

ANA JULIA MORENO BARRETO

**Análise do metabolismo ósseo sob influência do ácido
zoledrônico e dexametasona durante o processo de
reparo ósseo alveolar em camundongos C57Bl/6J**

ARAÇATUBA

2024

ANA JULIA MORENO BARRETO

**Análise do metabolismo ósseo sob influência do ácido
zoledrônico e dexametasona durante o processo de
reparo ósseo alveolar em camundongos C57Bl/6J**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – UNESP, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Assoc.
Mariza Akemi Matsumoto

Coorientadora: Prof^o. Dr^o. Assoc.
Antonio Hernandes Chaves Neto

ARAÇATUBA

2024

A minha família que como uma bússola, me apontou o Norte até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor Prof. Tit. Luciano Tavares Angelo Cintra.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2020/03723-7, por me dar a oportunidade de experienciar a vida científica.

À Prof^a. Dr^a. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto por me acolher gentilmente em seu grupo acadêmico desde o meu primeiro ano da graduação e a cada dia, pacientemente, me guiar para ser não somente uma aluna, mas uma pessoa melhor.

Ao Prof^o. Dr^o. Antonio Hernandes Chaves Neto que com sua bondade infinita auxiliou-me em diferentes etapas deste projeto.

Aos servidores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pessoas amáveis e prestativas.

Aos meus professores e pacientes, essenciais ao meu aprendizado.

Ao meu grupo de iniciação científica, Ana Carolina Bacelar, Ana Carolyn Becher Rosseno, André Oliva, Gustavo Simionato, Juliana Aguiar, Mariana Estochi, Nataira Momesso, Ramez Mahmuoud, Danilo Masocatto e Kim Henderson, tudo que sei hoje tem um pouco de cada um de vocês. Em especial a Raquel Parra, com quem tive o privilégio de compartilhar este projeto e minha caminhada

científica. E a Samyra Dote, uma grande amiga que tive o privilégio de conhecer neste grupo.

Aos meus amigos, André e Nicolle, que estiveram do meu lado em todas as etapas da graduação, vocês foram essenciais.

Aos meus avós, José Moreno e Flauzina Maria Luiz Moreno que me forneceram os recursos para vencer esta etapa.

À minha avó, Maria Aparecida Tragante que não pode estar comigo neste momento em vida, mas sempre estará em meus pensamentos.

Aos meus pais Antonio Carlos Barreto e Adriana Carla Moreno Barreto por serem meu refúgio, para onde sempre pude retornar nos dias difíceis.

À minha irmã Adrielli Cristina Moreno Barreto, minha fonte constante de inspiração, não somente na jornada acadêmica, mas na vida.

À Tiago Arielo, que tornou meus dias mais leves.

Às minhas tias, Elaine Moreno, Neusa Nicoletti e Rita Nicoletti, personificações de altruísmo.

A todos aqueles que precisaram perder para se encontrar.

“A dúvida é o primeiro passo para o conhecimento.”

Sócrates

BARRETO, A. J. M. **Análise do metabolismo ósseo sob influência do ácido zoledrônico e dexametasona durante o processo de reparo ósseo alveolar em camundongos C57Bl/6J.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A homeostasia do metabolismo ósseo pode ser influenciada por uma série de fatores incluindo os medicamentosos, não somente por aqueles que interferem diretamente nas células ósseas, mas também, pelos que atuam no sistema imunológico. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos sistêmicos causados pelas drogas ácido zoledrônico (ZL) e dexametasona (DX) por meio da análise dos níveis séricos de parâmetros relacionados ao metabolismo ósseo durante o curso do processo de reparo alveolar em camundongos C57Bl/6J. Para tanto, foram utilizados 40 camundongos da linhagem C57Bl/6J machos com idade entre 12 e 18 semanas, peso médio de 28 gramas, os quais foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito e divididos em quatro grupos distintos de acordo com o tratamento: Controle – tratados com 0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP, DX - 5 mg/Kg de DX IP, ZL - 50 µg/Kg de ZL IP e DX+ZL – 5mg/kg de DX IP e 50 ug/Kg de ZL IP. Os animais de todos os quatro grupos receberam os respectivos tratamentos uma vez por semana por quatro semanas previamente à exodontia, continuando até os períodos de eutanásias, de 7 e 30 dias, quando foram coletados o sangue, para análises dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL), TRAP total, cálcio e fósforo por meio de ensaios colorimétricos, bem como as maxilas contendo os alvéolos para análise histopatológica e histomorfométrica dos cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Os alvéolos do grupo Controle repararam sem intercorrências. Já os animais tratados com ZL e DX apresentaram reparo ósseo precoce e tardio, respectivamente, com aumento significativo de células ósseas e infiltrado inflamatório no grupo ZL aos 30 dias em comparação com os demais. Apesar disto, o tecido ósseo neoformado apresentava aspecto irregular, com áreas não viáveis. Níveis elevados de cálcio, fosforo e TRAP mostraram-se elevados no

grupo DX. Deste modo, concluiu-se que a administração das drogas ZL e DX interferiram nos níveis séricos de marcadores ósseos durante o curso do processo de reparo alveolar, levando ao seu aumento e também interferiram no reparo dos alvéolos, com formação precoce de osso irregular nos grupos ZL e tardio no grupo DX.

Palavras-Chave: Ácido Zoledrônico. Dexametasona. Metabolismo dos Ossos. Osteonecrose. Regeneração Óssea.

BARRETO, A. J. M. **Analysis of bone metabolism under the influence of zoledronic acid and dexamethasone during the alveolar bone repair process in C57Bl/6J mice.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The homeostasis of bone metabolism can be influenced by a series of factors including medications, not only those that directly interfere with bone cells, but also those that act on the immune system. The present study aimed to evaluate the systemic effects caused by the drugs zoledronic acid (ZL) and dexamethasone (DX), through the analysis of serum levels of interruptions related to bone metabolism during the course of the alveolar repair process in C57Bl/6J mice. To this end, 40 male mice of the C57Bl/6J lineage aged between 12 and 18 weeks, with an average weight of 28 grams, were used, which underwent extraction of the right upper incisor and were divided into four distinct groups according to the treatment: Control – treated with 0.05 ml of 0.9% physiological saline IP, DX - 5 mg/kg of DX IP, ZL - 50 µg/kg of ZL IP and DX+ZL – 5mg/kg of DX IP and 50 ug/ Kg of ZL IP. The animals in all four groups received the benefits of treatments once a week for four weeks prior to extraction, continuing until the euthanasia periods of 7 and 30 days, when blood was collected for analysis of serum alkaline phosphatase levels (FAL), total TRAP, calcium and phosphorus through colorimetric assays, as well as the maxillae containing the alveoli for histopathological and histomorphometric analysis of sections stained with hematoxylin and eosin (HE). The alveoli in the Control group repaired uneventfully. The animals treated with ZL and DX showed early and late bone repair, respectively, with a significant increase in bone cells and inflammatory infiltrate in the ZL group at 30 days compared to the others. Despite this, the newly formed bone tissue presented an irregular appearance, with non-viable areas. Elevated levels of calcium, phosphorus and TRAP were elevated in the DX group. Therefore, it was concluded that the administration of the drugs ZL

and DX interfered with the serum levels of bone markers during the course of the alveolar repair process, leading to their increase and also interfered with the repair of the alveoli, with early formation of irregular bone in the groups ZL and late in the DX group.

Keywords: Zoledronic Acid. Dexamethasone. Bone Metabolism. Osteonecrosis. Bone Regeneration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Grupo Controle 7 dias – Observam-se áreas de tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado (#) permeado por infiltrado inflamatório (setas). Periféricamente, nota-se intensa atividade osteogênica com a presença de tecido ósseo neoformado (*) (HE, aumento original 100x). Grupo Controle 30 dias – Observam-se trabéculas ósseas maduras com espaços medulares bem definidos (*) constituídos por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado (#) e infiltrado por leucócitos (setas) (HE, aumento original 100x).....23
- Figura 2 – Grupo DX 7 dias – Observa-se tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado (#) moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares (setas). Nota-se ainda a deposição de tecido ósseo neoformado (*) (HE, aumento original 100x). Grupo DX 30 dias - Observa-se extensas áreas de tecido ósseo neoformado (*) entremeado à tecido conjuntivo frouxo (#). (HE, aumento original 100x).....24
- Figura 3 – Grupo ZL 7 dias – Nota-se célere deposição de tecido ósseo com a presença de trabéculas ósseas irregulares, áreas com ausência de osteócitos em suas lacunas (*) e espaços medulares difusos (HE, aumento original 100x). Grupo ZL 30 dias – Destacam-se trabéculas ósseas irregulares não viáveis (*) com espaços medulares infiltrados por células mononucleares (#) (HE, aumento original 100x).....25
- Figura 4 – Grupo DX+ZL 7 dias - Observa-se tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado (#) com deposição de tecido ósseo primário (*) (HE; aumento original 100x). Grupo DX+ZL 30 DIAS - Nota-se tecido ósseo maduro (*) com espaços medulares definidos (#) e focos de intenso infiltrado inflamatório mononuclear (setas) (HE; aumento original 100x).....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido.....	19
Tabela 2 - Média e desvio padrão da análise quantitativa dos parâmetros histológicos dos alvéolos em reparação nos diferentes grupos e períodos.....	27
Tabela 3 - Média e desvio padrão obtida a partir dos níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e TRAP.....	28

SUMÁRIO

<i>1 Introdução.....</i>	<i>15</i>
<i>2 Proposição</i>	<i>18</i>
<i>3 Materiais e Métodos.....</i>	<i>20</i>
<i>4 Resultados</i>	<i>25</i>
<i>5 Discussão</i>	<i>32</i>
<i>6 Conclusão.....</i>	<i>36</i>
<i>7 Referências</i>	<i>37</i>
Anexo A – Comitê de ética	44

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa onde o objetivo final é a eliminação da causa inicial da lesão celular e das consequências desta lesão [1]. Os glicocorticóides são hormônios esteroides essenciais à vida, desempenhando um papel relevante na saúde e na doença [2]. Aqueles denominados endógenos, são secretados pelas glândulas supra-renais e encontram-se envolvidos na modulação da resposta ao estresse e ao ritmo circadiano [2]. Já suas formas farmacológicas atuam praticamente em todos os tipos celulares por possuírem receptores que alteram a expressão e sinalização de genes, por este motivo, são utilizadas como potentes agentes imunossupressores, anti-inflamatórios, prescritos no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como asma, choque alérgico e artrite [2].

No entanto, a exposição prolongada a este tipo de medicamento pode predispor o indivíduo a desenvolver, dentre várias patologias, a osteonecrose em ossos endocondrais, como ilíaco e fêmur, sendo caracterizada pelo comprometimento do suprimento sanguíneo e consequentemente a morte óssea [3;4].

Sabe-se que há diversos mecanismos que levam estes medicamentos a causarem a patologia, como a inibição da angiogênese, hipercoagulação e apoptose das células endoteliais e de osteócitos [3]. No entanto, danos aos vasos sanguíneos que suprem os ossos, desempenham um papel primordial na patogênese da doença independentemente da região do corpo que a mesma se instale [4].

De modo diferente, as osteonecroses que acometam exclusivamente os maxilares, denominadas Osteonecroses dos Maxilares relacionadas à Medicamentos (OMs), representam uma condição rara, porém importante, uma vez que comprometem gravemente a qualidade de vida dos pacientes acometidos [5]. Clinicamente, são caracterizadas por tecido ósseo exposto na cavidade bucal que não cicatriza dentro de 8 semanas em pacientes que estão

ou estiveram sob tratamento com bifosfonatos (BPs), denosumab ou drogas antiangiogênicas e não foram submetidos à radioterapia na região craniofacial nem tampouco apresentam evidências de doenças malignas no local [6]. Inicialmente descrita por Marx (2005), foi por ele denominada de BRONJ (do inglês Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws) uma vez que a droga relacionada ao desenvolvimento desta intrigante condição eram os bifosfonatos nitrogenados (nBPs).

Os nBFs, correspondem a um grupo de agentes farmacológicos que atuam na inibição de osteoclastos e consequentemente na reabsorção óssea, sendo amplamente utilizados no tratamento da osteoporose, Doença de Paget e metástases ósseas de tumores malignos [7]. Entre os tipos de nBPs, o ácido zoledrônico (AZ) destaca-se sendo o mais recomendado, sua utilização para tratamento de osteoporose contribui para o desenvolvimento a BRONJ onde, a via de administração e tempo de uso do AZ, são determinantes para o surgimento da patologia [8]. Não obstante, quando combinado com o glicocorticóide dexametasona, é comumente utilizado nas terapias para o tratamento de câncer. Nesta circunstância, diversos estudos apontam que as associações entre ambas as drogas levam ao retardo da cicatrização óssea e consequentemente a BRONJ [7]. Dentre os fatores de risco desencadeantes das OM, destacam-se as cirurgias bucais e associações entre drogas, uma vez que a OM, quando observada em humanos, é sempre acompanhada de uma doença de base, a qual submete o paciente a uma quantidade considerável de medicamentos [9].

No entanto, ao utilizar modelos animais no estudo da OM, sabe-se que a presença das doenças de base não constitui um fator impeditivo para investigação de sua etiopatogenia e desenvolvimento [10;11], sendo neles possível combinar tratamentos antirreabsortivos e fatores de risco, não só delineando características clínicas, patológicas e histológicas da doença isoladamente [12], mas também traçando possíveis caminhos preventivos e curativos da OM. Em virtude da importância do modelo animal para auxiliar no entendimento desta doença, os camundongos C57BL-6J apresentam características relevantes para tal objetivo, uma vez que possuem sua linhagem

inteiramente descrita, genoma mapeado, além de serem sensíveis a perturbações que induzem a perda óssea [13].

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos causados pelas drogas ácido zoledrônico e dexametasona, isoladamente e associadas, por meio da análise dos níveis séricos e parâmetros histológicos relacionados ao metabolismo ósseo durante o curso do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos C57Bl/6J.

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

Para a presente pesquisa, foram utilizados 40 camundongos da linhagem C57Bl/6J machos com idade entre 12 e 18 semanas, peso médio de 28 gramas, divididos em 4 grupos distintos e analisados em dois períodos experimentais (n=5 por grupo para os períodos de 7 e 30 dias). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água a vontade e ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) sem restrição, com exceção dos três primeiros dias após exodontia, quando a ração foi pastosa. Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram tratados conforme Tabela 1 por 4 semanas e posteriormente, até os momentos das eutanásias. O presente projeto foi encaminhado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em animais da FOA/UNESP, seguindo-se as normas vigentes pelo CONCEA (#00262-2019) (anexo A).

3.2 Procedimento Cirúrgico e tratamento

Inicialmente os animais foram submetidos à sedação profunda administrada via intraperitoneal (IP), utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina (75 mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Foi realizada a antissepsia da cavidade bucal com polivinilpirrolidona 1% tópica (PVPI) (Dermoidine® - Gessy Lever Industrial Ltda.) e montagem dos campos cirúrgicos estéreis. Foi realizada incisão sulcular ao redor do dente incisivo superior (ICS) direito com lâmina de bisturi número 15c. Em ato contínuo, foi realizado divulsão da mucosa inserida com auxílio de uma sonda exploradora adaptada, conforme previamente descrito na literatura, a mesma utilizada para luxação e extração propriamente dita (Bigueti et al., 2018). Imediatamente após

o procedimento cirúrgico, todos os animais foram encaminhados e mantidos em ambiente apropriado até sua completa recuperação.

Tabela 1. Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido.

Grupo	n	Tratamento
Grupo Controle	10	Controle – 0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP 1x por semana.
Grupo DX	10	Dexametasona – 5 mg/Kg IP de dexametasona (SigmaAldrich, Dexamethasone), 1x por semana.
Grupo ZL	10	Ácido zoledrônico – 50 µg/Kg IP de ácido zoledrônico (Sigma-Aldrich, Zoledronic acid monohydrate) 1x por semana.
Grupo DX+ZL	10	Dexametasona – 5 mg/Kg IP de dexametasona (SigmaAldrich, Dexamethasone). Ácido zoledrônico – 50 µg/Kg IP de ácido zoledrônico (Sigma-Aldrich, Zoledronic acid monohydrate) 1x por semana.

Fonte: Bi et al., 2010; Shuai et al., 2014; Khajuria et al., 2015

3.3 Eutanásia dos animais, coleta de amostras e análises dos níveis séricos de fosfatase alcalina, TRACP total, cálcio e fósforo

Os animais foram selecionados ao acaso em número de 5 por grupo nos períodos de 7 e 30 dias após o procedimento cirúrgico, sendo inicialmente sedados e posteriormente decapitados com guilhotina para proceder a coleta das maxilas e cerca de 2 ml de sangue de cada animal, imediatamente transferidos para tubos heparinizados a fim de se obter o plasma por centrifugação (1.000 x g, 4o C, por 10 minutos). As amostras de plasma foram coletadas e armazenadas em freezer a -80o C para a realização das análises no período de 7 e 30 dias. As concentrações de cálcio e fosfato foram determinadas por métodos colorimétricos de ponto final baseado na sua reação com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta que é medido em 570nm. A concentração de fósforo inorgânico foi determinada por método de

fotometria em ultravioleta de ponto final baseado na sua reação com o fósforo inorgânico da amostra que reage com o heptamolibdato de amônia em meio fortemente ácido, formando um complexo de fosfomolibdato cuja absorbância em 340 nm é proporcional à concentração de fósforo na amostra. As concentrações de cálcio e fósforo plasmáticas foram expressas em mg/dL (Connerty; Briggs, 1966; Daly; Ertingshausen, 1972). A análise bioquímica da fosfatase alcalina (FAL) plasmática foi determinada pelo método colorimétrico modificado adaptado (Granjeiro et al., 1997; Chaves-Neto et al., 2012). A atividade enzimática foi determinada a 37 °C em tampão glicina (pH 9,4), contendo 2,0 mmol/L do substrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP, Sigma, St. Louis, EUA) e 2,5 mmol/L de cloreto de magnésio (MgCl₂, Sigma, St. Louis, EUA). A formação de p-nitrofenil (p-NP) foi determinada colorimetricamente pela leitura da absorbância a 405 nm, usando um coeficiente de extinção molar de 18.000 M⁻¹ cm⁻¹. A atividade enzimática da FAL foi expressa em Unidades Internacionais (U/L), onde uma unidade corresponde a quantidade necessária de enzima que catalisa a transformação de 1 µmol/L de substrato por minuto, por litro de plasma. A análise bioquímica da TRACP total plasmática foi determinada pelo método colorimétrico modificado adaptado (Granjeiro et al., 1997; Brasilino et al., 2018). A atividade enzimática foi determinada à 37 °C em tampão acetato de sódio (pH 5,8), contendo 5 mmol/L do substrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP, Sigma, St. Louis, EUA) na presença de 50 mM tartarato de sódio e 1 mmol/L p-hidroximercuribenzoato, um inibidor de fosfatases ácidas de baixo peso molecular, (p-HMB, Sigma, St. Louis, EUA). A formação de p-nitrofenil (p-NP) foi determinada colorimetricamente pela leitura da absorbância a 405 nm, usando um coeficiente de extinção molar de 18.000 M⁻¹ cm⁻¹. A atividade enzimática residual corresponde a TRACP total foi expressa em Unidades Internacionais (U/L), onde uma unidade corresponde a quantidade necessária de enzima que catalisa a transformação de 1 µmol/L de substrato por minuto, por litro de soro. Após a coleta do sangue, extraiu-se as maxilas contendo os alvéolos, estas foram dissecados e imediatamente imersas em frascos individuais contendo formalina a 10% tamponada.

3.4 Procedimentos histotécnicos

Após o período máximo de fixação de 48 horas, os espécimes foram acondicionados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 10 dias aproximadamente, até que não apresentem resistência ao corte com navalha. As amostras foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido transversal dos alvéolos, utilizando-se micrótomo Leica RM. É obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE).

3.5 Análise histopatológica descritiva e histomorfométrica

A análise qualitativa dos defeitos foi feita em todos os cortes corados em HE, considerando-se a presença de tecido de granulação, grau de maturação do tecido ósseo, presença ou ausência de sequestros ósseos, presença ou ausência de biofilme microbiano e padrão de resposta inflamatória. A análise quantitativa foi realizada após a captura de 10 campos da região média do alvéolo em objetiva de 100x utilizando um retículo de 120 pontos pelo software ImageJ (Version 1.51, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA). Os pontos coincidentes com as células osteoblásticas, osteoclastos, fibroblastos, osteócitos, matriz óssea, fibras colágenas, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório foram contabilizados e submetidos a tratamento estatístico.

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir das análises quantitativas foram submetidos a teste de normalidade Shapiro Wilk e submetidos ao teste Kruskal Wallis seguido de Dunn para comparações múltiplas considerando o nível de significância de 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise histopatológica descritiva

Grupo Controle - Aos 7 dias, os alvéolos dos animais do Grupo Controle apresentavam-se preenchidos predominantemente por tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado, com discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso e polimorfonuclear perivascular. Periféricamente, detectou-se a presença ora de atividade osteogênica com deposição de tecido ósseo primário, ora de trabéculas imaturas e irregulares ricas em osteócitos. Aos 30 dias, observou-se alvéolos preenchidos por tecido ósseo maduro em remodelação, ora revestidas por células de revestimento, ora por células osteoblásticas. De permeio, os espaços medulares encontravam-se organizados (Figura 1).

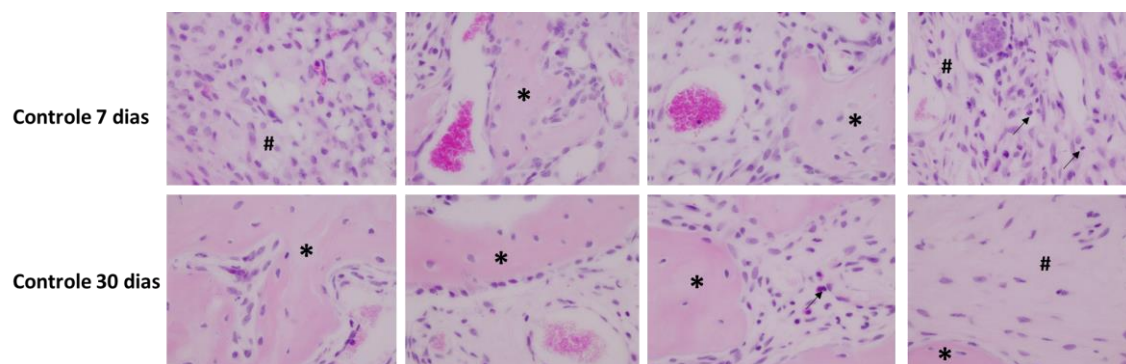


Figura 1 – Grupo Controle 7 dias – Observam-se áreas de tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado (#) permeado por infiltrado inflamatório (setas). Periféricamente, nota-se intensa atividade osteogênica com a presença de tecido ósseo neoformado (*) (HE, aumento original 100x). **Grupo Controle 30 dias** – Observam-se trabéculas ósseas maduras com espaços medulares bem definidos (*) constituídos por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado (#) e infiltrado por leucócitos (setas) (HE, aumento original 100x).

Fonte: Autor, 2021.

Grupo DX – No período de 7 dias foi possível notar alvéolos preenchidos por tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado, moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares. Na periferia dos alvéolos, observaram-se trabéculas ósseas irregulares e imaturas, bem como focos de infiltrado inflamatório polimorfonuclear neutrofílico em meio a macrófagos de aspecto pseudo-xantomatoso. Aos 30 dias, foi possível notar que os alvéolos ainda permaneciam preenchidos por tecido ósseo predominantemente imaturo, apresentando trabéculas irregulares ricas em osteócitos. Eventualmente, ainda se observavam áreas de osteogênese. Os espaços medulares encontravam-se constituídos por tecido conjuntivo frouxo (Figura 2).

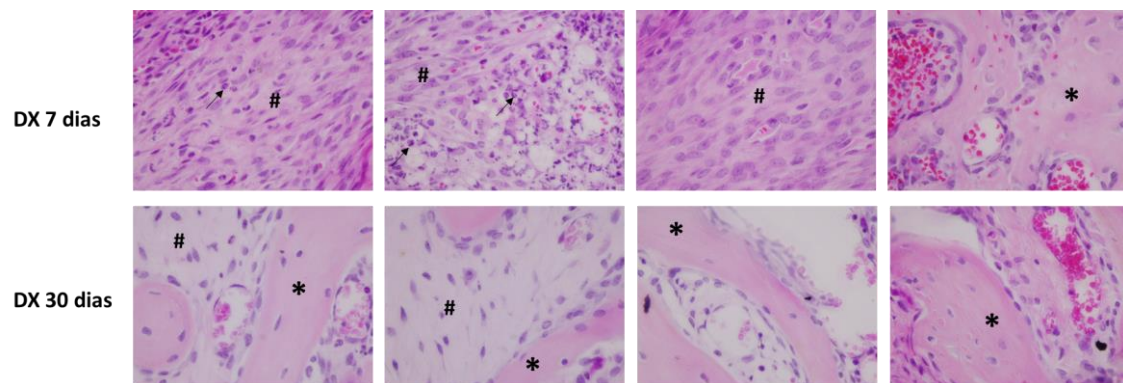


Figura 2 – Grupo DX 7 dias – Observa-se tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado (#) moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares (setas). Nota-se ainda a deposição de tecido ósseo neoformado (*) (HE, aumento original 100x).
Grupo DX 30 dias - Observa-se extensas áreas de tecido ósseo neoformado (*) entremeado à tecido conjuntivo frouxo (#). (HE, aumento original 100x).

Fonte: Autor, 2021.

Grupo ZL – Aos 7 dias os alvéolos apresentaram-se preenchidos por áreas de coágulo e tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado. Observou-se intensa deposição de fibras colágenas pelos fibroblastos. Na periferia dos alvéolos, observaram-se trabéculas ósseas em formação, irregulares e grosseiras, já com áreas de ausência de osteócitos em sua lacuna.

No período de 30 dias, observaram-se alvéolos preenchidos por trabéculas ósseas irregulares ora de aspecto não-viável com numerosas lacunas vazias de osteócitos, ora com áreas de neoformação óssea, associadas a presença de osteoclastos. Notou-se ainda, focos de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear nos espaços medulares (Figura 3).

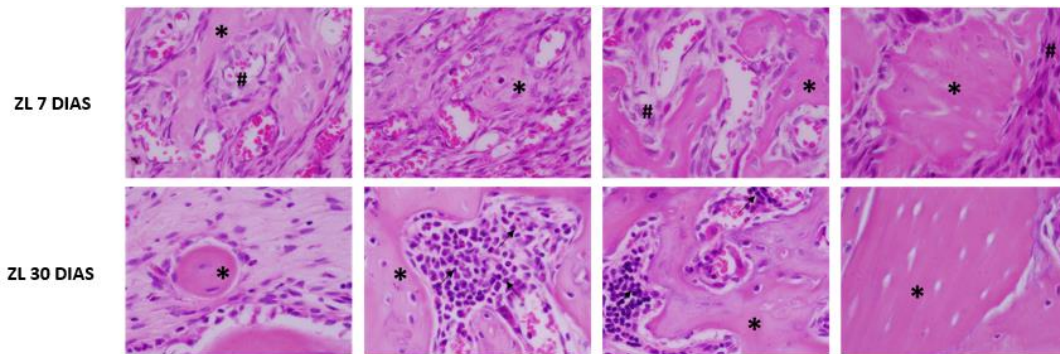


Figura 3 – Grupo ZL 7 dias – Nota-se célere deposição de tecido ósseo com a presença de trabéculas ósseas irregulares, áreas com ausência de osteócitos em suas lacunas (*) e espaços medulares difusos (HE, aumento original 100x). **Grupo ZL 30 dias** – Destacam-se trabéculas ósseas irregulares não viáveis (*) com espaços medulares infiltrados por células mononucleares (#) (HE, aumento original 100x).

Fonte: Autor, 2021.

Grupo DX+ZL - Após 7 dias, os alvéolos do grupo DX+ZL encontravam-se preenchidos por tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado com discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Na periferia do alvéolo observou-se neoformação óssea. Aos 30 dias, o grupo DX+ZL apresentou alvéolos preenchidos por tecido ósseo maduro em meio a medula óssea predominantemente constituída por tecido conjuntivo, apresentando focos de intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figura 4).

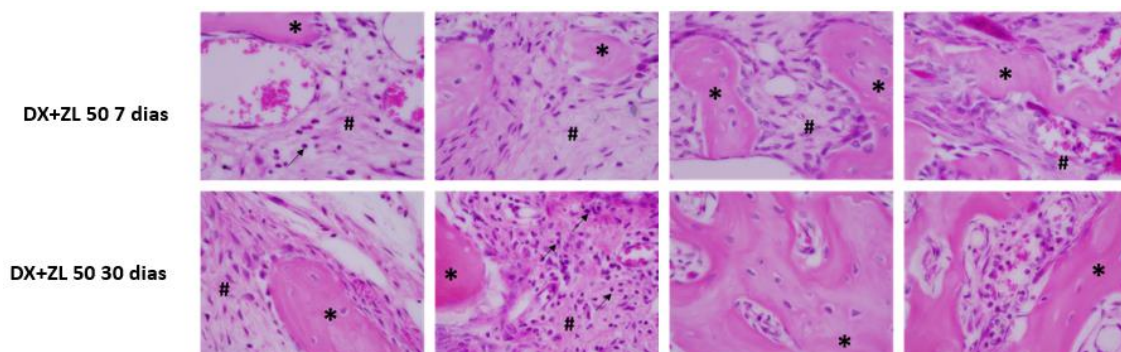


Figura 4 – Grupo DX+ZL 7 dias - Observa-se tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado (#) com deposição de tecido ósseo primário (*) (HE; aumento original 100x). **Grupo DX+ZL 30 DIAS** - Nota-se tecido ósseo maduro (*) com espaços medulares definidos (#) e focos de intenso infiltrado inflamatório mononuclear (setas) (HE; aumento original 100x).

Fonte: Autor, 2021.

4.2 Análise histomorfométrica

Os dados obtidos a partir da quantificação dos parâmetros histológicos foram inicialmente analisados para distribuição de normalidade pelo teste Shapiro Wilk e submetidos ao teste Kruskal Wallis seguido de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

A análise de fibroblastos no período de 7 dias permitiu constatar diferenças estatísticas significativas entre o grupo DX e DX+ZL, onde o grupo DX apresentou maior densidade de área de fibroblastos quando comparado com o grupo DX+ZL. Considerando-se o parâmetro vasos sanguíneos, o mesmo mostrou-se significativamente elevado no grupo DX+ZL em comparação com o DX.

Aos 30 dias a análise de osteoblastos, osteoclastos aderidos, lacunas vazias de osteócitos detectaram aumento significativo na densidade de área no grupo ZL quando comparado com os grupos Controle, DX e DX+ZL. Neste mesmo período a análise do infiltrado inflamatório mononuclear revelou densidade de área significativamente maior no grupo ZL quando comparado com os grupos DX e DX+ZL.

O período de 7 dias e 30 dias para a contagem de osteoclastos aderidos, matriz óssea, fibras colágenas e infiltrado inflamatório polimorfonuclear não apresentou diferenças estatísticas relevantes conforme mostram a Figura 3 e Tabela 2.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da análise quantitativa dos parâmetros histológicos dos alvéolos em reparação nos diferentes grupos e períodos.

Grupos e períodos/ Parâmetros	Controle 7 dias	Controle 30 dias	DX 7 dias	DX 30 dias	ZL 7 dias	ZL 30 dias	DX+ZL 7 dias	DX+ZL 30 dias
Osteoblastos	2,333 ± 3,224	1,7 ± 1,368	2,95 ± 6,022	2,815 ± 2,573	4,633 ± 5,102	9,161 ± 5,52	4,8 ± 3,225	2,48 ± 2,053
Osteoclastos aderidos	0,08333 ± 0,2793	0,03333 ± 0,1826	0 ± 0	0 ± 0	0,2333 ± 0,4302	0,2 ± 0,4104	0 ± 0	0,2 ± 0,4949
Osteoclastos desaderidos	0,04167 ± 0,2887	0,06667 ± 0,2537	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,4026	1,1 ± 1,021	0,3 ± 0,6749	0,16 ± 0,4219
Fibroblastos	9,333 ± 5,109	2,967 ± 2,526	19,69 ± 9,407	5,074 ± 4,028	8,9 ± 6,424	6,25 ± 5,118	5,5 ± 3,308	4,2 ± 4,903
Vasos sanguíneos	14,77 ± 15,16	18 ± 13,93	7,85 ± 10,17	20,96 ± 15,9	11,83 ± 8,615	11,74 ± 12,47	33,5 ± 16,93	11,96 ± 11,52
Matriz óssea	23,29 ± 25,04	59,07 ± 24,13	12,3 ± 19,91	41,89 ± 22,52	30,33 ± 29,01	35,31 ± 26,68	51,04 ± 30,63	51,04 ± 30,63
Fibras colágenas	61,9 ± 29,23	33,57 ± 21,27	71,85 ± 22,8	37,41 ± 21,14	48,1 ± 27,72	30,8 ± 26,01	40,2 ± 17,71	42,02 ± 29,45
Infiltrado inflamatório	1,292 ± 1,336	1,8867 ± 2,193	2,2 ± 3,503	0,5556 ± 0,974	1,367 ± 2,22	5,905 ± 4,857	0,7 ± 1,059	1,84 ± 3,279
Mononuclear	0,2708 ± 0,5355	0,9 ± 1,626	0,5 ± 1,792	0,2963 ± 0,6688	0,4667 ± 1,042	2,5 ± 2,705	0,1 ± 0,3162	0,94 ± 2,208
Polimorfonuclear	0,9792 ± 1,176	1 ± 1,287	1,7 ± 1,976	0,2593 ± 0,4466	0,8667 ± 1,57	0,75 ± 0,8507	0,5 ± 0,7071	0,94 ± 2,208

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período experimental ($p \leq 0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Fonte: Autor, 2021.

4.3 Análise bioquímica

As análises bioquímicas para detecção dos níveis plasmáticos de cálcio, fósforo, FAL e TRAP foram realizadas somente a partir do sangue coletado no período de 30 dias pós-operatório. Os níveis séricos de cálcio plasmático apresentaram-se significativamente elevados no grupo DX ($10,51 \pm 1,751$) em comparação com

os grupos ZL ($7,357 \pm 1,035$) e DX+ZL ($7,725 \pm 1,405$). Com relação ao fósforo, o grupo DX ($7,60 \pm 1,22$) apresentou níveis significativamente elevados em comparação com ZL ($5,26 \pm 1,33$). O grupo DX também apresentou níveis significativamente aumentados de TRAP total ($3,614 \pm 1,255$) em comparação com ZL ($2,098 \pm 0,1901$) e DX+ZL ($2,158 \pm 0,4479$). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos no parâmetro FAL (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvios-padrões obtidos a partir das análises bioquímicas dos marcadores de metabolismo ósseo.

	C	ZL	DX	DX+ZL
Cálcio (mg/dL)	$8,318 \pm 1,672$	$7,357 \pm 1,035^a$	$10,51 \pm 1,751^{ab}$	$7,725 \pm 1,405^b$
Fósforo (mg/dL)	$6,934 \pm 0,7403$	$5,260 \pm 1,331^a$	$7,600 \pm 1,219^a$	$6,542 \pm 1,503$
FAL (U/L)	$2,205 \pm 0,3888$	$2,115 \pm 0,2025$	$2,366 \pm 0,1874$	$2,26 \pm 0,2369$
TRAP (U/L)	$2,955 \pm 1,217$	$2,098 \pm 0,1901^a$	$3,614 \pm 1,255^{ab}$	$2,158 \pm 0,4479^b$

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período experimental ($p \leq 0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Fonte: Autor, 2021.

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

Os BFs vêm sendo utilizados desde 1960 para o tratamento de metástases ósseas, câncer de pulmão, mieloma múltiplo, doença de Paget, controle de doenças ósseas metabólicas, como a osteoporose, entre outros. Devido às variedades de tipos de BFs, como os nitrogenados e os não nitrogenados, via de administração e potência, a indicação destes medicamentos se dá pelo tipo e severidade da doença a ser controlada. Sabe-se que dentre os tipos de BFs, os nitrogenados mostram-se mais potentes, uma vez que a presença do nitrogênio e sua orientação na cadeia R2 da molécula, influenciam esta propriedade [14]. Dentre os nBFs, considera-se o ZL como sendo o de maior potência, pela sua utilização, a possibilidade de instalação e desenvolvimento da OM tem sido relatada principalmente em doses elevadas e associados a outros medicamentos que possam alterar o sistema imunológico do indivíduo, como os anti-inflamatórios esteroidais [15;16]. No entanto, estudos que analisem os efeitos de baixas doses do ZL ainda são escassos [17;18]. Deste modo, propôs-se o presente estudo, uma vez que o uso da dexametasona é relativamente frequente e pode ser associada ao ZL.

Considerando-se o processo de reparo alveolar, foram observadas diferenças histopatológicas importantes comparando-se os quatro grupos. Os animais do grupo Controle tiveram seus alvéolos reparados sem intercorrências, estando preenchidos por tecido ósseo em remodelação no período de 30 dias. Já os animais medicados com ZL revelaram alterações histopatológicas do tecido ósseo, mesmo com a dosagem utilizada, resultando em uma condição semelhante a OM, com aumento significativo de lacunas vazias de osteócitos, bem como do infiltrado inflamatório total e mononuclear em comparação com os demais grupos. Sabe-se que nestes modelos animais, a OM não se apresenta como em humanos considerando-se os critérios clínicos estabelecidos [6], sendo então denominada osteonecrose-like, uma vez que exhibe características histopatológicas e clínicas distintas [21]. A análise histomorfométrica revelou aumento significativo das células ósseas neste grupo no período de 30 dias, incluindo osteoclastos não aderidos à superfície óssea, os quais exibiam morfologia arredondada e por vezes volumosa, refletindo o efeito da medicação [21;23]. Justificando os níveis séricos para TRAP total significativamente

diminuídos nos animais medicados com ZL e DX+ZL em comparação com os animais DX.

O animais do grupo DX apresentaram atraso evidente em comparação com os demais, também identificado pela quantificação dos parâmetros histológicos com menor quantidade de células ósseas. Apesar de não terem sido detectadas diferenças estatísticas com relação à matriz óssea, neste grupo a mesma se apresentava imatura em comparação com os grupos Controle, ZL e DX+ZL. Porém, não foram encontradas evidências de OM. Possivelmente isto tenha ocorrido devido a dexametasona ser um glicocorticoide sintético que age no tecido retardando a formação óssea por meio da diferenciação e proliferação celular e indução da apoptose osteoblástica [24;25].

De modo interessante, os animais medicados com ambas as drogas, DX e ZL, exibiram padrão de reparo ósseo alveolar bastante satisfatório, sem as alterações observadas nos grupos DX e ZL separadamente. Desde o início do processo de reparação (7 dias) foi possível observar atividade osteogênica resultando em maturação das trabéculas ósseas aos 30 dias. Sabe-se que os glicocorticóides exercem efeitos diretos sobre eventos inflamatórios [26], bem como durante o processo de reparo de tecidos moles e duros, provocando a redução da síntese de colágeno e alterando as atividades das células osteoblásticas e osteoclásticas [27;28;29;30]. De acordo com Frenkel et al. (2015), doses farmacológicas desta droga influenciam diretamente a expressão de fatores de transcrição osteoblástica como osterix, Runx-2, FAL e osteocalcina. Ainda que não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de FAL séricos os demais marcadores de transcrição osteoblástica não foram analisados. Um estudo realizado sobre o efeito dose-resposta da dexametasona administrada no pré-operatório de ratos (4, 8 e 12mg/Kg) submetidos à extração de dentes primeiros molares inferiores, revelou que as doses mais altas do medicamento interferiram somente após 3 e 7 dias do reparo, com diferença na densidade e formação óssea, porém, sem significância no período pós-operatório de 40 dias [31]. Apesar de quantitativamente não terem sido reveladas diferenças no parâmetro matriz óssea, microscopicamente pode-se notar a presença de trabéculas ósseas imaturas ainda após 30 dias do reparo.

De fato, os glicocorticóides parecem exercer atividade dual sobre os osteoclastos uma vez que, inicialmente, altas concentrações destas drogas levam a um aumento da atividade dos osteoclastos seguida por um declínio com seu uso prolongado [32]. Nossos resultados mostraram níveis significativamente elevados de TRAP e cálcio no grupo DX em comparação ao ZL e DX+ZL, bem como aumento significativo de fósforo no grupo DX em comparação ao ZL. Possivelmente, em se tratando de área de reparação óssea decorrente de injúria sob tratamento contínuo com a dexametasona, os efeitos sobre os osteoclastos tenham sido prolongados, afetando a atividade osteoclástica e alterando a remodelação óssea. Os resultados verificados no grupo DX+ZL possivelmente se devem ao fato de que a dose e posologia do ZL utilizadas neste estudo não terem sido suficientes para influenciar negativamente o reparo ósseo intra-alveolar. Estudos experimentais para indução das OM's relacionadas ao uso de medicamentos usualmente utilizam altas doses de bifosfonatos nitrogenados de alta potência como o ZL, mimetizando protocolo para condições osteolíticas decorrentes de neoplasias malignas [33]. Esta indução é ainda mais efetiva quando associa-se ao bifosfonato drogas imunossupressoras como os glicocorticóides [34].

No entanto, no presente estudo optou-se pela utilização de uma baixa dose do zoledronato, indicada para o controle de osteoporose severa [8]. Apesar de nenhum dos animais apresentarem doenças de base que justificassem o tratamento com ZL, estudos prévios comprovam que animais saudáveis desenvolvem a OM, especialmente com altas doses deste tipo de bifosfonato [11;35]. Porém, os efeitos do bifosfonato de alta potência em baixas doses no reparo alveolar ainda são pouco explorados.

Deste modo, os resultados demonstraram que, sob os parâmetros analisados, a administração do ZL não influenciou negativamente a neoformação óssea, mas afetou de modo significativo a atividade osteoclástica pela diminuição da TRAP sérica em comparação com o grupo DX.

6 Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir deste estudo, nos permitiram concluir que a administração ainda que de baixas doses de ZL e de DX interferem no metabolismo do tecido ósseo e, portanto, no curso do processo de reparo alveolar dos camundongos C57BI-6J.

7 Referências

7. REFERÊNCIAS

1. Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
2. Han L, Wang B, Wang R, Gong S, Chen G, Xu W. The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):377.
3. Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine.* 2012;41(2):183-90.
4. Liu C, Janke LJ, Kawedia JD, Ramsey LB, Cai X, Mattano LA Jr, et al. Asparaginase Potentiates Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis in a Mouse Model. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151433.
5. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2014;72(10):1938–56.
6. Khan AA, Morrison A, Kendler DL, Rizzoli R, Hanley DA, Felsenberg D, et al. International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management from the International Task Force on ONJ. *J Clin Densitom.* 2017;20(1):8-24.

7. Liu J, Mattheos N, Su C, Deng C, Luo N, Wang Z, et al. The effects of icariin on wound healing of extraction sites with administration of zoledronic and dexamethasone: A rat model study. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(2):198-205.
8. Brozoski MA, Traina AA, Deboni MC, Marques MM, & Naclério-Homem. [Osteonecrose relacionada ao bisfosfonato da mandíbula]. *Revista brasileira de reumatologia.* 2012;52(2):265–70.
9. Bi Y, Gao Y, Ehrichtou D, Cao C, Kikuri T, Le A, et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol.* 2010;177(1):280-90.
10. Sharma D, Hamlet S, Petcu E, Ivanovski S. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws an appraisal. *Oral Dis.* 2013;19(8):747-54.
11. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(6):744-50.
12. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, de Molon RS, Bezouglaia O, Dry SM, et al. Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. *Bone.* 2016;90:133-41.
13. Raygorodskaya M, Gabet Y, Shochat C, Kobylansky E, Torchinsky A, Karasik D. Intrauterine stress induces bone loss in adult offspring of C3H/HeJ mice having high bone mass phenotype but not C57BL/6J mice with low bone mass phenotype. *Bone.* 2016;87:114-9.

- 14.** Hayer PS, Deane AK, Agrawal A, Maheshwari R, Juyal A. Effect of zoledronic acid on fracture healing in osteoporotic patients with intertrochanteric fractures. *Int J Appl Basic Med Res.* 2017;7:48–52.
- 15.** Park S, Kanayama K, Kaur K, Tseng HC, Banankhah S, Quje DT, et al. Osteonecrosis of the Jaw Developed in Mice: Disease variants regulated by $\gamma\delta$ T cells in oral mucosal barrier immunity. *J Biol Chem.* 2015;290(28):17349-66.
- 16.** Mergoni G, Vescovi P, Passerini P, Maestri R, Corradi D, Sala R, et al. Effects of zoledronic acid and dexamethasone on early phases of socket healing after tooth extraction in rats: A preliminary macroscopic and microscopic quantitative study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(3):339-45.
- 17.** Shuai B, Shen L, Yang Y, Ma C, Zhu R, Xu X. Assessment of the Impact of Zoledronic Acid on Ovariectomized Osteoporosis Model Using Micro-CT Scanning. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132104.
- 18.** Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Zoledronic acid in combination with alfacalcidol has additive effects on trabecular microarchitecture and mechanical properties in osteopenic ovariectomized rats. *J Orthop Sci* 2014;19(4):646–56.
- 19.** Liu Y, Cui Y, Chen Y, Gao X, Su Y, Cui L. Effects of dexamethasone, celecoxib, and methotrexate on the histology and metabolism of bone tissue in healthy Sprague Dawley rats. *Clin Interv Aging.* 2015;10 1245-53.
- 20.** Anastasilakis AD, Pepe J, Napoli N, et al. Osteonecrosis of the Jaw and Antiresorptive Agents in Benign and Malignant Diseases: A Critical

Review Organized by the ECTS. J Clin Endocrinol Metab. 2022;107(5):1441-60.

- 21.** Biguetti CC, De Oliva AH, Healy K, Mahmoud RH, Custódio IDC, Constantino DH, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. PLoS One. 2019;14(6):e0214173.
- 22.** Reszka AA, Rodan GA. Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. Mini Rev Med Chem. 2004;4(7):711-9.
- 23.** Mada EY, Santos AC, Fonseca AC, Biguetti CC, Neves FT, Saraiva PP, et al. Effects of green tea and bisphosphonate association on dental socket repair of rats. Arch Oral Biol. 2017;75:1-7.
- 24.** Moriishi T, Komori T. Glucocorticoid and Bone. The inhibition of osteoblast differentiation and induction of osteocyte apoptosis through the regulation of Bcl-2 by glucocorticoids. Clin Calcium. 2014;24(9):1329-36.
- 25.** Kang H, Chen H, Huang P, Qi J, Qian N, Deng L, et al. Glucocorticoids impair bone formation of bone marrow stromal stem cells by reciprocally regulating microRNA-34a-5p. Osteoporos Int. 2016;27(4):1493-1505.
- 26.** Kim D, Nguyen QT, Lee J, Lee SH, Janocha A, Kim S, et al. Anti-inflammatory Roles of Glucocorticoids Are Mediated by Foxp3+ Regulatory T Cells via a miR-342-Dependent Mechanism. Immunity. 2020;53(3):581-596.

- 27.** Li J, Wang X, Zhou C, Liu L, Wu Y, Wang D, et al. Perioperative glucocorticosteroid treatment delays early healing of a mandible wound by inhibiting osteogenic differentiation. *Injury*. 2012;43(8):1284–1289.
- 28.** Advani S, LaFrancis D, Bogdanovic E, Taxel P, Raisz LG, Kream BE. Dexamethasone suppresses in vivo levels of bone collagen synthesis in neonatal mice. *Bone*. 1997;20(1): 41–46.
- 29.** Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 2000;71(3):316–321.
- 30.** Durmus M, Karaaslan E, Ozturk E, Gulec M, Iraz M, Edali N, et al. The effects of single-dose dexamethasone on wound healing in rats. *Anesthesia and Analgesia*. 2003;97(5):1377–1380.
- 31.** de Lima TS, de O P Ribeiro A, Santos VBP, de Costa Neto OC, Marques DO, Queiroz TP, et al. Effects of different pre-operative doses of dexamethasone on alveolar repair in rats. *Arch Oral Biol*. 2020;110:104624.
- 32.** Hachemi Y, Rapp AE, Picke AK, Weidinger G, Ignatius A, Tuckermann J. Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture. *J Mol Endocrinol*. 2018;61(1):75-90.
- 33.** Ferreira GZ, Zen Filho EV, Rubira-Bullen I, Garlet GP, Santos CF, Santos, P. Delayed alveolar bone repair and osteonecrosis associated with Zoledronic Acid therapy in rats: macroscopic, microscopic and molecular analysis. *Journal of applied oral science: revista FOB*. 2020;28:e20200204.

- 34.** Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, Garrett N, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res.* 2010;25(6):1337-49.
- 35.** Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(5):390-6.

Anexo A – Comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado **"Localização e quantificação da expressão de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico durante o processo de reparo alveolar frente ao uso de bifosfonato de alta potência com ou sem associação de droga imunossupressora"**, Processo FOA nº 2019-262, sob responsabilidade de Mariza Akemi Matsumoto e colaboração de Raquel Barroso Parra da Silva, Cláudia Cristina Biguetti, Ana Julia Moreno Barreto e Antonio Hernandez Chaves Neto foi aprovado pela CEUA em 27 de Junho de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Localization and quantification of the enzymes expression of arachidonic acid metabolism during the alveolar repair process against the use of high potency bisphosphonate with or without association of immunosuppressive drug"**, Process FOA nº 2019-262, under the supervision of Mariza Akemi Matsumoto and collaboration of Raquel Barroso Parra da Silva, Cláudia Cristina Biguetti, Ana Julia Moreno Barreto and Antonio Hernandez Chaves Neto had its the Final Report approved by the CEUA on June, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br