados positivos como agentes

antioxidantes e se caracterizam como potentes inibidores de MMPs. Estudos desenvolvidos nas últimas décadas demonstraram que os flavonoides são capazes de reduzir a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos e fibroblastos gengivais induzidos por LPS de periodontopatógenos^{64,66,67}, além de inibir a produção e atividade de MMPs^{64,68}.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que PA têm importantes atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e anti-apoptótica, resultando em maior sobrevivência celular, além de apresentarem efeitos benéficos na prevenção de várias doenças humanas, como o câncer, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, diabetes e doença periodontal⁶³⁻⁷⁰.

Também foi observado que PA são capazes de remover e destruir uma vasta gama de espécies de radicais livres, além de exibirem um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas contra a ocorrência de estresse oxidativo e formação de radicais livres, agindo, assim, como antioxidantes naturais que estão presentes na dieta humana⁶⁴. Um estudo demonstrou que o tratamento de fibroblastos de ratos com PA por apenas 1 minuto, acelerou a proliferação celular de maneira concentração-dependente, além de inibir significativamente a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio induzidas por peróxido de hidrogênio, sugerindo um efeito citoprotetor deste flavonoide nas células que sofreram estresse oxidativo⁶⁵. Além disso, foi demonstrado *in vitro*, que o tratamento de fibroblastos gengivais humanos com PA promove um aumento da viabilidade celular e diminuição da produção de MMP-2 e MMP-9, as quais foram estimuladas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em um modelo de exposição de tecido conjuntivo (ulceração)²⁵.

No entanto, os flavonoides podem apresentar diferentes formulações, dependendo da fonte, condição de cultivo, clima e forma de extração²⁶. Dentre os diversos flavonoides, a naringenina (NA) presente em frutas cítricas, como laranja, limão, tangerina, dentre outras, pode ser encontrada comercialmente em sua forma sintética, conferindo padronização deste composto, o qual apresenta efetividade na modulação da resposta inflamatória e na regulação da atividade de MMPs^{21,22,25}.

Estudos *in vitro* demonstraram que esse flavonoide cítrico é eficaz na modulação da resposta inflamatória e na regulação da atividade de MMPs^{21,22}. Também foi demonstrado que esse composto apresenta potencial anti-inflamatório pela redução significativa dos níveis de citocinas, como TNF- α e interleucina (IL)-6^{22,71}.

Os efeitos da NA no tecido ósseo também foram investigados e os resultados demonstraram que este flavonoide potencializa a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de rato, aumentando a atividade de ALP, bem como regulando positivamente a expressão de genes e proteínas osteogênicas⁷². Além disso, a NA apresenta efeitos na inibição da osteoclastogênese, indicando uma possibilidade significativa para o tratamento de doenças relacionadas à osteólise causadas pela formação e atividade excessiva de osteoclastos⁷³. Assim, a NA pode apresentar potencial terapêutico para doenças ósseas, como a osteoporose, e para a reparação de defeitos ósseos.

Portanto, o pré-tratamento das células do tecido peri-implantar com os flavonoides PA e NA, poderia modular a síntese e atividade de MMPs por fibroblastos e osteoblastos expostos ao AZ, diminuindo os efeitos negativos dessa droga e favorecendo eventos celulares relacionados ao selamento biológico e osseointegração.

4 MATERIAL E MÉTODO

O material e método empregado no presente estudo está detalhado a seguir.

4.1 Preparo de discos de titânio (Ti) e padronização de rugosidade para modelo *in vitro* de superfície de implante dentário

Foram obtidos discos de Ti usinados (grau IV; Realum Indústria e Comércio de Metais Puros e Ligas Ltda; São Paulo, SP, Brasil) com 8 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura, os quais foram submetidos ao polimento manual utilizando lixas d'água de granulação 400, 600 e 1200, para obtenção de rugosidade superficial padronizada¹³.

Para remover qualquer material orgânico aderido à superfície, os discos foram submetidos à limpeza em ultrassom (Ultrasonic 1440 Plus – 40 KHz, Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil), de acordo com o seguinte protocolo⁷⁴:

- a) Imersão por 15 minutos em acetona (Qhemis, Indaiatuba, SP, Brasil);
- b) Imersão por 15 minutos em água destilada;
- c) Imersão por 15 minutos em etanol 100% (Qhemis);
- d) Imersão por 15 minutos em água destilada;

Anteriormente ao cultivo celular, os discos foram avaliados quanto à rugosidade superficial (parâmetro Ra – rugosidade média) em microscópio confocal de materiais (OLYMPUS LEXT OLS4000, Tóquio, Japão) (n=6). Para maior confiabilidade da medida de rugosidade, 5 áreas lineares distintas (distância percorrida entre as áreas 1,5 mm) de cada disco foram avaliadas e a rugosidade de cada espécime foi determinada pela média das 5 áreas. A topografia dos discos de Ti também foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Inspect Scanning Electron Microscope—S50; FEI, Hillsboro, OR, EUA).

Portanto, após padronização, limpeza em ultrassom e análise da rugosidade superficial, os discos foram esterilizados em autoclave (submersos em água destilada) e, então, foi realizado o cultivo celular.

4.2 Cultura de fibroblastos de gengiva humana e osteoblastos

Os fibroblastos de gengiva humana (HGF) foram obtidos de um paciente jovem (22 anos) e saudável, não-fumante após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CAAE: 47390020.5.0000.5416) (Anexo A).

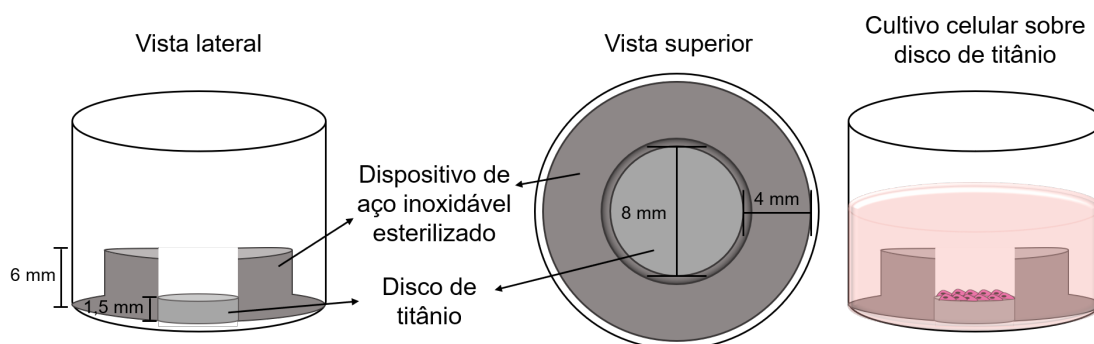
Um fragmento de tecido gengival foi obtido durante a extração de terceiros molares inclusos e a partir desse fragmento, as células foram isoladas pela técnica de digestão enzimática⁷⁵. Para tanto, o tecido foi incubado em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium – Gibco, Carlsbad, CA, EUA) sem soro fetal bovino (SFB – Gibco), contendo solução antibiótica/antimicótica (Gibco Antibiotic-Antimycotic – 10 000 units/mL de penicilina, 10 000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de Anfotericina B, Gibco) e 3 mg/mL de colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, EUA) por 24 horas em uma incubadora a 37°C e 5% CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Após este período, os fragmentos celulares foram transferidos para um tubo estéril, centrifugados, ressuspensos em meio DMEM completo (contendo solução antibiótica/antimicótica) + 10% de SFB e transferidos para um frasco de cultura celular de 75 cm² (Corning, New York, NY, EUA), até a obtenção de confluência de 80%. Os procedimentos de subcultivo celular foram realizados utilizando tripsina 0,25% (Gibco). As células foram mantidas em DMEM completo + 10% de SFB a 37°C e 5% CO₂ até o momento da realização dos experimentos. Células de passagens 2 a 6 foram utilizadas nesse estudo.

A linhagem osteoblástica humana Saos-2 (American Type Culture Collection – ATCC # HTB85) foi selecionada para o estudo. Esses osteoblastos (Ob) foram mantidos em DMEM completo (contendo solução antibiótica/antimicótica) + 10% de SFB em frasco de cultura de 75 cm² (Corning). Os procedimentos de subcultivo celular foram realizados utilizando tripsina-EDTA 0,25% (Gibco). Para a realização dos experimentos, os Ob foram cultivados da mesma forma como descrito anteriormente para os HGF.

4.3 Modelo *in vitro* de superfície de implante dentário

Para esse modelo, discos de Ti foram posicionados, individualmente, em placas de cultura de células de 24 compartimentos (TPP; Techno Plastic Products, Trasadingen, SH, Suíça), utilizando um dispositivo de aço inoxidável esterilizado para estabilizar e manter o disco na posição central do compartimento. Sobre o conjunto (disco + dispositivo) foi adicionado 1 mL de DMEM completo + 10% de SFB e foram cultivados 5 x 10⁴ células por disco (para HGF e Ob), seguido de incubação a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas (Fig. 1).

Figura 1 – Dispositivo circular de aço inoxidável utilizado para manter em posição central os discos de titânio em cada compartimento da placa de cultura de 24 poços



Fonte: Elaboração própria.

4.4 Análise da viabilidade celular para seleção de concentração não-citotóxica de NA e PA

Para os HGF, as concentrações de flavonoides (NA e PA) foram selecionadas com base em estudo anterior, no qual estas células foram submetidas ao contato com diferentes concentrações de NA e PA, sendo que a determinação das taxas de viabilidade celular demonstrou que a concentração de 10 µg/mL de ambos os compostos não causou efeitos citotóxicos sobre as células²⁵.

A análise da viabilidade celular foi utilizada para selecionar concentração não-citotóxica de NA (95% naringenina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, lot #BCBR3619) e PA (95% proantocianidinas, Shaanxi Sinuote Biotech Co. Ltd., Shaanxi, China, lot #CPTZ20130512) por meio do teste de prestoBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (n=12).

Para tanto, Ob foram cultivados em placas de 96 compartimentos (1×10^4 células/compartimento) (TPP) em DMEM completo + 10% SFB, por 24 horas. Os flavonoides utilizados foram obtidos na forma de pó, assim, uma solução estoque de NA e PA foi preparada individualmente dissolvendo 50 mg dos compostos em 1 mL de DMSO (Sigma-Aldrich, lot #SHBB3758V)²⁵, resultando em uma concentração de 5% (massa/volume). Dessa forma, diferentes concentrações foram obtidas diluindo a solução estoque de NA e PA em DMEM livre de SFB de acordo com os grupos estabelecidos na Tabela 1. As células foram tratadas (100 µL) com essas diferentes concentrações de NA e PA por 24 ou 48 horas. Para esta análise foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – Sigma) a 3% como controle positivo para toxicidade. Células tratadas com DMEM livre de SFB foram usadas como controle negativo.

O ensaio de prestoBlue avalia a viabilidade celular por meio da conversão do reagente resazurina em resorufina, que resulta em uma mudança de cor pronunciada, diretamente proporcional ao metabolismo mitocondrial. Portanto, após os períodos de avaliação, as células foram tratadas (100 µL) com solução de prestoBlue 10% em DMEM livre de SFB, incubadas por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂, seguido da determinação da intensidade de fluorescência da solução, por meio de fluorímetro (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader, Biotek, EUA), nos comprimentos de onda de 560/590 nm.

Tabela 1 - Grupos experimentais para determinação de concentração não-citotóxica de NA e PA (n=12)

Grupo	Tratamento	Concentração % (massa/volume)	Concentração µg/mL
C – Controle negativo	–	–	–
H ₂ O ₂ – Controle positivo para toxicidade	Peróxido de hidrogênio – H ₂ O ₂	3%	340.10 µg/mL
NA 100	Naringenina	0,01%	100 µg/mL
NA 50	Naringenina	0,005%	50 µg/mL
NA 10	Naringenina	0,001%	10 µg/mL
NA 5	Naringenina	0,0005%	5 µg/mL
NA 1	Naringenina	0,0001%	1 µg/mL
NA 0,5	Naringenina	0,00005%	0,5 µg/mL
PA 100	Proantocianidinas	0,01%	100 µg/mL
PA 50	Proantocianidinas	0,005%	50 µg/mL
PA 10	Proantocianidinas	0,001%	10 µg/mL
PA 5	Proantocianidinas	0,0005%	5 µg/mL
PA 1	Proantocianidinas	0,0001%	1 µg/mL
PA 0,5	Proantocianidinas	0,00005%	0,5 µg/mL

Fonte: Elaboração própria.

4.5 Delineamento experimental

Após determinação das concentrações não citotóxicas de NA e PA para HGF (10 µg/mL) e Ob (0,5 µg/mL), foi avaliado o potencial do pré-tratamento desses flavonoides na modulação dos efeitos gelatinolíticos induzidos pelo AZ.

Utilizando modelo *in vitro* de superfície de implante dentário^{13,14,76}, as células foram cultivadas individualmente (5x10⁴ células/disco) em DMEM completo + 10% SFB por 24 horas. Em seguida, HGF e Ob foram tratados separadamente com solução de NA e PA (1 mL) em DMEM livre de SFB, nas concentrações previamente definidas (10 µg/mL para HGF e 0,5 µg/mL para Ob), por 24 horas. Após esse período, as

células foram expostas ao AZ (Sigma-Aldrich) (5 μ M) (1 mL) ou ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; Sigma-Aldrich) (100 ng/mL) (1 mL) em DMEM livre de SFB, por diferentes períodos de contato. Os grupos experimentais estão descritos no Quadro 2.

A concentração de 5 μ M de AZ foi selecionada a partir de dados anteriores, que demonstraram os níveis orais (saliva e osso) destes medicamentos em pacientes que apresentam ou estão em risco de MRONJ³⁸. Além disso, essa concentração específica de AZ também foi utilizada em investigações anteriores^{13,14}. A citocina pró-inflamatória TNF- α foi selecionada como controle positivo para síntese de MMPs e TIMPs, uma vez que o contato com esse mediador inflamatório atua como indutor da síntese e atividade de MMPs por HGF¹³, assim como a expressão gênica de TIMPs por fibroblastos da pele humana⁷⁷. Células expostas ao DMEM livre de SFB foram utilizadas como controle negativo. Os experimentos foram realizados em duas ocasiões distintas e, ao final da segunda ocasião, cada grupo experimental apresentou 6 amostras.

Quadro1. Distribuição dos grupos experimentais (n=6)

Grupos	Tratamento (concentração)
Controle negativo	-
Controle positivo (TNF)	Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) 100 ng/mL
AZ	Ácido zoledrônico 5 μ M
NA	Naringenina
PA	Proantocianidinas
TNF + NA	TNF- α 100 ng/mL + Naringenina
TNF + PA	TNF- α 100 ng/mL + Proantocianidinas
AZ + NA	Ácido zoledrônico 5 μ M + Naringenina
AZ + PA	Ácido zoledrônico 5 μ M + Proantocianidinas

Fonte: Elaboração própria.

4.6 Análise da síntese de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2

Por meio do ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), a síntese de MMPs e TIMPs por HGF e Ob foi avaliada após diferentes períodos de contato com AZ e TNF- α (n=6). Para HGF, a sínteses de MMP-2 e MMP-9 foram avaliadas após um período de contato de 12 horas; esse período foi selecionado com base em investigação anterior, na qual os autores demonstraram que a síntese proteica de MMPs por HGF estimuladas por TNF- α aumenta significativamente após um período de 12 horas⁷⁵. Para Ob, as sínteses de MMP-2 e MMP-9 foram avaliadas

após 3 horas de contato; esse período foi selecionado com base em um estudo anterior onde os autores determinaram que a expressão de MMP-9 estimulada por TNF- α é significativamente aumentada em células osteoblásticas após um período de 3 horas⁷⁸.

Os períodos de avaliação da síntese de TIMPs por ambos os tipos celulares foram determinados por um estudo de tempo-resposta: HGF e Ob foram semeados individualmente em placas de cultura celular de 24 poços (1×10^5 células/poço) (TPP) em DMEM completo + 10% SFB por 24 horas; em seguida, as células foram submetidas (ou não) ao tratamento com TNF- α (100 ng/mL) (1 mL) em DMEM livre de SFB por 3, 6, 12 e 24 horas, seguido de avaliação da produção de TIMP-1 e TIMP-2 por ELISA, comparando a síntese proteica do grupo controle negativo (DMEM livre de SFB) com a do grupo controle positivo (TNF- α).

A síntese proteica de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 foi determinada por ELISA¹³ de acordo com as recomendações do fabricante (MMP-2, cat#DY902; MMP-9, cat#DY911; TIMP-1, cat#DY970-05; TIMP-2, cat#DY971; R&D Systems, Pittsburgh, PA, EUA). Este ensaio mede o total de MMPs/TIMPs produzidos pelas células e presentes no meio de cultura. Após diferentes períodos de contato com AZ e TNF- α , o sobrenadante celular foi aliquotado e armazenado a -20°C. Este sobrenadante (amostra) foi utilizado para a avaliação da síntese de MMPs/TIMPs pelas células cultivadas. Inicialmente, placas de 96 poços (Costar, Corning) foram incubadas com anticorpo primário por 8 horas e em temperatura ambiente. Decorrido este período, as placas foram submetidas a lavagens, bloqueio com BSA, seguido de incubação por 1 hora, adição das amostras e incubação por 2 horas. Após este período, foi adicionado o anticorpo secundário, que tem por objetivo identificar a ligação da proteína alvo com o anticorpo primário específico para esta proteína. Em seguida, a reação foi detectada por meio de solução de estreptavidina/peroxidase e a síntese proteica foi determinada pela análise da absorbância das amostras a 450 nm, em espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek). As concentrações de MMP/TIMP foram determinadas de acordo com uma curva padrão. Além disso, a concentração de MMP/TIMP de cada amostra foi normalizada pela taxa de viabilidade celular correspondente (avaliada pelo ensaio de prestoBlue). Os resultados estão apresentados em fold change de cada grupo experimental e o grupo controle.

4.7 Análise da atividade gelatinolítica

Após o tratamento individual com flavonoides por 24 horas, as células foram expostas ao AZ ou TNF- α por 24 horas adicionais; esse período foi determinado com base em investigação anterior que mostrou atividade gelatinolítica de HGF induzida por AZ após esse período específico de contato¹³. A atividade das MMPs foi determinada pela atividade gelatinolítica utilizando o teste de zimografia *in situ* (n=4), que indica a presença de enzimas gelatinolíticas em amostras biológicas. Este ensaio baseia-se na dissolução do substrato gelatinoso pelas enzimas produzidas pelas células.

A técnica de zimografia *in situ* foi realizada com o kit EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A solução de gelatina (20 μ L) foi preparada e aplicada nos discos de titânio contendo células previamente semeadas e expostas individualmente aos flavonoides, AZ ou TNF- α , conforme descrito anteriormente. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂, na ausência de luz, durante 3 horas. Após esse período, as amostras foram avaliadas por microscopia de fluorescência (Leica DM4000 B LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para determinar a degradação da gelatina, que promove a liberação de fluoresceína, gerando um substrato verde-fluorescente e indicando a atividade de enzimas gelatinolíticas/colagenolíticas. Além disso, as amostras foram submetidas à coloração fluorescente de DNA/núcleo celular pela adição do reagente Hoechst 0.02% (Invitrogen) em solução salina tamponada com fosfato 1X (PBS; Gibco). Fotomicrografias de cada amostra foram obtidas e analisadas pelo software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, NIH, Bethesda, MD, EUA)¹³.

4.8 Análise da adesão celular

Após o tratamento com os flavonoides por 24 horas e exposição ao AZ por 48 horas, a adesão das células ao substrato de titânio foi determinada por meio de fluorescência direta (n=4). Foram utilizados marcadores de filamentos de actina em vermelho (ActinRed 555, Invitrogen) e do núcleo celular em azul (intercalante de DNA – Hoechst, Invitrogen). Para tanto, as células foram fixadas em 500 μ L de paraformaldeído 4% por 15 minutos. A seguir, foram permeabilizadas com 500 μ L de Triton X-100 0,1% em PBS (Sigma-Aldrich) por 10 minutos, seguido de lavagem e incubação com 20 μ L ActinRed 3.5% em PBS por 30 minutos. Por fim, foi realizada a

incubação com 500 µL de intercalante de DNA 0.02% em PBS por 15 minutos e análise em microscópio de fluorescência (Leica DM6000, Leica Microsystems).

4.9 Análise da proliferação celular

A proliferação das células foi determinada por meio do teste CyQUANT NF Cell Proliferation Assay (Invitrogen) (n=4), um método altamente sensível no qual um corante fluorescente se liga aos ácidos nucleicos da célula, possibilitando a avaliação da proliferação celular e citotoxicidade.

Após o tratamento com os flavonoides por 24 horas e exposição ao AZ por 48 horas, a solução de CyQUANT foi preparada seguindo as recomendações do fabricante e adicionada (20 µL) a cada disco de Ti, seguido de incubação por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período foi realizada análise qualitativa em microscópio de fluorescência direta (Leica DM6000, Leica Microsystems).

4.10 Análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Após 24 horas do cultivo celular, foi realizado o tratamento individual com os flavonoides por 24 horas adicionais e exposição ao AZ ou TNF-α por 48 horas, assim, as células foram mantidas por mais 72 horas em DMEM livre de SFB, totalizando 7 dias em cultura. Dessa forma, após esse período a capacidade de mineralização dos Ob foi determinada por meio da análise da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) (Ensaio de ponto final - Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), que participa da mineralização da matriz colágena (n=6). A fosfatase alcalina produzida pelas células hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando a timolftaleína que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada é diretamente proporcional à atividade enzimática e avaliada por meio de espectrofotômetro a 590 nm (Synergy H1, Biotek).

4.11 Análise estatística

O conjunto de dados de viabilidade, síntese de MMPs/TIMPs e atividade de fosfatase alcalina foi avaliado quanto à sua distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade dos grupos foi comparada pelo teste de Levene. Observada normalidade e homocedasticidade, foi aplicado o teste de análise de variâncias a um critério fixo (ANOVA), complementado pelo pós-teste de Tukey.

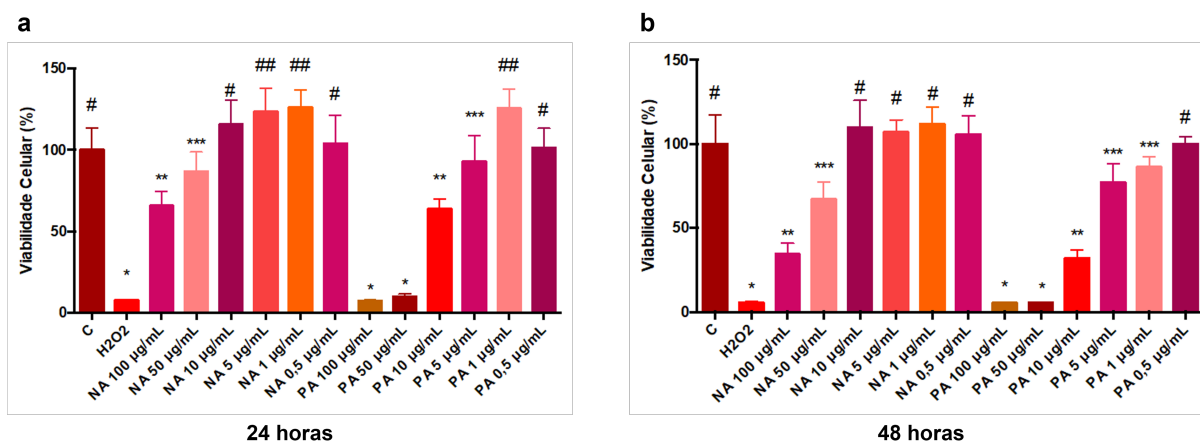
Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância pré-determinado de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados referentes à adesão, proliferação e atividade gelatinolítica foram avaliados qualitativamente.

5 RESULTADO

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados a seguir.

5.1 Seleção de concentração não-citotóxica de NA e PA sobre cultura de osteoblastos

Figura 2 – Viabilidade celular por meio do ensaio de PrestoBlue



Viabilidade dos osteoblastos (Ob) após contato com NA e PA em diferentes concentrações (100-0,5 µg/mL) por 24 (a) e 48 (b) horas. Barras indicam média e barras de erro indicam desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$; $n=12$).

Fonte: Elaboração própria.

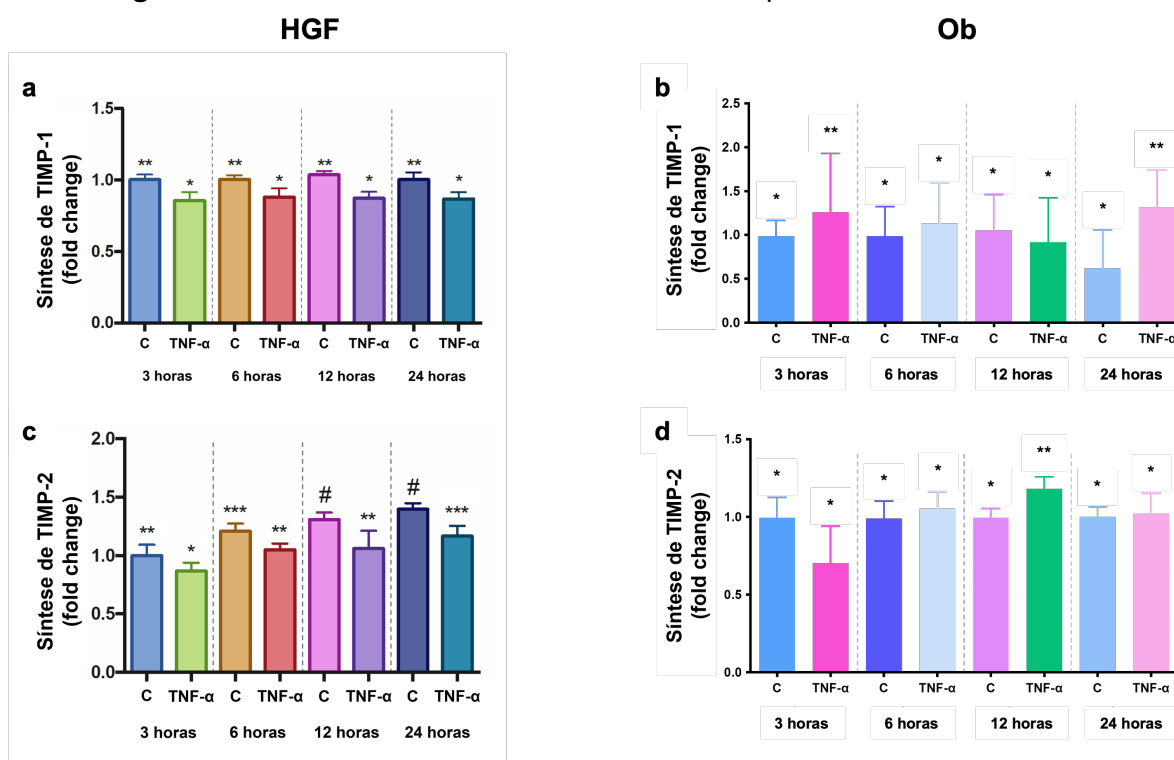
A avaliação do potencial citotóxico da NA e PA sobre os Ob em cultura demonstrou que no período de 24 horas, os grupos submetidos aos tratamentos com H₂O₂, NA 100 µg/mL, NA 50 µg/mL, PA 100 µg/mL, PA 50 µg/mL, PA 10 µg/mL e PA 5 µg/mL apresentaram viabilidade celular significativamente diminuída em comparação ao grupo controle (C) daquele período ($p < 0,05$). Os grupos expostos à NA 5 µg/mL, NA 1 µg/mL e PA 1 µg/mL apresentaram viabilidade celular significativamente aumentada em comparação ao grupo C daquele período ($p < 0,05$). Os grupos tratados com NA 10 µg/mL, NA 0,5 µg/mL e PA 0,5 µg/mL apresentaram taxas de viabilidade celular estatisticamente semelhantes às do grupo C ($p > 0,05$). No período de 48 horas, os grupos submetidos aos tratamentos com H₂O₂, NA 100 µg/mL, NA 50 µg/mL, PA 100 µg/mL, PA 50 µg/mL, PA 10 µg/mL, PA 5 µg/mL e PA 1

$\mu\text{g/mL}$ apresentaram viabilidade celular significativamente diminuída em comparação ao C daquele período ($p < 0,05$), enquanto os grupos tratados com NA 10 $\mu\text{g/mL}$, NA 5 $\mu\text{g/mL}$, NA 1 $\mu\text{g/mL}$, NA 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e PA 0,5 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram taxas de viabilidade celular estatisticamente semelhantes às do grupo controle ($p > 0,05$).

Com base nos resultados obtidos, a concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para NA e PA foi selecionada para ser utilizada nos seguintes experimentos envolvendo Ob.

5.2 Seleção do tempo de avaliação para as os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)

Figura 3 – Síntese de TIMP-1 e TIMP-2 avaliadas por imunoensaio de ELISA



Síntese de TIMP-1 (a/b) e TIMP-2 (c/d) por fibroblastos gengivais humano (HGF) (a/c) e osteoblastos (Ob) (b/d) após contato com TNF- α por 3, 6, 12 e 24 horas. Barras indicam média e barras de erro indicam desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$; $n=6$).

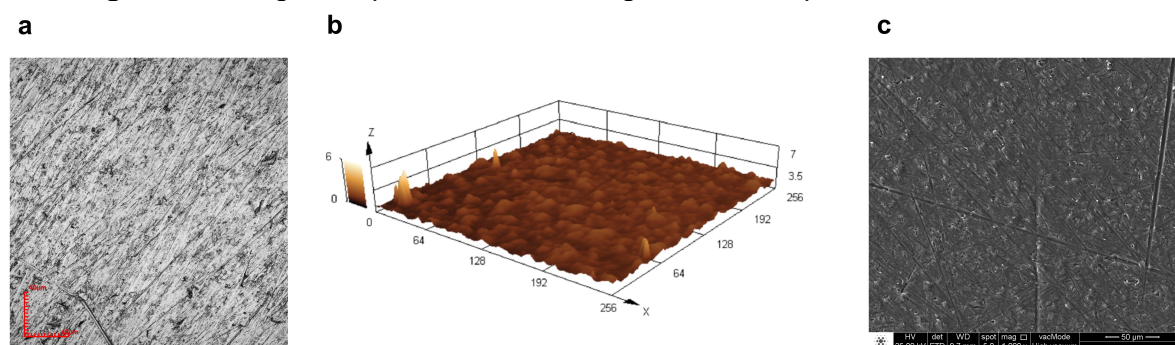
Fonte: Elaboração própria.

Para determinar o melhor período de análise da síntese de TIMP-1 e TIMP-2 no presente modelo experimental, HGF e Ob foram expostos ao estímulo com TNF- α por 3, 6, 12 e 24 horas. Para HGF, os níveis de TIMPs estimulados pelo TNF- α foram

inferiores aos níveis do grupo controle negativo em todos os períodos avaliados (3, 6, 12 e 24 horas) ($p < 0,05$); assim, o período selecionado para análise do TIMP-1 e TIMP-2 foi de 24 horas. Para Ob, a síntese de TIMP-1 aumentou nos períodos de 3 e 24 horas após a exposição ao TNF- α ($p < 0,05$), enquanto a síntese de TIMP-2 aumentou no período de 12 horas após o tratamento com TNF- α ($p < 0,05$); portanto, o período de 3 horas foi selecionado para a avaliação do TIMP-1 e o período de 12 horas para a avaliação do TIMP-2 (Figura 3).

5.3 Análise da rugosidade superficial dos discos de Ti

Figura 4 – Imagens representativas da rugosidade e superfície dos discos de Ti



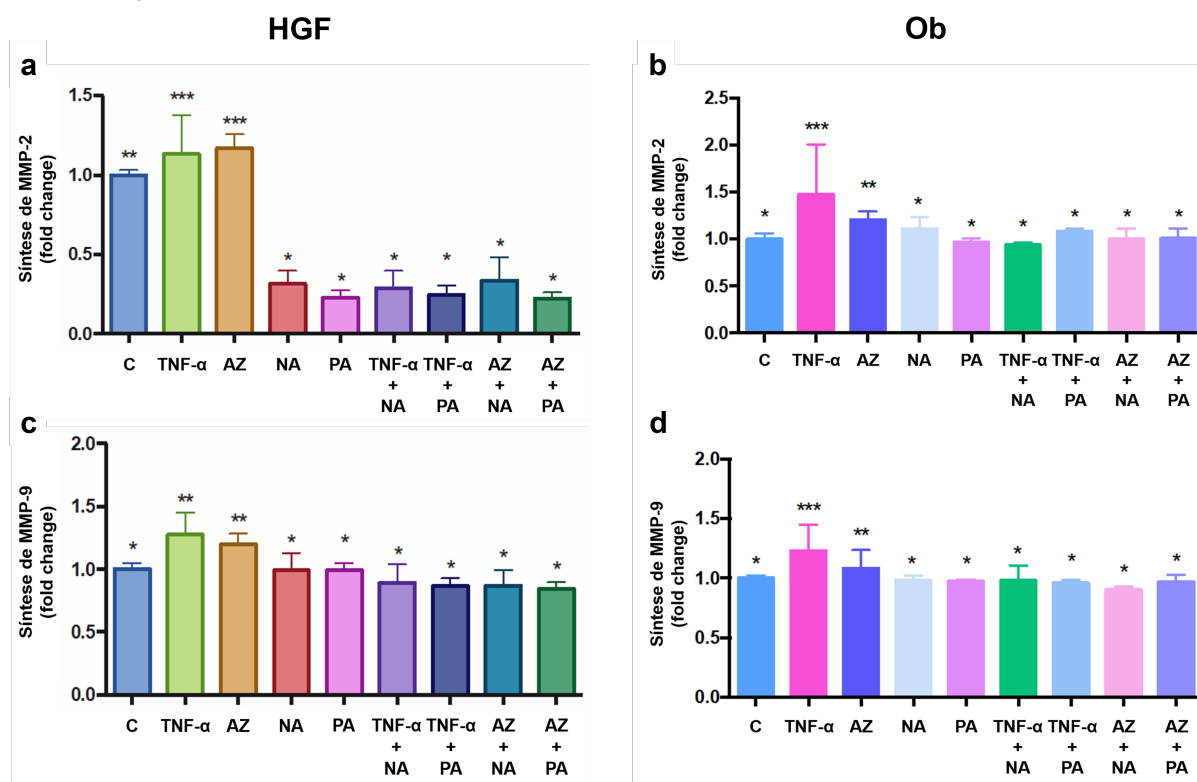
Imagens representativas da rugosidade dos discos de Ti, após padronização por polimento/limpeza, determinada por microscopia confocal (1024x). (a) imagem da superfície do disco de Ti (barra de escala = 40 μm) e (b) imagem em 3D da superfície do disco de Ti, onde os picos são representados pelas áreas mais claras e os vales por áreas mais escuras. A distância entre picos e vales apresenta a Rugosidade média (R_a). (c) Fotomicrografia eletrônica de disco de Ti polido avaliada por microscopia eletrônica de varredura em aumento de 1000x.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após obtenção dos discos de Ti usinados, padronização da sua rugosidade com lixas de diferentes granulações (400, 600 e 1200) e limpeza em ultrassom, as superfícies de Ti apresentaram uma rugosidade média (R_a) de 0,772 μm (desvio padrão: $\pm 0,03$) (Figura 4).

5.4 Efeito do pré-tratamento com NA e PA na síntese de MMPs e TIMPs

Figura 5 – Síntese de MMP-2 e MMP-9 avaliadas por imunoenensaio de ELISA



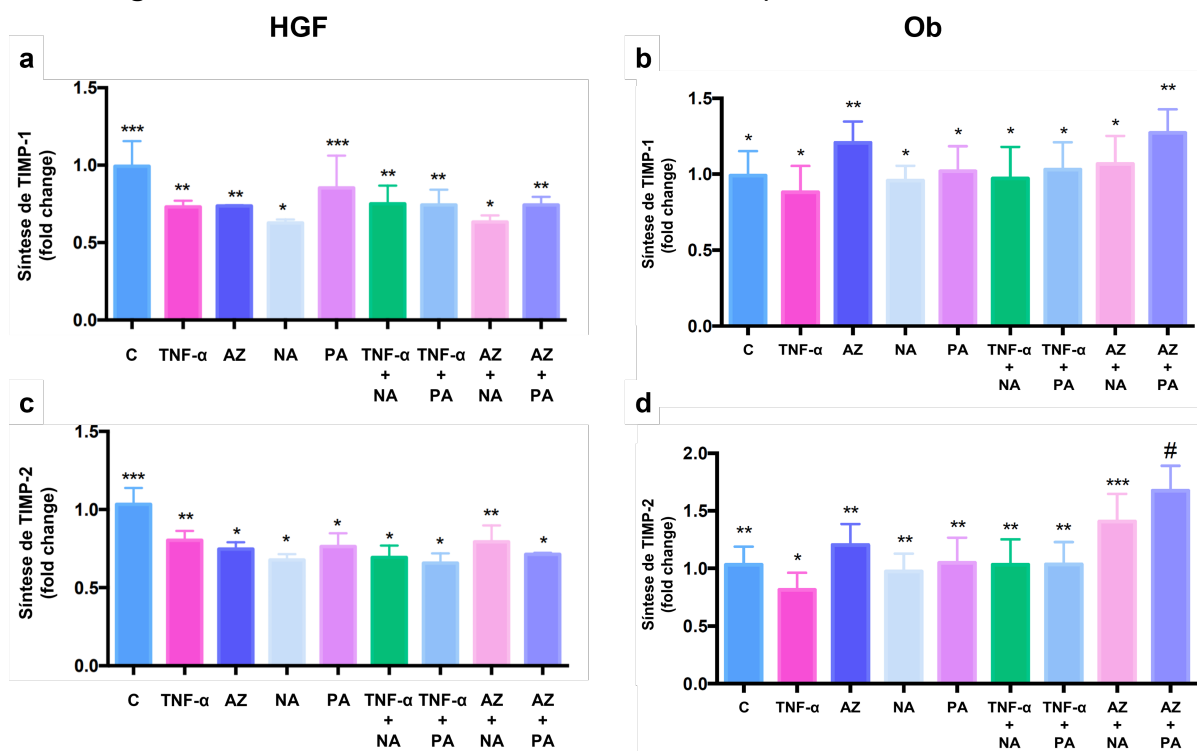
Síntese de MMP-2 (a,b) e MMP-9 (c,d) por fibroblastos gengivais humanos (HGF) (a,c) e osteoblastos (Ob) (b,d) após pré-tratamento com NA (naringenina) ou PA (proantocianidinas), seguido de exposição ao TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) ou AZ (ácido zoledrônico). Os resultados da síntese proteica estão descritos em fold-change, comparando os resultados dos grupos experimentais em relação ao grupo controle (definido arbitrariamente como 100% = 1). Barras indicam média e barras de erro indicam desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$; $n=6$).

Fonte: Elaboração própria.

Para HGF, a síntese de MMP-2 foi significativamente aumentada após os tratamentos com TNF- α e AZ em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto os grupos submetidos aos tratamentos com NA, PA, TNF- α +NA, TNF- α +PA, AZ+NA e AZ+PA apresentaram síntese significativamente diminuída de MMP-2 em comparação com os demais grupos experimentais ($p < 0,05$) (Fig. 5a). A síntese de MMP-9 pelos HGF também aumentou significativamente após os tratamentos com TNF- α e AZ em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$); os grupos submetidos aos tratamentos com NA, PA, TNF- α +NA, TNF- α +PA, AZ+NA e AZ+PA apresentaram síntese de MMP-9 estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 5c).

Para Ob, um padrão semelhante foi observado: a síntese de MMP-2 aumentou significativamente após os tratamentos com TNF- α e AZ em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$); os grupos submetidos aos tratamentos com NA, PA, TNF- α +NA, TNF- α +PA, AZ+NA e AZ+PA apresentaram síntese de MMP-2 estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 5b). A síntese de MMP-9 pelos Ob também aumentou significativamente após os tratamentos com TNF- α e AZ em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$); os grupos submetidos aos tratamentos com NA, PA, TNF- α +NA, TNF- α +PA, AZ+NA e AZ+PA apresentaram síntese de MMP-9 estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 5d).

Figura 6 – Síntese de TIMP-1 e TIMP-2 avaliadas por imunoensaio de ELISA



Síntese de TIMP-1 (a,b) e TIMP-2 (c,d) por fibroblastos gengivais humanos (HGF) (a,c) e osteoblastos (Ob) (b,d) após pré-tratamento com NA (naringenina) ou PA (proantocianidinas), seguido de exposição ao TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) ou AZ (ácido zoledrônico). Os resultados da expressão proteica estão descritos em fold-change, comparando os resultados dos grupos experimentais em relação ao grupo controle (definido arbitrariamente como 100% = 1). Barras indicam média e barras de erro indicam desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$; $n=6$).

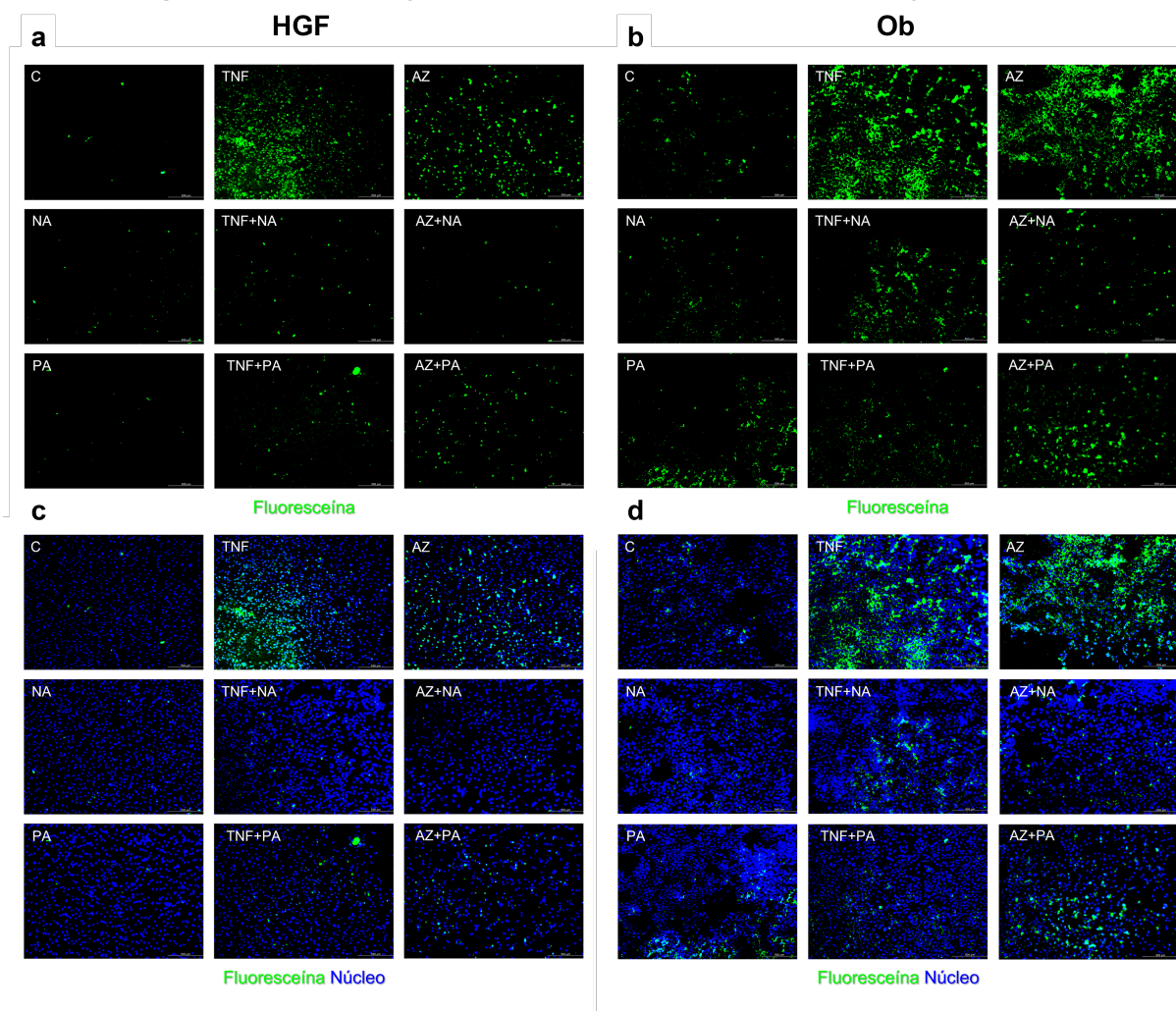
Fonte: Elaboração própria.

Em relação à expressão proteica de TIMPs, para HGF, a síntese de TIMP-1 foi significativamente diminuída após os tratamentos com TNF- α , AZ, NA, TNF- α +NA, TNF- α +PA, AZ+NA e AZ+PA em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto o grupo submetido à PA apresentou síntese de TIMP-1 estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 6a). A síntese de TIMP-2 pelos HGF foi significativamente diminuída após os tratamentos com TNF- α , AZ, NA, PA, TNF- α +NA, TNF- α +PA, AZ+NA e AZ+PA em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 6c).

Para Ob, foi observado um padrão diferente para a síntese de TIMPs: o TIMP-1 aumentou significativamente após os tratamentos com AZ e AZ+PA em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$); os grupos submetidos aos tratamentos com TNF- α , NA, PA, TNF- α +NA, TNF- α +PA e AZ+NA apresentaram síntese de TIMP-1 estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 6b). A síntese de TIMP-2 pelos Ob diminuiu significativamente após o tratamento com TNF- α em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto um aumento significativo de TIMP-2 foi observado após os tratamentos com AZ+NA e AZ+PA em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$) e os grupos submetidos aos tratamentos AZ, NA, PA, TNF- α +NA e TNF- α +PA apresentaram síntese de TIMP-2 estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 6d).

5.5 Análise da atividade gelatinolítica

Figura 7 – Atividade gelatinolítica avaliada por meio de zimografia *in situ*



Imagens representativas de microscopia de fluorescência para análise da atividade gelatinolítica, por meio de zimografia *in situ* (EnzChek gelatinase/collagenase Assay Kit), de fibroblastos gengivais humanos (HGF) (a,c) e osteoblastos (Ob) (b,d) após pré-tratamento com NA (naringenina) ou PA (proantocianidinas), seguido de exposição ao TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) ou AZ (ácido zoledrônico). A atividade gelatinolítica é caracterizada pela liberação de fluoresceína (verde) (a,b). Os núcleos celulares estão corados em azul (Hoechst) nas imagens sobrepostas (c,d). A barra de escala representa 500 μ m (ampliação de 10x) (n=4).

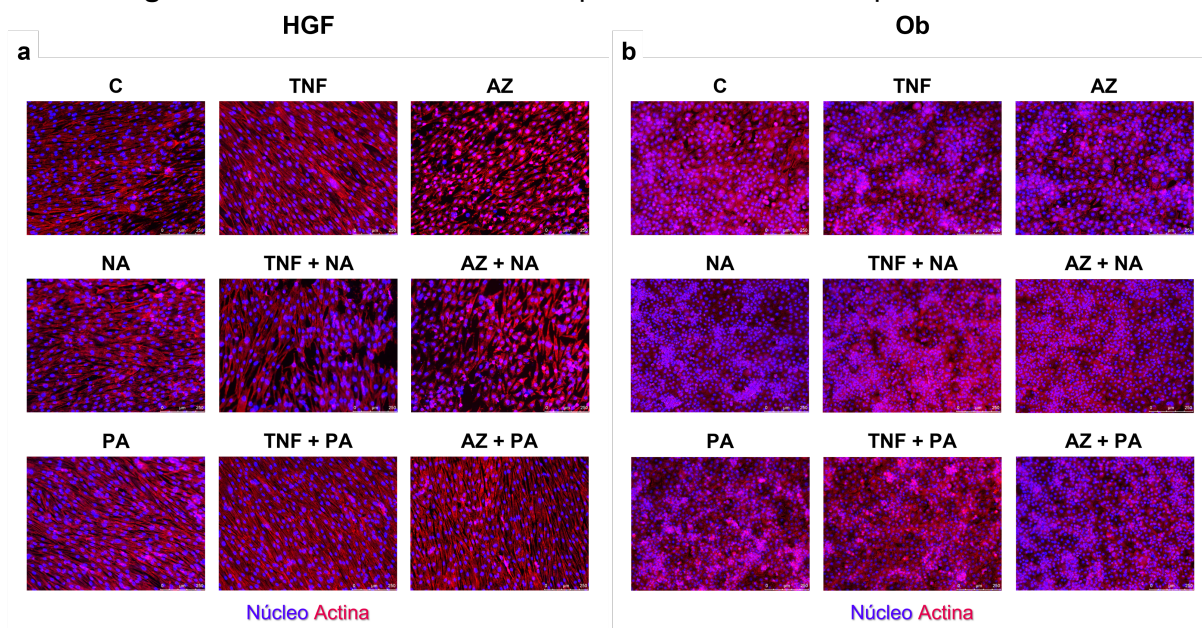
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Para HGF (Fig. 7a,c) e Ob (Fig. 7b,d), o tratamento com TNF- α e AZ induziu a maior intensidade de fluorescência entre todos os grupos, indicando maior atividade das enzimas gelatinolíticas produzidas por estas células. O pré-tratamento com NA ou PA, seguido (ou não) de exposição ao TNF- α ou AZ, promoveu menor intensidade

de fluorescência, indicando modulação da atividade gelatinolítica causada pelo pré-tratamento com estes flavonoides (Fig. 7).

5.6 Análise da adesão celular

Figura 8 – Adesão celular sobre superfície de Ti avaliada por fluorescência



Imagens representativas de microscopia de fluorescência para análise da adesão de fibroblastos gengivais humanos (HGF) (a) e osteoblastos (Ob) (b) sobre discos de titânio após pré-tratamento com NA (naringenina) ou PA (proantocianidinas), seguido de exposição ao TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) ou AZ (ácido zoledrônico). Os núcleos celulares estão corados em azul (Hoechst) e o citoplasma em vermelho (ActinRed). A barra de escala representa 250 μ m (Aumento de 10X) (n=4).

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

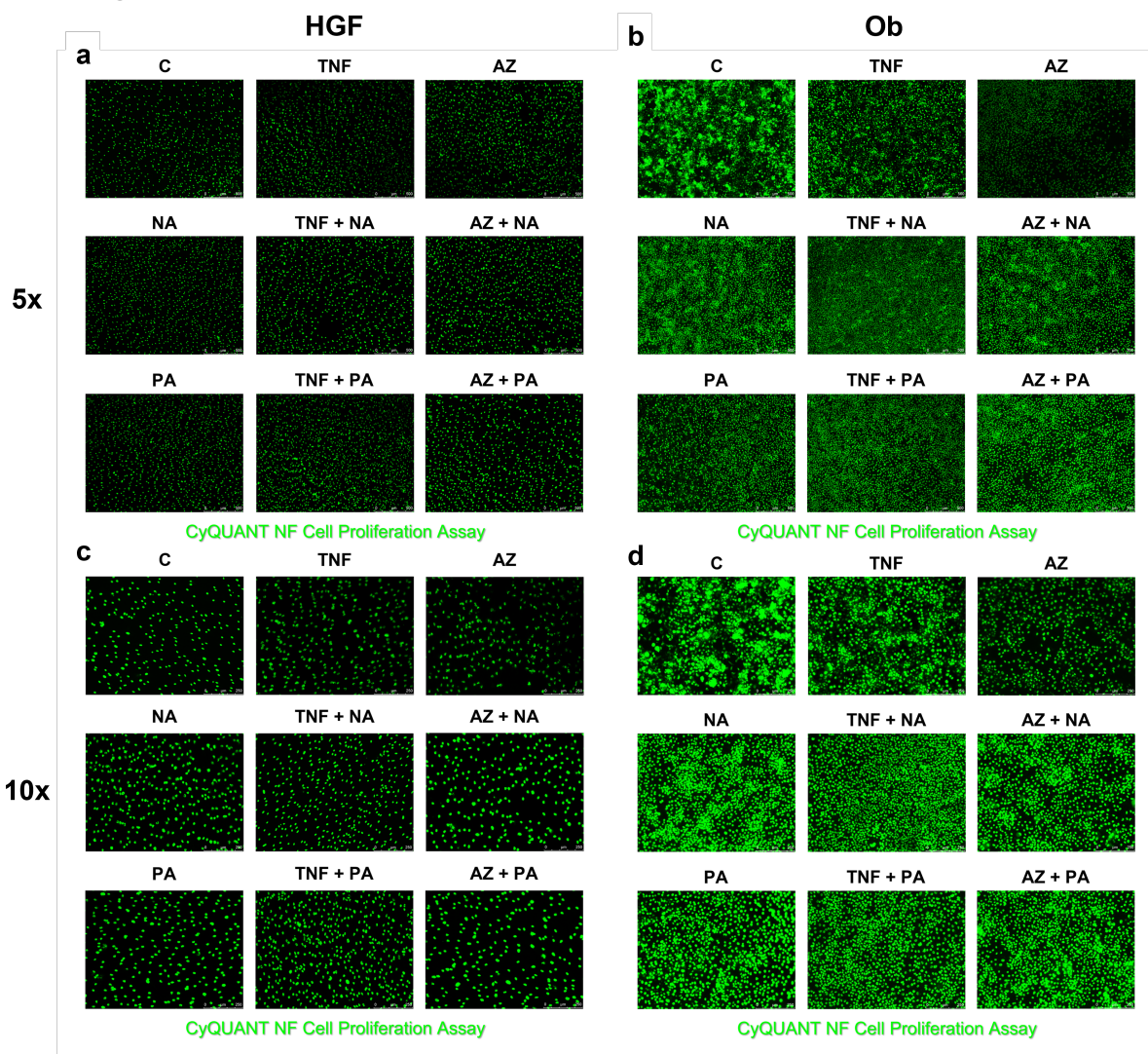
Foi possível observar, qualitativamente, um maior número de HGF aderidos ao substrato de Ti nos grupos submetidos ao pré-tratamento com NA e PA comparados ao controle negativo (C). A exposição ao AZ, no entanto, causou contração citoplasmática das células, as quais apresentaram-se menos alongadas quando comparadas aos demais grupos experimentais. O pré-tratamento com NA e PA promoveu uma atenuação do efeito deletério causado pelo AZ, possibilitando espalhamento e morfologia celular semelhante ao C; porém, esse efeito foi mais pronunciado pelo pré-tratamento com PA. O TNF- α não alterou a morfologia e o número de células aderidas ao substrato de Ti, mas nota-se maior número de células

aderidas ao substrato no grupo pré-tratado com PA seguido do estímulo com TNF- α (Fig. 8a).

Em relação aos Ob, foi observado, qualitativamente, um menor número de células aderidas ao substrato de Ti quando expostas ao AZ. Entretanto, quando as células foram pré-tratadas com NA e PA seguido da exposição ao AZ, um maior número de Ob aderidos ao substrato de Ti foi observado em relação ao grupo tratado somente com AZ. A exposição das células ao TNF- α não afetou a adesão dos Ob ao Ti em relação ao C, porém, quando houve o pré-tratamento com NA e PA seguido da exposição ao TNF- α , observou-se um maior número de células aderidas em relação ao C e ao grupo tratado somente com TNF- α (Figura 8b).

5.7 Análise da proliferação celular

Figura 9 – Proliferação celular na superfície de Ti avaliada por fluorescência



Imagens representativas de microscopia de fluorescência para análise da proliferação (CyQUANT NF Cell Proliferation Assay) de fibroblastos gengivais humanos (HGF) (a/c) e osteoblastos (Ob) (b/d) na superfície de titânio após pré-tratamento com NA (naringenina) ou PA (proantocianidinas), seguido de exposição ao TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) ou AZ (ácido zoledrônico). A barra de escala em (a) representa 500 μ m (Aumento de 5x) e em (b) representa 250 μ m (Aumento de 10x) (n=4).

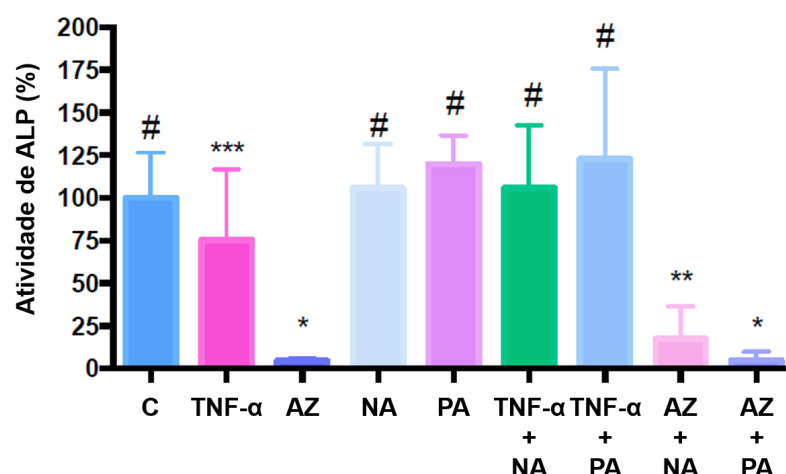
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

A análise qualitativa da proliferação dos HGF e Ob, por meio de microscopia de fluorescência, demonstrou que o tratamento com TNF- α e AZ resultou em menor densidade celular, condizente com uma menor taxa de proliferação, enquanto o pré-tratamento com os flavonoides reduziu este efeito negativo, aumentando a densidade

celular demarcada na presença ou ausência do TNF- α e AZ, indicando aumento da proliferação dessas células (Figura 9).

5.8 Análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Figura 10 – Atividade de ALP por Ob semeados sobre Ti e avaliada por Ensaio de ponto final



Atividade de fosfatase alcalina (ALP) (% do controle) por Ob após pré-tratamento com NA (naringenina) ou PA (proantocianidinas), seguido de exposição ao TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) ou AZ (ácido zoledrônico). Barras indicam média e barras de erro indicam desvio padrão. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$; $n=6$).

Fonte: Elaboração própria.

O tratamento com o AZ diminuiu marcadamente (em média 95%) a atividade de ALP pelos Ob em relação ao controle negativo (C) (Tukey, $p < 0,05$). O pré-tratamento com NA melhorou discretamente esse efeito, aumentando em média 20% a atividade de ALP em relação ao grupo tratado com AZ (Tukey, $p < 0,05$), enquanto o pré-tratamento com PA seguido de exposição ao AZ não interferiu na atividade de ALP. O grupo exposto ao TNF- α apresentou diminuição significativa da atividade de ALP (em média 25%) em relação ao C (Tukey, $p < 0,05$). O pré-tratamento com os flavonoides melhorou esse efeito negativo promovido pelo TNF- α , estimulando a atividade de ALP, que se apresentou semelhante ao C (Figura 10).

6 DISCUSSÃO

O uso do AZ tem sido relacionado a efeitos deletérios sobre os tecidos orais, principalmente demonstrados pelo desenvolvimento de MRONJ; assim, a indicação de colocação de implante dentário em pacientes que utilizam de AZ ainda é contraditória, pois esse procedimento cirúrgico pode desencadear áreas de necrose tecidual^{7,8}.

Além disso, não só a colocação de implantes dentários poderia ser um fator de risco para MRONJ, mas também a presença do próprio implante no interior do osso alveolar, com constante carga mastigatória e remodelação tecidual também podem resultar na liberação do bisfosfonato e a efeitos tóxicos sobre os tecidos peri-implantares⁹. Portanto, o uso de compostos capazes de regular tais efeitos, como os flavonoides, tais como aqueles avaliados no presente estudo, parece ser uma estratégia interessante para controlar ou prevenir esses efeitos negativos.

Inicialmente, para a linhagem celular Ob, foi determinada uma concentração não citotóxica de flavonoides (NA e PA) por meio da taxa de viabilidade celular pelo ensaio de prestoBlue. De acordo com a International Organization for Standardization (ISO) 10993-522⁷⁹, uma redução da viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico. Assim, por avaliação dose-resposta, observamos que NA e PA na concentração de 0,5 µg/mL não causaram redução da viabilidade celular após 24 e 48 horas de contato com as células; portanto, Ob expostos à NA ou PA exibiu viabilidade estatisticamente semelhante à do grupo controle. Para HGF, a concentração de NA e PA foi selecionada com base em investigação anterior, na qual os autores demonstraram que 10 µg/mL de ambos os flavonoides não causam efeitos tóxicos a tal linhagem celular²⁵.

Portanto, por meio de um modelo *in vitro* de superfície de implante dentário, avaliamos os efeitos do pré-tratamento com NA e PA na adesão, proliferação, atividade de ALP e regulação dos efeitos gelatinolíticos induzidos por AZ. A utilização deste modelo foi importante porque o ambiente celular desempenha um papel fundamental em diversas funções celulares, influenciando diretamente no fenótipo celular⁸⁰. Este modelo laboratorial foi utilizado em investigações anteriores para mimetizar condições *in vivo* de células peri-implantares em substrato de titânio^{13,14,76}. Para investigar a influência de NA e PA na síntese de proteínas relacionadas ao metabolismo do colágeno durante o reparo peri-implantar, duas linhagens celulares

foram utilizadas neste estudo - Ob e HGF, que estão presentes no osso e na mucosa oral ao redor dos implantes dentários.

O presente estudo demonstrou que o pré-tratamento com os flavonoides NA e PA (10 µg/mL para HGF e 0,5 µg/mL para Ob) previamente à exposição ao AZ favoreceu a proliferação e adesão celular, bem como controlou os efeitos gelatinolíticos induzidos por este BF, regulando negativamente a síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9 por HGF e Ob. Para o HGF, o pré-tratamento com estes flavonoides não regulou positivamente a síntese de TIMP-1 e TIMP-2 após a exposição ao AZ. Para Ob, TIMP-1 e TIMP-2 foram regulados positivamente nos grupos pré-tratados com PA seguido de AZ, enquanto TIMP-2 também foi regulado positivamente no grupo pré-tratado com NA seguido de AZ. Após exposição ao AZ, somente o pré-tratamento com NA favoreceu discretamente a atividade de ALP, a qual foi marcadamente diminuída pelo tratamento com o AZ.

A concentração de AZ utilizada no presente estudo (5 µM) foi encontrada nos níveis orais de pacientes com risco de MRONJ³⁸ e já foi utilizada em investigações anteriores^{13,14}. Em altas concentrações (10⁻⁴ M), o AZ pode inibir diferentes tipos de MMPs (incluindo MMP-2 e MMP-9) devido à sua capacidade de quelar Ca²⁺ e Zn²⁺, que são essenciais para a atividade enzimática das MMPs¹⁷. Porém, em concentrações mais baixas (10⁻⁸ a 10⁻⁶ M), o AZ inibe a via do mevalonato¹⁷ e aumenta a síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9¹³, assim como observado em nosso estudo, uma vez que a concentração utilizada foi de 5 x 10⁻⁶ M. O aumento da síntese e atividade de MMPs pode contribuir para o início da MRONJ, devido ao fato de que o AZ pode regular positivamente essas enzimas pelos HGF^{13,14}, no osso alveolar in vivo¹⁵ e na saliva de pacientes que desenvolveram MRONJ¹⁶.

MMP-2 e MMP-9 são classificadas como gelatinases e promovem a clivagem de gelatinas, a forma desnaturada do colágeno⁸¹, além de outras proteínas da matriz extracelular. Em distúrbios inflamatórios, como a periodontite, a síntese aumentada dessas gelatinases pelos fibroblastos desempenha um papel importante na destruição tecidual^{82,83}.

No tecido ósseo, o Ob é a principal fonte destas gelatinases e outros tipos de MMPs, que iniciam a reabsorção óssea para aumentar a atividade dos osteoclastos; em contrapartida, a ausência de MMPs aumenta a massa óssea¹⁷. Aqui, observamos que HGF e Ob expostos ao AZ apresentaram aumento na síntese de MMP-2 e MMP-9, indicando que a presença deste BF poderia contribuir para a destruição do tecido

peri-implantar mediada por HGF e Ob, enquanto o pré-tratamento com flavonoides (NA e PA) regularam negativamente a síntese destas MMPs por ambos os tipos celulares. Ainda, a análise dos dados do presente estudo indicou feedback positivo do TNF- α na regulação positiva das MMPs, corroborando os resultados de investigações anteriores, nas quais níveis aumentados de MMP-2 e MMP-9 pelos HGF foram estimulados pelo TNF- α ^{13,14}.

As MMPs são produzidas principalmente em formas latentes não ativas (pró-formas) e são ativadas a partir da troca de cisteína⁸⁴. Assim, determinar apenas os níveis de MMPs não indica uma relação direta com a degradação da matriz extracelular por estas enzimas. Dessa forma, avaliamos no presente estudo a atividade gelatinolítica das MMPs por meio de zimografia *in situ*, que consiste na digestão do substrato gelatinoso por MMPs ativas⁸⁰. Quando esse substrato é clivado, a degradação da gelatina (atividade MMP) é detectada como fortes pontos fluorescentes contra um fundo preto⁸⁰. Uma limitação desta técnica é a difícil especificação das diferentes classes de MMPs⁸⁰. Porém, o substrato de gelatina utilizado em nosso estudo indica que gelatinases, como MMP-2 e MMP-9, foram ativadas e foram capazes de degradar esse substrato.

A análise dos dados obtidos da zimografia *in situ* confirmou que MMP-2 e MMP-9 induzidas por AZ não foram apenas superproduzidas por HGF e Ob, mas também foram ativadas no presente modelo *in vitro* de superfície de implante dentário. A exposição ao TNF- α também aumentou a atividade gelatinolítica das MMPs, como já foi observado em estudo anterior, no qual o TNF- α aumentou a atividade gelatinolítica por HGF¹³. Os grupos submetidos ao pré-tratamento com flavonoides e expostos ao AZ ou TNF- α apresentaram menores níveis de MMPs ativadas.

A proteólise extracelular mediada por MMPs é controlada principalmente por proteínas endógenas classificados como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), produzidos por diferentes tipos de células, incluindo HGF e Ob^{17,83}. TIMPs são uma família de proteínas multifuncionais que inibem a atividade catalítica de todas as MMPs no espaço da MEC, formando complexos de alta afinidade com formas ativas e pró-formas de MMPs; o TIMP-1 possui alta afinidade pela MMP-9, enquanto o TIMP-2 apresenta maior afinidade pela MMP-2¹⁷. Sob condições inflamatórias (como a periodontite) ou distúrbios metabólicos (como a osteoporose), há um desequilíbrio na relação MMPs/TIMPs, o que leva à remodelação óssea anormal e à destruição tecidual¹⁷.

Em nosso trabalho, também investigamos o papel do AZ na expressão de TIMPs por HGF e Ob pré-tratados com os flavonoides (NA e PA). Com base em estudo anterior, no qual o TNF- α foi utilizado como controle positivo para a expressão gênica de TIMP por fibroblastos de pele humana⁷⁷, também utilizamos essa citocina para esse fim; no entanto, a análise dos nossos dados mostrou que o tratamento com TNF- α não aumentou a síntese proteica dos TIMPs; assim, podemos sugerir que embora o TNF- α possa induzir aumento da expressão do gene TIMP pelos fibroblastos da pele humana⁷⁷, não houve transcrição da síntese proteica de TIMP-1 e TIMP-2 por HGF e Ob nos períodos avaliados em nosso estudo utilizando modelo *in vitro* de superfície de implante dentário.

Além disso, em nosso estudo tempo-resposta para determinação do período de avaliação dos TIMPs, observamos níveis mais baixos de TIMPs estimulados por TNF- α em HGF, enquanto para Ob, os TIMPs foram estimulados por TNF- α em períodos específicos de avaliação. Este resultado difere de Ob semeados em discos de titânio (nenhuma estimulação de TNF- α na produção de TIMP foi observada para Ob), e este resultado pode ser explicado pelo fato de que em nosso estudo de tempo-resposta, Ob foram semeados diretamente em placas de cultura de 24 poços e não em superfícies de titânio; assim, o substrato (microambiente) onde as células foram semeadas provavelmente interferiu na expressão proteica de TIMPs por Ob.

No presente modelo *in vitro* de superfície de implante dentário, após o tratamento de HGF com AZ, TIMP-1 e TIMP-2 não foram regulados positivamente. De fato, a análise dos dados demonstrou uma diminuição significativa na síntese proteica destes TIMPs em comparação ao grupo controle. Como discutido anteriormente, foi observado um aumento na síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9 quando HGF foram expostos ao AZ, sugerindo um aumento na degradação da MEC mediada por MMPs, uma vez que a síntese de MMPs foi mais estimulada do que a síntese de TIMPs no grupo AZ. Os grupos pré-tratados com flavonoides (NA e PA) não apresentaram regulação positiva na síntese de TIMP; entretanto, esses grupos exibiram regulação na síntese e atividade de MMPs induzidas pelo pré-tratamento com flavonoides.

Ob expostos ao tratamento com AZ exibiram aumento da síntese de TIMP-1. Quando estas células foram pré-tratadas com PA e depois expostas ao AZ, foi observada uma regulação positiva mais pronunciada da produção de TIMP-1. O TIMP-2 não foi regulado positivamente pelo tratamento com AZ; no entanto, quando as células foram pré-tratadas com NA ou PA e expostas ao AZ, foi observado um

aumento significativo na produção de TIMP-2. Estes resultados indicaram um possível mecanismo na regulação da síntese de MMP-9 pelo TIMP-1 em Ob exposto ao AZ. Entretanto, o TIMP-2 não foi regulado positivamente quando as células foram tratadas com AZ, e foi observada uma síntese aumentada de MMP-2 induzida por AZ, sugerindo um aumento na degradação da MEC mediada pela MMP-2. Porém, quando Ob foram pré-tratados com NA ou PA e exposto ao AZ, foi observada uma regulação negativa na síntese e atividade de MMP-2 e uma regulação positiva na síntese de TIMP-2, implicando um mecanismo regulador na degradação da MEC induzido pelo pré-tratamento com os flavonoides.

Os flavonoides NA e PA têm sido utilizados em diferentes tipos de investigações, e seu potencial na regulação de MMPs foi demonstrado em modelos pré-clínicos^{20-25,85}. A análise dos dados do nosso estudo confirmou o potencial desses tipos de flavonoides para regular negativamente a síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9 por HGF e Ob. O mecanismo envolvido na regulação negativa de MMPs por NA e PA não foi claramente elucidado, mas tem sido associado à inibição da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que, quando ativado, regula positivamente a produção de MMPs⁸⁵⁻⁸⁷. Embora os efeitos da NA e da PA na regulação das MMP já tenham sido amplamente explorados, a literatura atual sobre os seus efeitos específicos nas TIMPs permanece escassa. No entanto, o potencial de outros tipos de flavonoides tem sido investigado em diferentes modelos e tipos celulares, demonstrando não haver diferenças na produção de TIMPs após tratamento com flavonoides⁸⁸⁻⁹⁰. Em nossa pesquisa, para HGF, observamos que os grupos tratados com NA e PA exibiram níveis mais baixos de síntese de TIMP-1 e TIMP-2 em comparação ao grupo controle. Por outro lado, a síntese de TIMP-1 e TIMP-2 não foi influenciada pelo pré-tratamento de Ob com ambos os flavonoides.

A investigação dos efeitos do AZ sobre HGF e Ob foi importante, pois embora MRONJ envolva osso necrótico exposto na região maxilofacial⁵, a principal característica desta condição é a perda de tecido mole que cobre esse osso exposto¹². Portanto, com base nos dados obtidos, sugerimos um mecanismo potencial envolvendo os efeitos do HGF e do Ob na destruição tecidual na presença de AZ através da regulação positiva da síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9. Esses achados podem estar clinicamente correlacionados a uma resposta gelatinolítica local e à degradação da MEC, prejudicando o selamento biológico (mediado pelo HGF) e a osseointegração (mediada pelo Ob) dos implantes dentários, contribuindo para a falha

do implante induzida pelo AZ. Em contrapartida, o pré-tratamento com flavonoides mostrou uma estratégia adequada para a prevenção dos efeitos gelatinolíticos induzidos pelo AZ, indicando um potencial interessante da NA e PA para o controle da degradação da MEC ao redor dos implantes dentários, o que pode favorecer a estabilidade a longo prazo do selamento biológico e osseointegração de implantes dentários.

Outras funções celulares muito importantes avaliadas neste trabalho incluem a adesão e proliferação de HGF e Ob sobre a superfície de Ti, bem como a atividade de ALP, pois também estão relacionadas ao selamento biológico e osseointegração de implantes dentários. O selamento biológico é caracterizado pela adesão das células da mucosa oral às superfícies dos implantes, a qual é fundamental para a manutenção dos componentes protéticos dos implantes, formando uma barreira física e imunológica e prevenindo infecções bacterianas, além de proporcionar estética adequada a esses componentes⁶². Já a osseointegração caracteriza-se como um contato direto entre o implante dentário e o tecido ósseo maduro, permitindo que este seja submetido a cargas funcionais⁹¹. A adesão dos osteoblastos às superfícies dos implantes dentários é importante porque estas células interagem com uma matriz de fibras colágenas não mineralizadas para auxiliar na remodelação do osso que suporta estes implantes⁹². Ainda, a migração de osteoblastos para a superfície do implante, sua adesão, proliferação e síntese de matriz são eventos significativos relacionados à obtenção de tecido ósseo maduro e funcional. Assim, fatores que possam interferir nessas funções celulares podem resultar em atraso ou falha no processo de osseointegração⁹³.

Nossa investigação demonstrou que o tratamento com AZ prejudicou a adesão e proliferação de HGF e Ob semeados sobre discos de Ti, revelando menor número de células aderidas e menor proliferação celular, o que poderia estar correlacionado com um selamento biológico e osseointegração deficientes, devido aos efeitos citotóxicos causados pelo AZ, interferindo no metabolismo celular, como observado por outros estudos^{10,14,61}. Porém, o pré-tratamento com os flavonoides (NA e PA) modulou esses efeitos deletérios e ambos os tipos celulares apresentaram adesão e proliferação semelhante ao controle negativo; o que podem estar relacionado à mecanismos de citoproteção promovido pelo pré-tratamento com os flavonoides, os quais estão ligados à diversos mecanismos que ainda não foram completamente elucidados, mas que envolvem inibição do fator de transcrição NF- κ B e abertura de

canais de potássio mitocondriais, resultando na regulação positiva dos ciclos celulares e efeitos antioxidantes^{65,94-97}.

Em relação a produção de ALP, observamos uma diminuição acentuada da atividade dessa enzima causada pelo tratamento com AZ, confirmando achados anteriores¹⁰. Somente o pré-tratamento com NA favoreceu discretamente a atividade de ALP, porém significativamente inferior ao controle negativo. A ALP é uma metaloenzima composta por diversas isoenzimas de glicoproteínas ligadas à membrana, altamente expressas no estágio inicial da formação de tecido mineralizado durante a diferenciação dos osteoblastos⁹⁸. Estudos anteriores mostraram que a NA estimula a atividade da ALP^{99,100}. Esta enzima desempenha papel fundamental na formação de tecido duro pela facilitação da mineralização das fibrilas de colágeno e redução da concentração extracelular de pirofosfato, que é um inibidor da formação mineral⁹⁸. Nossos dados demonstraram que o AZ diminui marcadamente a atividade de ALP e o pré-tratamento com os flavonoides não foi capaz de modular significativamente esse efeito deletério. Tais resultados também poderiam contribuir para o desenvolvimento da MRONJ induzida pelo AZ.

Em geral, os BFs podem apresentar efeitos na remodelação óssea, angiogênese, processos infecciosos e inflamatórios e nos tecidos moles; esses efeitos podem contribuir para o desenvolvimento da MRONJ após o desencadeamento inicial da lesão⁵. Estudos futuros em animais poderão melhorar nossa compreensão da patobiologia da MRONJ e dos possíveis mecanismos de estratégias terapêuticas, como o uso dos flavonoides aqui investigados, nas respostas imunes, na angiogênese e na remodelação óssea envolvendo osteoclastos, uma vez que nosso modelo experimental apresenta limitações quanto a esses aspectos.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o tratamento com AZ prejudicou a adesão e proliferação celular, aumentou significativamente a síntese e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 pelos HGF e Ob, induzindo também uma diminuição significativa de TIMP-1 e TIMP-2 pelos HGF, além de promover marcada diminuição de ALP pelos Ob. O pré-tratamento de células com NA e PA modulou os efeitos deletérios do AZ, melhorando a adesão e proliferação celular, regulando negativamente a síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9 pelos HGF e Ob e aumentando a produção de TIMP-2 pelos Ob. Entretanto, o pré-tratamento com os flavonoides não foi capaz de contrapor os efeitos deletérios do AZ sobre a atividade de ALP pelos Ob.

REFERÊNCIAS*

1. Lawson MA, Xia Z, Barnett BL, Triffitt JT, Phipps RJ, Dunford JE, et al. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 92(1): 149-55.
2. Nicolatou-Galitis O, Schiodt M, Mendes RA, Ripamonti C, Hope S, Drudge-Coates L, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis, and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2019; 127(2): 117-35.
3. Bullock G, Miller CA, McKechnie A, Hearnden V. A review into the effects of pamidronic acid and zoledronic acid on the oral mucosa in medication-related osteonecrosis of the jaw. *Front Oral Health*. 2022; 2: 822411.
4. Granate-Marques A, Polis-Yanes C, Seminario-Amez M, Jane-Salas E, Lopez-Lopez J. Medication-related osteonecrosis of the jaw associated with implant and regenerative treatments: systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019; 24(2): e195-e203.
5. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American association of oral and maxillofacial surgeons' position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws-2022 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2022; 80(5): 920-43.
6. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61(9): 1115-7.
7. Gelazius R, Poskevicius L, Sakavicius D, Grimuta V, Juodzbals G. Dental implant placement in patients on bisphosphonate therapy: a systematic review. *J Oral Maxillofac Res*. 2018; 9(3): e2.
8. Sher J, Kirkham-Ali K, Luo JD, Miller C, Sharma D. Dental implant placement in patients with a history of medications related to osteonecrosis of the jaws: a systematic review. *J Oral Implantol*. 2021; 47(3): 249-68.
9. Giovannacci I, Meleti M, Manfredi M, Mortellaro C, Greco Lucchina A, Bonanini M, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw around dental implants: implant surgery-triggered or implant presence-triggered osteonecrosis? *J Craniofac Surg*. 2016; 27(3): 697-701.
10. Basso FG, Silveira Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*. 2013; 59(6): 534-41.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanakul K, Satravaha Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *J Oral Pathol Med*. 2012; 41(9): 713-20.
12. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone*. 2007; 41(3): 318-20.
13. Basso FG, Cardoso LM, Ribeiro IM, Rizzi E, Pansani TN, Hebling J, et al. Influence of bisphosphonates on oral implantology: sodium alendronate and zoledronic acid enhance the synthesis and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts seeded on titanium. *Arch Oral Biol*. 2021; 127: 105134.
14. Pansani TN, Cardoso LM, Augusto LA, Ribeiro IM, de Souza Costa CA, Basso FG. Effects of EGF-coated titanium surfaces on adhesion and metabolism of bisphosphonate-treated human keratinocytes and gingival fibroblasts. *Clin Oral Investig*. 2021; 25(10): 5775-84.
15. Basi DL, Hughes PJ, Thumbigere-Math V, Sabino M, Mariash A, Lunos SA, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of zoledronic acid-treated rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 69(11): 2698-707.
16. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, de Jong EP, Griffin TJ, Basi DL, Hughes PJ, et al. Salivary proteomics in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Dis*. 2015; 21(1): 46-56.
17. Paiva KBS, Granjeiro JM. Matrix metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 148: 203-303.
18. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1996; 23(12): 1127-32.
19. Ramesh P, Jagadeesan R, Sekaran S, Dhanasekaran A, Vimalraj S. Flavonoids: classification, function, and molecular mechanisms involved in bone remodelling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 779638.
20. Deziel BA, Patel K, Neto C, Gottschall-Pass K, Hurta RA. Proanthocyanidins from the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signalling pathways. *J Cell Biochem*. 2010; 111(3): 742-54.
21. Chang HL, Chang YM, Lai SC, Chen KM, Wang KC, Chiu TT, et al. Naringenin inhibits migration of lung cancer cells via the inhibition of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Exp Ther Med*. 2017; 13(2): 739-44.
22. Fan R, Pan T, Zhu AL, Zhang MH. Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF-kappaB and activation of the heme oxygenase (HO)-1/related factor 2 pathway. *Pharmacol Rep*. 2017; 69(5): 1021-9.

23. Nawrot-Hadzik I, Matkowski A, Hadzik J, Dobrowolska-Czopor B, Olchowy C, Dominiak M, et al. Proanthocyanidins and flavan-3-ols in the prevention and treatment of periodontitis-antibacterial effects. *Nutrients*. 2021; 13(1): 165.
24. Villas Boas SB, Sousa LS, Cardoso LM, Tavella-Silva NC, de Souza Costa CA, Basso FG. Grape seed extract down-modulates oxidative and inflammatory responses of oral mucosa cells. *J. Int. Acad. Periodontol*. 2021; 23(3): 7.
25. Cardoso LM, Pansani TN, de Souza Costa CA, Basso FG. Regulation of interleukin-6 and matrix metalloproteinases syntheses by bioflavonoids and photobiomodulation in human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2022; 37(7): 2973-87.
26. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int*. 2015; 74: 10-36.
27. Body JJ, Mancini I. Bisphosphonates for cancer patients: why, how, and when? *Support Care Cancer*. 2002; 10: 399-407.
28. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo S. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *J Am Dent Assoc*. 2005; 136: 1658-68.
29. Woo S, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006; 144: 753-61.
30. Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B, Hoffmeister B, Migliorati C, Gligorov J, et al. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: is there a diverse relationship of amino and non-aminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007; 64: 198-207.
31. Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, et al. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68: 2837-45.
32. Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, et al. Potential pathophysiological mechanism in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1218: 62-9.
33. Migliorati CA, Woo S, Hewson I, Barasch A, Elting L, Spjikervet FKL, et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. *Support Care Cancer*. 2009; 18: 1099-106.
34. Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Invest*. 2010; 14: 35-41.
35. Simon MJK, Niehoff P, Kimming B, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III and V of human gingiva fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Invest*. 2010; 14: 51-8.

36. Basso FG, Pansani TN, Oliveira CF, Turrioni APS, Soares DG, Hebling J, et al. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J*. 2013; 24: 551-8.
37. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011; 49: 2-19.
38. Scheper MA, Badros A, Salama AR, Warburton G, Cullen KJ, Weikel DS, et al. A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels. *Support Care Cancer*. 2009; 17(12): 1553-7.
39. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol*. 2009; 144(5): 667-76.
40. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010; 3:6.
41. Ohnuki H, Izumi K, Terada M, Saito T, Kato H, Suzuki A, et al. Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(7): 906-17.
42. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43(8): 1030-4.
43. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Turrioni AP, Scheffel DL, Hebling J, et al. Response of a co-culture model of epithelial cells and gingival fibroblasts to zoledronic acid. *Braz Oral Res*. 2016; 30(1): e122.
44. Coxon JP, Oades GM, Kirby RS, Colston KW. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int*. 2004; 94(1): 164-70.
45. Fliefel RM, Entekhabi SA, Ehrenfeld M, Otto S. Geranylgeraniol (GGOH) as a mevalonate pathway activator in the rescue of bone cells treated with zoledronic acid: an in vitro study. *Stem Cells Int*. 2019; 2019: 4351327.
46. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(5): 491-8.
47. Saito T, Izumi K, Shiomi A, Uenoyama A, Ohnuki H, Kato H, et al. Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of integrin $\alpha\beta 6$ and transforming growth factor beta signalling in a three-dimensional in vitro wound healing model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43(3): 373-80.
48. Bullock G, Miller C, McKechnie A, Hearnden V. Synthetic hydroxyapatite inhibits bisphosphonate toxicity to the oral mucosa in vitro. *Materials (Basel)*. 2020; 13(9): 2086.

49. Kim RH, Lee RS, Williams D, Bae S, Woo J, Lieberman M, et al. Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes. *J Dent Res*. 2011; 90(6): 810-6.
50. Alsalih A, Dam A, Lindberg P, Truedsson A. Medication-related osteonecrosis of the jaws initiated by zoledronic acid and potential pathophysiology. *Dent J (Basel)*. 2021; 9(8): 85.
51. Benhamou C. Effects of osteoporosis medications in bone quality. *Joint Bone Spine*. 2007; 74: 39-47.
52. Madrid C, Sanz M. What impact do systemically administered bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clin Oral Impl Res*. 2009; 20: 87-95.
53. Javed F, Almas K. Osseointegration of dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment: a literature review. *J Periodontol*. 2010; 81: 479-84.
54. Chadha G, Ahmadiéh A, Kumar S, Sedghzadeh PP. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. *J Oral Implantol*. 2013; 39: 510-20.
55. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67: 61-70.
56. Basso FG, Turrioni APS, Soares DG, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. *Support Care Cancer*. 2014; 22: 2741-48.
57. Idris AI, Rojas J, Greis IR, van't Hof RJ, Ralston SH. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calif Tissue Int*. 2008; 82: 191-201.
58. Taxel P, Ortiz D, Shafer D, Pendrys D, Reisine S, Rengasamy K, et al. The relationship between implant stability and bone health markers in post-menopausal women with bisphosphonate exposure. *Clin Oral Invest*. 2014; 18: 49-57.
59. Sun J, Song F, Zhang W, Sexton BE, Windsor LJ. Effects of alendronate on human osteoblast-like MG63 cells and matrix metalloproteinases. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(6): 728-36.
60. Tokuhara CK, Santesso MR, Oliveira GSN, Ventura TMDS, Doyama JT, Zambuzzi WF, et al. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27: e20180596.
61. Basso FG, Pansani TN, Soares DG, Cardoso LM, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of bisphosphonates on the adherence and metabolism of epithelial cells and gingival fibroblasts to titanium surfaces. *Clin Oral Investig*. 2018; 22(2): 893-900.

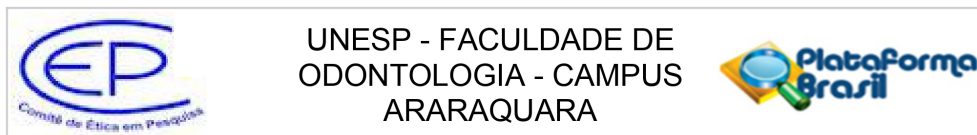
62. An N, Rausch-fan X, Wieland M, Matejka M, Andrukhov O, Schedle A. Initial attachment, subsequent cell proliferation/viability and gene expression of epithelial cells related to attachment and wound healing in response to different titanium surfaces. *Dent Mater.* 2012; 28(12): 1207-14.
63. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann NY Acad Si.* 2002; 957: 260-70.
64. De la Iglesia R, Milagro FI, Capión J, Boqué N, Martínez A. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors.* 2010; 36: 159-68.
65. Kurauchi M, Niwano Y, Shirato M, Kanno T, Nakamura K, Egusa H, et al. Cytoprotective effect of short-term pretreatment with proanthocyanidin on human gingival fibroblasts exposed to harsh environmental conditions. *Plos One.* 2014; 9: 1-5.
66. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115: 64-70.
67. Tipton DA, Cho S, Zacharia N, Dabbous MK. Inhibition of interleukin-17-stimulated interleukin-6 and -8 production by cranberry components in human gingival fibroblasts and epithelial cells. *J Periodontal Res.* 2013; 48: 638-46.
68. Bedran TBL, Spolidorio DP, Grenier D. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2015; 60: 845-53.
69. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Das KD, Ray SD, Kuszynski CA, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 2000; 148: 187-97.
70. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mut Res.* 2003; 523-4: 87-97.
71. Gaggeri R, Rossi D, Daglia M, Leoni F, Avanzini MA, Mantellu M, et al. An eco-friendly enantioselective access to (R)-naringenin as inhibitor of proinflammatory cytokine release. *Chem Biodivers.* 2013; 10: 1531-38.
72. Wang Y, Bai S, Cheng Q, Zeng Y, Xu X, Guan G. Naringenin promotes SDF-1/CXCR4 signaling pathway in BMSCs osteogenic differentiation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2021; 59(1): 66-73.
73. Wang W, Wu C, Tian B, Liu X, Zhai Z, Qu X, et al. The inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of p38 signaling pathway by naringenin and attenuation of titanium-particle-induced osteolysis. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(12): 21913-34.

74. Mariscal-Munoz E, Costa CA, Tavares HS, Bianchi J, Hebling J, Machado JP, et al. Osteoblast differentiation is enhanced by a nano-to-micro hybrid titanium surface created by Yb:YAG laser irradiation. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(3): 503-11.
75. Cardoso LM, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA, Basso FG. Chemotherapy drugs and inflammatory cytokines enhance matrix metalloproteinases expression by oral mucosa cells. *Arch Oral Biol*. 2021; 127: 105159.
76. Rech CA, Pansani TN, Cardoso LM, Ribeiro IM, Silva-Sousa YTC, de Souza Costa CA, et al. Photobiomodulation using LLLT and LED of cells involved in osseointegration and peri-implant soft tissue healing. *Lasers Med Sci*. 2022; 37(1): 573-80.
77. Chua CC, Chua BH. Tumor necrosis factor-alpha induces mRNA for collagenase and TIMP in human skin fibroblasts. *Connect Tissue Res*. 1990; 25(2): 161-70.
78. Tsai CL, Chen WC, Hsieh HL, Chi PL, Hsiao LD, Yang CM. TNF-alpha induces matrix metalloproteinase-9-dependent soluble intercellular adhesion molecule-1 release via TRAF2-mediated MAPKs and NF-kappaB activation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Biomed Sci*. 2014; 21(1): 12.
79. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices. In Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO; 2009. p. 1-33.
80. Ross AM, Jiang Z, Bastmeyer M, Lahann J. Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity. *Small*. 2012; 8(3): 336-55.
81. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005; 38(1): 73-83.
82. Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(2): 440.
83. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Dis*. 2014; 20(6): 538-50.
84. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004; 10(6): 311-8.
85. Chtourou Y, Fetoui H, Jemai R, Ben Slima A, Makni M, Gdoura R. Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor kappaB pathway. *Eur J Pharmacol*. 2015; 746: 96-105.
86. Wang CC, Guo L, Tian FD, An N, Luo L, Hao RH, et al. Naringenin regulates production of matrix metalloproteinases in the knee-joint and primary cultured articular chondrocytes and alleviates pain in rat osteoarthritis model. *Braz J Med Biol Res*. 2017; 50(4): e5714.

87. La VD, Howell AB, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit MMP production and activity. *J Dent Res*. 2009; 88(7): 627-32.
88. Hantke B, Lahmann C, Venzke K, Fischer T, Kocourek A, Windsor LJ, et al. Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2002; 1(10): 826-33.
89. Lin YC, Tsai PH, Lin CY, Cheng CH, Lin TH, Lee KP, et al. Impact of flavonoids on matrix metalloproteinase secretion and invadopodia formation in highly invasive A431-III cancer cells. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71903.
90. Pereira SC, Parente JM, Belo VA, Mendes AS, Gonzaga NA, do Vale GT, et al. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. *Atherosclerosis*. 2018; 270: 146-53.
91. Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontol 2000*. 2019; 79(1): 178-89.
92. Stefflik DE, Parr GR, Sisk AL, Lake FT, Hanes PJ, Berkery DJ, et al. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J Periodontol*. 1994; 65(5): 404-13.
93. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*. 2005; 36(7-8): 630-44.
94. Kampa RP, Sęk A, Bednarczyk P, Szewczyk A, Calderone V, Testai L. Flavonoids as new regulators of mitochondrial potassium channels: contribution to cardioprotection. *J Pharm Pharmacol*. 2023; 75(4): 466-81.
95. Sadek KM, Mahmoud SFE, Zeweil MF, Abouzed TK. Proanthocyanidin alleviates doxorubicin-induced cardiac injury by inhibiting NF- κ B pathway and modulating oxidative stress, cell cycle, and fibrogenesis. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021; 35(4): e22716.
96. Kampa RP, Kicinska A, Jarmuszkiewicz W, Pasikowska-Piwko M, Dolegowska B, Debowska R, et al. Naringenin as an opener of mitochondrial potassium channels in dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2019; 28(5): 543-50.
97. Liang J, Halipu Y, Hu F, Yakeya B, Chen W, Zhang H, et al. Naringenin protects keratinocytes from oxidative stress injury via inhibition of the NOD2-mediated NF- κ B pathway in pemphigus vulgaris. *Biomed Pharmacother*. 2017; 92: 796-801.
98. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020; 754: 144855.
99. Nor Muhamad ML, Ekeuku SO, Wong SK, Chin KY. A scoping review of the skeletal effects of naringenin. *Nutrients*. 2022; 14(22): 4851.

100. Wang Y, Bai S, Cheng Q, Zeng Y, Xu X, Guan G. Naringenin promotes SDF-1/CXCR4 signaling pathway in BMSCs osteogenic differentiation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2021; 59(1): 66-73.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BISFOSFONATOS E IMPLANTODONTIA: EFEITO DE INIBIDORES DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ EM MODELO IN VITRO

Pesquisador: Carlos Alberto de Souza Costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47390020.5.0000.5416

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Relatório final - Projeto

Justificativa: Segue em anexo o projeto completo finalizado com os respectivos resultados

Data do Envio: 21/02/2024

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.708.151

Apresentação da Notificação:

Trata-se da apresentação do relatório final da pesquisa cujo resumo constava: "O uso de bisfosfonatos é indicado para o tratamento de doenças ósseas neoplásicas e metabólicas, com o objetivo de controlar a reabsorção do tecido ósseo, atuando principalmente na indução de apoptose em osteoclastos e inibindo a maturação destas células. A indicação da instalação de implantes osseointegrados em pacientes em tratamento com bisfosfonatos é controversa, pois a indução de um evento traumático no local pode desencadear áreas de osteonecrose e resultados clínicos diversos têm sido observados, que variam desde uma maior osseointegração à perda dos implantes. Porém, pouco se sabe sobre os fatores que podem atuar como determinantes para o sucesso clínico dos implantes em pacientes que utilizam essas drogas. O tipo de bisfosfonato utilizado, diretamente relacionado à potência, via de administração e dose do mesmo pode influenciar na capacidade de resposta do tecido ósseo e

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

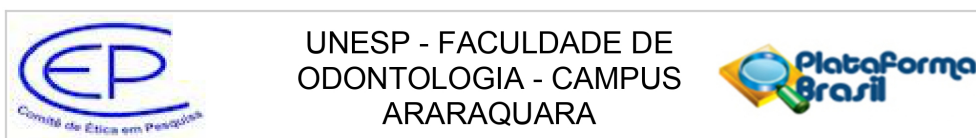
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep.foar@unesp.br



Continuação do Parecer: 6.708.151

mucoso frente à instalação de implantes osseointegrados, já que estudos anteriores demonstraram que esses medicamentos podem afetar negativamente o metabolismo de células da mucosa oral, inibindo a formação de um selamento biológico eficaz. A super-expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) por células da mucosa oral e por osteoblastos em contato com bisfosfonatos também pode interferir negativamente na osseointegração e formação do selamento biológico dos implantes orais. Desta forma, a modulação da atividade destas enzimas poderia favorecer tais eventos teciduais. Portanto, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito de dois inibidores de MMPs: naringenina (NA) e proantocianidinas (PA), na proliferação, adesão e controle da síntese e atividade de MMPs e TIMPs por fibroblastos gengivais e osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio (Ti) e expostos ao bisfosfonato ácido zoledrônico (AZ). Para tanto, discos de Ti serão individualmente acondicionados em placas de cultura de células e sobre estes, serão cultivados osteoblastos ou fibroblastos de gengiva (cultura primária, doador: n=1). Após 24 horas do cultivo, as células serão tratadas com concentração não citotóxica de NA e PA, previamente definida pela avaliação da viabilidade celular (prestoBlue), por 24 horas adicionais, seguido da exposição ao AZ (5 M) ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- 100 ng/mL, controle positivo para a produção dos mediadores avaliados) por diferentes períodos de contato. Assim, serão avaliados a proliferação (cyquant assay) e adesão celular (fluorescência direta), síntese de colágeno (sirius red), atividade gelatinolítica (zimografia in situ), expressão gênica (qPCR) e síntese (ELISA) de IL-6, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP)-1 e TIMP-2, bem como a capacidade de mineralização dos osteoblastos, a qual será avaliada por meio da atividade de fosfatase alcalina (ALP). Os dados quantitativos referentes às análises in vitro serão submetidos à análise estatística adequada, a partir da avaliação da distribuição e homocedasticidade dos dados. Os dados qualitativos serão avaliados descritivamente."

Objetivo da Notificação:

Avaliar o efeito de dois tipos de inibidores de metaloproteinases da matriz (MMPs), as proantocianidinas (PA), isoladas da semente de uva, e a naringenina (NA), obtida sinteticamente, sobre a viabilidade e proliferação celular, síntese de colágeno, expressão gênica, síntese e atividade de MMPs e TIMPs por fibroblastos de gengiva e osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio (Ti) e expostos ou não ao ácido zoledrônico (AZ).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não houve ocorrência de dano decorrente dos riscos previstos.

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

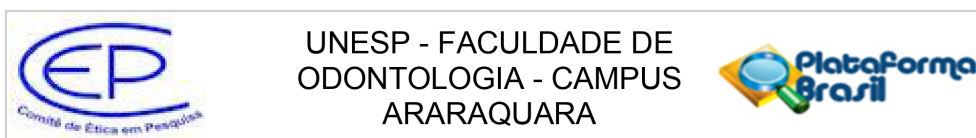
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep.foar@unesp.br



Continuação do Parecer: 6.708.151

Benefícios:

Os resultados desta pesquisa poderão resultar na criação de novo biomaterial e/ou tratamento, que acelere o reparo peri-implantar.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Trata-se de estudo nacional e unicêntrico, com financiamento próprio, com início previsto para 01/09/2021 e previsão de encerramento: 28/02/2023.

Financiamento: Auxílio Regular FAPESP e Bolsa de Doutorado FAPESP

Os critérios de inclusão são: paciente entre 18 e 25 anos, do sexo masculino, sistemicamente saudável, não -fumante.

Como critérios de exclusão tem-se: pacientes diabéticos, que sejam tabagistas e etilistas ou que façam uso de algum medicamento de uso contínuo.

O tamanho da amostra é de 1 doador de fragmento gengival.

Não houve uso de fontes secundárias de dados e retenção de amostras para armazenamento em banco.

Não houveram fatores que interferiram negativamente na execução do projeto.

A pesquisa resultou em diversas apresentações de trabalho: nacional e internacional, recebeu menção honrosa, artigo publicado em periódico internacional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o relatório final.

Recomendações:

Vide Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugere-se aprovação do relatório final da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Relatório Final APROVADO em reunião de 15 de março de 2024.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Relatorio_Final_Projeto.pdf	21/02/2024 08:27:58	Carlos Alberto de Souza Costa	Postado

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

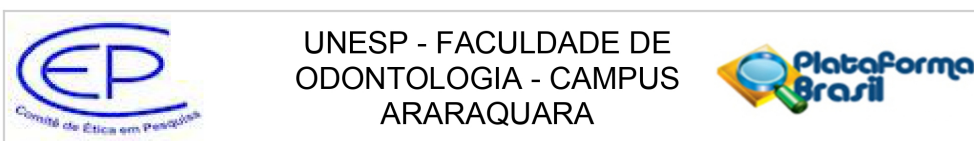
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep.foar@unesp.br



Continuação do Parecer: 6.708.151

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 18 de Março de 2024

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep.foar@unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 03 de junho de 2024.

Laís Medeiros Cardoso