

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de odontologia**  
**Programa de pós-graduação em Odontologia**

Caroline Andrade Maia

**Análise do padrão de resposta imunológica periapical relacionada  
ao uso dos bisfosfonatos frente à infecção endodôntica induzida  
em camundongos**

**Belo Horizonte**  
**2022**

Caroline Andrade Maia

**Análise do padrão de resposta imunológica periapical relacionada ao uso dos bisfosfonatos frente à infecção endodôntica induzida em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Warley Luciano Fonseca Tavares

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

Belo Horizonte  
2022

## Ficha Catalográfica

M217a Maia, Caroline Andrade.  
2022 Análise do padrão de resposta imunológica periapical  
T relacionada ao uso dos bisfosfonatos frente à infecção  
endodôntica induzida em camundongos / Caroline Andrade Maia.  
-- 2022.

46 f. : il.

Orientador: Warley Luciano Fonseca Tavares.  
Coorientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Ácido zoledrônico. 2. Camundongos. 3. Endodontia. 4.  
Doenças da polpa dentária. I. Tavares, Warley Luciano  
Fonseca. II. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino . III.  
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de  
Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

### FOLHA DE APROVAÇÃO

#### ANÁLISE DO PADRÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIAPICAL RELACIONADA AO USO DOS BISFOSFONATOS FRENTE À INFECÇÃO ENDODÔNTICA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS

**CAROLINE ANDRADE MAIA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração ENDODONTIA.

Aprovada em 20 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Warley Tavares - Orientador  
UFMG

Prof(a). Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho  
UFMG

Prof(a). Ana Cecilia Diniz Viana  
UFMG

Prof(a). Gustavo de Cristóforo Almeida  
NEWTON PAIVA

Belo Horizonte, 20 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Warley Luciano Fonseca Tavares, Coordenador(a)**, em 20/07/2022, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cecilia Diniz Viana, Chefe de departamento**, em 20/07/2022, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo De Cristofaro Almeida, Usuário Externo**, em 20/07/2022, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho, Professor do Magistério Superior**, em 27/07/2022, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1598658** e o código CRC **8BE57319**.

Dedico esse trabalho a minha Família meus pais Helcio, Aparecida, minha irmã Gabriele e meu namorado Humberto, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu já duvidava durante essa caminhada. São meus maiores exemplos de pessoas. É com muito amor que lhes dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por iluminar e abençoar meu caminho. Obrigada por me carregar no colo nos momentos difíceis, por me fazer compreender que tudo tem o seu TEMPO.

Aos meus pais por todo apoio e carinho, sempre sendo compreensíveis e apoiadores em todos os momentos. Sem vocês, essa caminhada não teria sequer começado. Agradeço por terem cultivado em mim valores que me transformaram na mulher que sou hoje.

A minha irmã Gabriele por todo carinho, amor, atenção e companheirismo, por dividir mais uma etapa importante da minha vida comigo e sempre estar disponível ali para ajuda e apoiar. Saiba que sem o seu apoio e companheirismo desde a infância, jamais teria chegado aonde cheguei. Muito obrigada!

Ao meu namorado Humberto Pacheco. Muito obrigada por entender meus momentos de ausência, ansiedade e stress. A você, meu muito obrigada por estar ao meu lado em mais esta conquista! Não existem palavras para explicar e agradecer a sua importância em minha vida. Citações e palavras são insignificantes, perto do que você faz e significa para mim.

Aos meus familiares por todo apoio, carinho e orações. Em especial a minha Avó Maria do Carmo (*in memoriam*), que foi um exemplo de mulher batalhadora e guerreira. E eu sei que ela estaria hoje com o maior orgulho do mundo da neta.

Aos meus sogros, Francisco e Gracielle, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho.

Aos amigos que fiz ao longos da vida, muito obrigada por todo apoio e carinho.

Aos meus colegas de Pós-graduação Hebertt Chaves, Isabella Macedo e Isabella Costa. Em Especial ao meu companheiro de biotério, laboratório e análises, Hebertt Chaves, que esteve comigo em todos os momentos de alegrias e apertos, que me apoiou nas horas difíceis e que sempre estava ali disposto a ajudar. Muito obrigada meu amigo!!!

Ao meu Orientador Professor Doutor Warley Luciano Fonseca Tavares por sempre estar disposto em ajudar e assim guiar meus primeiros passos e contribuir para a realização desse trabalho e concretização de um sonho. E ao coorientador Professor Doutor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho pela disponibilidade para que esse trabalho fosse concretizado.

A Professora Doutora Francine Benetti pela paciência, sabedoria, compreensão, estímulo, dedicação e auxílio. Sua presença nesta etapa da minha vida foi fundamental. Obrigada pela oportunidade de aprender com você, pelo carinho, pela confiança e pelos ensinamentos!

Aos Professores do Mestrado, que tanto contribuíram para minha formação pessoal e profissional, Ana Cecilia Diniz Vianna, Izabel Peixoto e Juliana Vilela Bastos.

A FAPEMIG pela concessão da minha bolsa de mestrado, apoio financeiro e, dessa forma, possibilitar a minha dedicação exclusiva ao Mestrado.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o SENHOR, o seu Deus, estará com você por onde você andar”

Josué 1:9

## RESUMO

As drogas antirreabsortivas são drogas utilizadas no mundo todo para tratar patologias ósseas como a osteoporose e outras doenças ósseas sistêmicas. No presente estudo examinamos os efeitos do Ácido Zoledrônico (ZOL) no desenvolvimento de Lesão Periapical (PL) em camundongos. Os objetivos desse estudo foram: 1. Analisar o efeito do uso do Ácido Zoledrônico sobre a formação da lesão periapical. 2. Analisar o efeito da exposição pulpar sobre as citocinas nos tecidos perirradiculares de camundongos tratados com Ácido Zoledrônico. 3. Comparar as citocinas nos tecidos perirradiculares de camundongos tratados com Ácido Zoledrônico com camundongos não tratados. 4. Analisar e comparar por meio do exame de MicroCT a reação dos tecidos perirradiculares de camundongos tratados com Ácido Zoledrônico com camundongos não tratados. Para as análises experimentais foram utilizados 16 camundongos fêmeas Balb/C (6 semanas) divididos em dois grupos experimentais Grupo Controle (animais que receberam aplicação de soro) e Grupo Ácido (animais que receberam aplicação de Ácido Zoledrônico) sendo cada grupo composto por 8 animais. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos, Grupo A sacrificados com 7 dias após a realização do experimento e Grupo B sacrificados com 21 dias após a realização do experimento, cada subgrupo foi composto por 4 animais. Após a divisão dos grupos, foi realizada a indução da medicação uma vez por semana durante 4 semanas por via intraperitoneal. O Grupo Controle recebeu aplicação de Solução de Salina de NaCl a 0,9%. Já o Grupo Ácido recebeu aplicação de 125 µg/kg de Ácido Zoledrônico solução injetável 4 mg/5mL diluído em solução estéril a 0,9%. Após a indução da droga foi realizado a exposição pulpar do primeiro molar superior esquerdo e direito. As câmaras pulpares foram abertas até que as entradas dos canais. Os animais foram sacrificados após 7 e 21 dias da exposição pulpar. Os tecidos periapicais que circundam os ápices radiculares foram removidos assepticamente e os molares do lado esquerdo para posterior realização da análise em MicroCT e lado direito para a realização do PCR. As amostras foram submetidas aos testes estatísticos. Em ambos os períodos de 7 e 21 dias o Grupo Controle apresentou maior área e volume de lesões periapicais em comparação com os outros Grupo Ácido. O tamanho da lesão periapical aumentou em todos os grupos experimentais ao comparar 7 com os 21 dias. A expressão da citocina TNF- $\alpha$  foi significativamente maior no Grupo Controle nos períodos de 7 e de 21 dias quando comparamos com o Grupo Ácido. Foi observado uma maior expressão das citocinas IL-6 no período de 7 dias pelo Grupo Controle. A IL-1 $\beta$  teve um aumento de sua expressão no período de 21 dias no Grupo Controle. Conclui-se o Grupo Ácido apresentou uma menor indução das lesões periapicais. Além disso, os resultados encontrados sugerem que o uso do Ácido Zoledrônico parece de alguma forma inibir a reabsorção óssea induzida por IL-1 $\beta$ .

**Palavras-chave:** Ácido Zoledrônico; Camundongos; Endodontia; Doenças da Polpa Dentária.

## ABSTRACT

### **Analysis of the periapical immunological response pattern related to the use of bisphosphonates in mice induced endodontic infection**

Antiresorptive drugs are drugs used worldwide to treat bone pathologies such as osteoporosis and other systemic bone diseases. In the present study we examined the effects of Zoledronic Acid (ZOL) on the development of Periapical Lesion (PL) in mice. The objectives of this study were: 1 To analyze the effect of using Zoledronic Acid on periapical lesion formation. 2. To analyze the effect of pulp exposure on cytokines in the periradicular tissues of mice treated with Zoledronic Acid. 3. To compare cytokines in the periradicular tissues of mice treated with Zoledronic Acid with untreated mice. 4. Analyze and compare the reaction of periradicular tissues of mice treated with Zoledronic Acid with untreated mice by means of MicroCT examination. For the experimental analysis, 16 female Balb/C mice (6 weeks) were divided into two experimental groups: Control Group (animals that received serum application) and Acid Group (animals that received Zoledronic acid application), each group consisting of 8 animals. Each group was divided into two subgroups, Group A sacrificed 7 days after the experiment and Group B sacrificed 21 days after the experiment, each subgroup was composed of 4 animals. After dividing the groups, medication induction was performed once a week for 4 weeks intraperitoneally. The Control Group received application of 0.9% NaCl Saline Solution. The Acid Group received application of 125 µg/kg of Zoledronic Acid injectable solution 4 mg/5mL diluted in a sterile solution at 0.9%. After drug induction, pulp exposure of the maxillary left and right first molars was performed. The pulp chambers were opened until the canal entrances. The animals were sacrificed after 7 and 21 days of pulp exposure. The periapical tissues that surround the root apices were removed aseptically and the molars on the left side for further analysis in MicroCT and the right side for PCR. The samples were submitted to statistical tests. In both periods of 7 and 21 days, the Control Group had a greater area and volume of periapical lesions compared to the other Acid Groups. Periapical lesion size increased in all experimental groups when comparing 7 to 21 days. The TNF- $\alpha$  cytokine expression was significantly higher in the Control Group at 7 and 21 days when compared to the Acid Group. A greater expression of IL-6 cytokines was observed in the period of 7 days by the Control Group. IL-1 $\beta$  had an increase in its expression in the period of 21 days in the Control Group. In conclusion, the Acid Group presented a lower induction of periapical lesions. Furthermore, the results found suggest that the use of Zoledronic acid seems to somehow inhibit IL-1 $\beta$ -induced bone resorption.

**Keywords:** Periapical Lesion; Zoledronic Acid; Endodontic; Mouse Model.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Procedimento de acesso coronário realizados no primeiro molar superior .....	18
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de iniciadores de citocinas.....	21
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeries
ADA	American Dental Association
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BFs	Bisfosfonatos
cDNA	DNA complementar
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animal
COEP	Comitê de Ética e Pesquisa
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
IP	Intraperitoneal
OMAB	Osteonecrose dos Maxilares Associada ao uso dos Bisfosfonatos
OMRM	Osteonecrose dos Maxilares Relacionada ao uso de Medicamentos
ON	Osteonecrose
SCR	Sistema de Canais Radiculares
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RANKL	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Radioterapia
TCFC	Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TREG	Linfócitos T reguladores
Th	T helper
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VI	Via Intravenosa
VO	Via Oral
MicroCT	MicroTomografia Computadorizada

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivos gerais.....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
3.1 Animais.....	20
3.2 Administração da medicação .....	20
3.3 Etapas clínicas .....	20
3.3.1 Anestesia.....	20
3.3.2 Exposição pulpar.....	21
3.3.3 Analgesia.....	21
3.4 Análise imunológica .....	22
3.4.1 Extração e preparo das amostras .....	22
3.4.2 Extração do RNA.....	22
3.4.3 Quantificação do mRNA .....	23
3.4.4 Preparo de cDNA (DNA complementar) por Transcrição Reversa.....	23
3.4.5 PCR quantitativo (qPCR).....	24
3.4.5.1 Controle endógeno.....	24
3.4.5.2 Determinação da expressão gênica .....	24
3.5 Análise em MicroCT .....	25
3.5.1 Parâmetros para aquisição das Microtomografias .....	25
3.5.2 Parâmetros para análise .....	26
3.6 Análise dos dados .....	26
<b>4 ARTIGO .....</b>	<b>27</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>45</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os bisfosfonatos (BP's) são análogos químicos da substância endógena denominada ácido pirofosfórico, que no organismo se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. (FERNANDES *et al.*, 2005). Essa classe de medicamentos é utilizada para tratamentos de diversas patologias ósseas como mieloma múltiplo, doença de Paget, hipercalcemia, metástases ósseas de neoplasias malignas, osteogênese imperfeita, displasia fibrosa e osteoporoses/osteopenia (COLEMAN, 2004; HOKUGO *et al.*, 2010; ROSEN, 2004;).

As vias de administração dos BFs podem ser via intravenosa (VI) e via oral (VO), sendo que para o tratamento de hipercalcemia e lesões osteolíticas metastáticas associadas à malignidade, como vem sendo recomendado pela American Society of Clinical Oncology (ASCO) a VI é o mais indicado, enquanto para o tratamento da osteoporose a VO é o mais recomendado (RUGGIERO *et al.*, 2006).

Os BFs são drogas se ligam fortemente aos cristais de hidroxiapatita. Uma vez ligados ao osso, eles inibem a reabsorção óssea e permanecem não metabolizados por longos períodos. Durante a remodelação óssea, eles são fagocitados pelos osteoclastos, induzindo alterações na morfologia celular e em alguns casos leva a apoptose de osteoclastos (FRANCA *et al.*, 2017).

Como um exemplo de drogas antirreabsortivas muito utilizada podemos citar o Ácido Zoledrônico. Como mecanismo de ação, o mesmo se liga ao tecido ósseo e tem alta afinidade com a hidroxiapatita. Quando isolado de uma superfície óssea por reabsorção óssea osteoclástica, a captação de Ácido Zoledrônico pelos osteoclastos mostrou levar à inibição do metabolismo do mevalonato e iniciar o declínio funcional. (COXON. *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2022; NANCOLLAS *et al.*, 2006; RUGGIERO *et al.*, 2006; M.J. ROGERS *et al.*, 2011;).

A American Dental Association (ADA), relata um aumento mundial no uso dos BFs nos últimos anos, com número de prescrições superior a 190 milhões. Como consequência do aumento da utilização destes medicamentos, surgiram relatos sobre seus efeitos adversos. Marx (2003) relatou um efeito adverso nunca descrito na literatura: Osteonecrose dos Maxilares Associada ao uso dos Bisfosfonatos (OMAB) (MARX, 2003). No ano de 2007, por um consenso da American Association of Oral and Maxillofacial Surgeries (AAOMS) ficou definido que OMAB é uma exposição

óssea que persiste por mais de 8 semanas na cavidade oral, em pacientes que não foram submetidos a radioterapia (RT) de cabeça e pescoço.

Em 2014, AAOMS sugeriu a mudança da nomenclatura de OMAB para Osteonecrose dos Maxilares Relacionada ao uso de Medicamentos (OMRM) para acomodar o crescente número de casos de osteonecrose envolvendo a maxila e a mandíbula associados a outros antirreabsortivos, Denosumab e terapias antiangiogênicas (ROSELLA *et al.*, 2016).

A prevenção é o principal objetivo quando se trata de saúde bucal em pacientes usuários dessas drogas. É de responsabilidade do cirurgião-dentista avaliar com precisão os fatores de risco que levam ao desenvolvimento de OMRM e sugerir estratégias para remover e tratar esses fatores. Ademais, deve ser enfatizado ao paciente a importância de manter uma higiene oral e a realização de exames regulares. Ambos são necessários para manter a saúde bucal, reduzir ou detectar possíveis sinais e sintomas desta doença (HEWITI, FARAT, 2007).

Um dos fatores de risco para o desenvolvimento de OMRM são as alterações pulpares e perirradiculares que normalmente são resultados do envolvimento direto ou indireto dos microrganismos presentes na cavidade oral, que podem ser essenciais para a progressão e perpetuação das diferentes formas de alterações periapicais (FABRICIUS *et al.*, 1982; KAKEHASHI *et al.*, 1965; MOLLER *et al.*, 1981; SUNDQVIST, 1976).

A habilidade dos microrganismos em se implantar ou não em certos sítios dependerá, além de outros fatores, de seu número, virulência e da resistência do hospedeiro. Uma vez instalados nos Sistema de Canais radiculares (SCR), esses microrganismos induzirão uma resposta de defesa nos arredores do ápice radicular (STASHENKO, 1990). A resposta inflamatória, que aí se processa, recrutará células imunocompetentes para conter e impedir a disseminação dessa infecção para outros sítios, culminando com a formação de uma lesão crônica e concomitante reabsorção dos tecidos de suporte periodontal (BAMBIRRA *et al.*, 2015; BRITO *et al.*, 2012; GARLET, 2010; HENRIQUES *et al.*, 2011; MAIA *et al.*, 2020; RITTLING *et al.*, 2009).

A inflamação que ocorre nos tecidos perirradiculares é uma continuidade da inflamação pulpar que muitas vezes se desenvolve antes mesmo da necrose total da polpa. Uma resposta imune inata se inicia tão logo a invasão microbiana atinge os tecidos, levando a um aumento da permeabilidade vascular e, por conseguinte, um grande influxo de células de defesa nos tecidos circunvizinhos. Dentre estas,

encontram-se os linfócitos TCD<sub>4+</sub> e TCD<sub>8+</sub>, macrófagos, células plasmáticas, mastócitos, eosinófilos que a partir da interação com os microrganismos presentes nos SCR, procuram conter e impedir a disseminação da infecção para outros sítios. Tal resposta imuno-inflamatória levará ao desencadeamento de alterações nos tecidos perirradiculares (BRITO *et al.*, 2015; MÁRTON *et al.*, 2014; STASHENKO, 1990; VIRTEJ *et al.*, 2013).

A resposta imune uma vez instalada, além do recrutamento de células inflamatórias, leva à liberação de citocinas e quimosinas pró-inflamatórias e imunorregulatórias (COLIĆ *et al.*, 2009) Os linfócitos TCD<sub>4+</sub> têm um papel importante neste processo (STASHENKO, 1990). Sabe-se hoje que os Linfócitos T *helper* (Th) quando ativados se subdividem em subgrupos Th1, Th2, Th17 e Treg que se caracterizam principalmente pelo perfil de citocinas produzidas e seus efeitos sobre o organismo (MCGEACHY & CUA, 2008). A resposta imune do tipo 1 (Th1) caracteriza-se principalmente pela produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e interleucinas (IL)-1 que induzirão a diferenciação e ativação dos pré-osteoclastos, por meio do ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), levando, pois, à reabsorção óssea periapical (, BRAGA DINIZ *et al.*, 2019; FUKADA *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2020).

A resposta celular do tipo 2 (Th2) produz as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que estão relacionadas aos processos de cura e reparo da área afetada (TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010).

Células Th17 são caracterizadas por expressarem IL-17 e IL-22 e estão relacionadas à exacerbação de processos inflamatórios em lesões perirradiculares, através da indução de secreção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1, e IL-6 que promovem rapidamente o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, sendo consideradas pontes entre a resposta adaptativa e a inata (YU & GAFFEN, 2008). Ademais, estas células estimulam a produção de outras citocinas pró-inflamatórias que atuam na progressão de lesões periapicais (BRITO *et al.*, 2012; COLIC *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2020).

Lesões cariosas, traumas, restaurações mal adaptadas, trincas e outros defeitos estruturais, são possíveis vias para o surgimento das patologias pulpares, que ocorrem a partir do momento em que os microrganismos têm acesso à estrutura dental (RITTLING *et al.*, 2009). A infecção dos sistemas de canais radiculares (SCR), culminará no desenvolvimento de inflamação nos tecidos perirradiculares (GRAVES *et al.*, 2011).

Durante o processo inflamatório, as células inflamatórias ativas secretam diversas proteínas degradantes (por exemplo, colagenase ou proteinases) e citocinas que podem interferir na cicatrização do periodonto. Além disso, as endotoxinas bacterianas ativam um processo que provocam ativação de osteoclastos (RICUCCI *et al.*, 2014).

O objetivo do tratamento endodôntico é eliminar o agente agressor, permitindo que o reparo tecidual ocorra. Como o alvo dos BFs é a reabsorção óssea causada pelos osteoclastos, esse processo pode interferir na cicatrização de lesões periapicais, após o tratamento endodôntico (HSIAO, GLICKMAN, HE, 2009; STASHENKO *et al.*, 1998). Porém pouco se sabe sobre a interferência sobre o uso dos BFs sobre progressão das lesões periapicais.

Em 2009 foi realizado um estudo que comparou a cicatrização de lesões perirradiculares após o tratamento endodôntico com pacientes que fazem uso de BFs por VO com pacientes que não usuários de BFs. Não houve diferença estatística encontrada nos resultados. A principal limitação deste estudo foi o pequeno tamanho da amostra, o que diminui a qualidade da evidência desse estudo (HSIAO, GLICKMAN, HE, 2009).

Em casos de dentes acometidos por lesões periapicais foi relatado que o tratamento endodôntico é menos traumático que a exodontia para os tecidos da cavidade oral, além de ser associado à OMRM em apenas 0,8% de todos os casos (MARX *et al.*, 2005). Porém um estudo em animais mostrou que as lesões periapicais podem ser consideradas fatores predisponentes para a OMRM após a exodontia. (SONG *et al.*, 2016). Desta forma, as lesões periapicais devem ser controladas antes da exodontia para evitar a ocorrência de OMRM (SONG *et al.*, 2016).

Kang e colaboradores relataram o desenvolvimento da OMRM em um modelo animal em casos de altas doses de BFs e indução prévia de lesão periapical. Neste estudo, os animais apresentaram características clínicas, radiográficas e histológicas de OMAB. Houve ainda o desenvolvimento da OMRM clínica mesmo na ausência de extração dentária quando havia presença da lesão periapical (KANG *et al.*, 2014). Outro estudo realizado em 2017 concluiu que apenas lesão periapical não é um fator de risco para o desenvolvimento de OMRM (FRANÇA *et al.*, 2017).

França *et al.*, (2017), demonstrou que o desenvolvimento da lesão periapical em animais tratados com Ácido Zoledrônico foi significativamente menor do que do grupo tratado soro (FRANÇA *et al.*, 2017). Ikeda *et al.*, (2022) também analisou o

desenvolvimento das lesões periapicais em camundongos tratados com Ácido Zoledrônico. Os resultados desse estudo sugeriram que o uso dessa medicação pode prevenir o desenvolvimento das lesões periapicais (IKEDA *et al.*, 2022). Este resultado pode ser explicado pela inibição da atividade osteoclástica, o que leva à diminuição do tamanho das lesões periapicais (GAO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 1997).

Nos estudos realizados por Kang e colaboradores (2014), foi observado que o tamanho das lesões periapicais nos ápices das raízes de molares foi significativamente menor para os animais tratados com BFs, conforme avaliado por imagem de MicroCT (Microtomografia computadorizada) (KANG *et al.*, 2014).

Os estudos sobre os efeitos das drogas antirreabsortivas como, por exemplo, o Ácido Zoledrônico sobre as lesões periapicais ainda não está completamente elucidado. A remodelação óssea é um componente integral do processo de desenvolvimento, progressão e cicatrização de uma lesão perirradicular. Se esse processo de remodelação óssea pode ser potencialmente afetado pelo uso dos BFs ainda não se sabe. Portanto, ainda são necessários mais estudos para compreender melhor a resposta dos tecidos periapicais frente ao uso dos BFs. Sendo assim, os objetivos do presente estudo será compreender melhor a relação do uso do Ácido Zoledrônico e a formação da lesão periapical.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência do uso do Ácido Zoledrônico no desenvolvimento da lesão periapical induzida em camundongos por meio da expressão gênica de citocinas nos tecidos perirradiculares e análise por MicroCT.

### 2.2 Objetivos específicos

a) Analisar o efeito da exposição pulpar sobre as citocinas nos tecidos perirradiculares de camundongos tratados com Ácido Zoledrônico.

b) Comparar as citocinas nos tecidos perirradiculares de camundongos tratados com Ácido Zoledrônico com camundongos não tratados.

c) Quantificar por Real Time PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a expressão das citocinas nos tecidos perirradiculares desses animais, nos 7º e 21º dias após a infecção experimental, em camundongos tratados e não tratados com Ácido Zoledrônico.

d) Analisar e comparar por meio do exame de MicroCT a reação dos tecidos perirradiculares de camundongos tratados com Ácido Zoledrônico com camundongos não tratados.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO, Belo Horizonte, MG, Brasil), 16 camundongos fêmeas da linhagem isogênico BALB/c, com 6 semanas de vida e peso de aproximadamente 20g. Os camundongos foram mantidos no biotério (ICB – Universidade Federal de Minas Gerais) em gaiolas convencionais com ciclo de luz controlado e alimentação com dieta comercial *ad libitum* e água. Sendo alojado um grupo de 5 animais por gaiola, onde foi realizada limpeza e manutenção a cada dois dias. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA – UFMG) protocolo de aprovação #217/202. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais definidos como Grupo Controle (animais que receberam aplicação de soro) e Grupo Ácido (animais que receberam aplicação de Ácido Zoledrônico) sendo cada grupo composto por 8 animais. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos, Grupo A sacrificados com 7 dias após a realização do experimento e Grupo B sacrificados com 21 dias após a realização do experimento, cada subgrupo foi composto por 4 animais.

#### 3.2 Administração da medicação

A indução da medicação foi realizada conforme descrito de acordo com estudos anteriores (BIGUETTI *et al.*, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2014). Após a divisão dos grupos, foi realizada a indução da medicação uma vez por semana durante 4 semanas por via intraperitoneal (IP). O Grupo Controle recebeu aplicação de Solução de Salina de cloreto de sódio a 0,9%. Já o Grupo Ácido recebeu aplicação de 125 µg/kg de Ácido Zoledrônico (Accord Farmacêutica Ltda<sup>®</sup>) solução injetável 4 mg/5mL diluído em solução estéril a 0,9%.

#### 3.3 Etapas clínicas

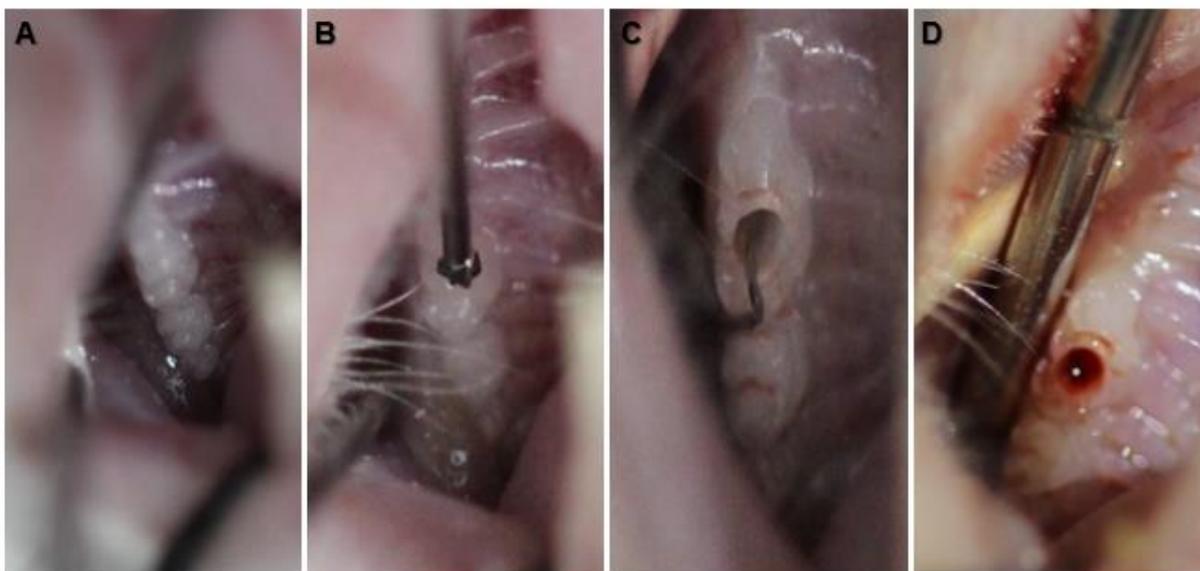
##### 3.3.1 Anestesia

Os camundongos foram anestesiados com Ketamina (Dopalen®) e Xilazina (Anasedan®) misturados na proporção de 0,14 mL de Ketamina para 0,6 mL de Xilazina. A droga foi administrada por via IP. Aguardou-se 5 minutos para que a droga fizesse efeito, antes de realizar qualquer procedimento.

### 3.3.2 Exposição pulpar

Após a anestesia foi realizado a exposição pulpar do primeiro molar superior esquerdo e direito sob aumento de 40x de um microscópio operatório. Foi utilizada uma Broca LN CA (Maillefer - Dentsply Sirona®), em baixa rotação com controle de rotação (Driller, São Paulo, Brasil). As câmaras pulpares foram abertas até que as entradas dos canais fossem visualizadas e sondadas com uma lima K endodôntica nº 8 (Maillefer - Dentsply Sirona®). Os dentes expostos foram deixados abertos ao meio bucal sem qualquer cobertura. Após o procedimento os animais passaram a receber alimentação pastosa por 24h.

Figura 1- Procedimento de acesso coronário realizado no primeiro molar superior.



Legenda: (A) primeiro molar superior; (B) Broca CA (Maillefer -Dentsply Sirona®) posicionada para a realização do acesso coronário; (C) Após o acesso coronário foi realizada uma sondagem com uma lima K endodôntica nº 8 (Maillefer - Dentsply Sirona®); (D) Sangramento confirmando a exposição pulpar.

Fonte: Própria autoria.

### 3.3.3 Analgesia

Após a realização do procedimento foi realizada aplicação de Dipirona sódica (150mg/Kg) nos animais, via intramuscular, para analgesia.

### 3.4 Análise imunológica

#### 3.4.1 Extração e preparo das amostras

Para eutanásia dos animais foi utilizado uma sobredose de anestésico e em seguida foi realizado o deslocamento cervical. Os camundongos foram sacrificados após 7 e 21 dias da exposição pulpar.

Após o sacrifício dos animais, os molares direito e esquerdo juntamente com os tecidos periapicais que circundam os ápices radiculares foram removidos assepticamente. O molar do lado esquerdo foi armazenado em Solução de formol 10% tamponada, para posterior realização da análise em MicroCT e análise histológica. Já o molar do lado direito foi congelado e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para a realização do PCR-RT.

#### 3.4.2 Extração do RNA

Para se proceder à extração do ácido ribonucleico (RNA) do tecido periapical, foi utilizado o protocolo do fabricante NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Para a realização da homogeneização as amostras foram trituradas no Homogeneizador de Tecido OmniTH (OMNI International, Kennesaw GA, Estados Unidos). Em seguida foi adicionado 350  $\mu\text{L}$  de tampão de RA1 e 3,5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) ao tecido triturado. Foi utilizado um filtro NucleoSpin® e um tubo de coleta (2 mL) para a limpeza do líquido e redução da viscosidade do lisado. O material foi colocado em uma centrífuga Z 327K (HERMLE Labortechnik GmbH Siemensstr, Wehingen, Alemanha) por 1 min a 11.000 x g para a completa homogeneização do tecido. O filtro então foi descartado e adicionado 350  $\mu\text{L}$  de etanol (70%) ao lisado homogeneizado.

Utilizando-se um novo filtro NucleoSpin® e um novo tubo de coleta (2 mL), foi adicionado o líquido pipetando o lisado para cima e para baixo de 2 a 3 vezes; em seguida o material foi centrifugado por 30 segundos a 11.000 x g e colocado em um novo tubo de coleta de 2 mL.

Foi adicionado 350  $\mu\text{L}$  de tampão de dessalinização de membrana e novamente centrifugado a 11.000 x g por 1 minuto para secagem da membrana. Com a mistura de reação de DNase em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL estéril, foi adicionado

10 µL de rDNase reconstruída a 95 µL de tampão de reação para rDNase. Em seguida o tubo foi levado na centrífuga para uma nova homogeneização da mistura.

Para lavagem e secagem da membrana de sílica foi adicionado 200µL de tampão de RAW2 à coluna de RNA NucleoSpin® e centrifugado por 30 segundos a 11.000 x g e novamente colocado em um novo tubo de coleta de 2 mL. Em seguida foi adicionado 600 µL de RNA NucleoSpin® e centrifugado por 30 segundos a 11.000 x g. O fluxo foi descartado e o lisado colocado em um novo tubo de coleta. Adicionou-se mais 250 µL de tampão de RA3 à coluna de RNA NucleoSpin®, seguido de uma nova centrifugação de 2 minutos por 11.000 x g para secagem completa da membrana. O RNA foi eluído em 60 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e novamente centrifugado a 11.000 x g por 1 minuto.

### 3.4.3 Quantificação do mRNA

O mRNA foi diluído em água destilada nas proporções de 1:100 e 1:500, para que as amostras fossem lidas em espectrofotômetro (Nano Drop® ND-1000, EUA), utilizando-se cubetas de quartzo, com comprimento de onda de 260/280 OD. A quantificação foi obtida utilizando-se a fórmula: [mRNA- mg/ml] = OD 260 x diluição x 40.

### 3.4.4 Preparo de cDNA (DNA complementar) por Transcrição Reversa

Para síntese do cDNA, utilizou-se o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies®, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados 2000 ng de RNA para a síntese de cDNA.

Para uma reação de 20µl:

- 5x iScript Reaction Mix.....4 µl.
- iScript Reverse Transcriptase .....1 µl.
- RNA.....Variável.
- Água nuclease-free .....Variável.

O cálculo de quanto µl foi utilizado de RNA foi realizado a partir da concentração (Obtida no NanoDrop). A reação foi submetida a 25° C por 5 minutos, 46° C por 90 minutos e 70° C por 15 minutos. O cDNA produzido foi diluído 1:10 e armazenado a -20° C.

### 3.4.5 PCR quantitativo (qPCR)

#### 3.4.5.1 Controle endógeno

Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, fez-se necessário a determinação de um controle endógeno, que serviu como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes testados. Dentre os genes, o Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi o normalizador escolhido.

#### 3.4.5.2 Determinação da expressão gênica

Foi realizada a quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  por PCR em tempo real. O nível de expressão desses genes foi determinado utilizando-se 5  $\mu$ L de SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen™, EUA), 5  $\mu$ M de cada iniciador e 2  $\mu$ L de cDNA diluído 1:10 em um volume final de 10  $\mu$ L.

Para uma reação de 10 $\mu$ l:

- SYBR..... 5 $\mu$ L
- Primer Forward (diluído 1:20) ..... 1 $\mu$ L
- Primer Reverse (diluído 1:20)..... 1  $\mu$ L
- Água nuclease-free .....2  $\mu$ L

Foi realizado um MIX e distribuído em 9  $\mu$ L em cada tudo. Foi acrescentado 1  $\mu$ L de cDNA (diluído em 1:10) no tubo. Em seguida foi realizada a diluição do primer 100  $\mu$ L para 5 $\mu$ M (1:20).

O protocolo foi realizado no termociclador (Rotor-Gene 5 plex HRM Platform) de amplificação. Constituiu-se de desnaturação inicial a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Em todas as reações realizadas havia um controle negativo, constituído por 5  $\mu$ L de SYBR Green SuperMix e 5  $\mu$ M de cada iniciador.

Os primers utilizado para identificação de cada gene segue descrito na tabela abaixo:

Tabela 2 – Sequência de iniciadores de citocinas.

Gene	Sense and antisense (5'-3')	Length (BP*)
IL-1 $\beta$	5' – CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG – 3' 5' – GATCCCACTCCCAGCTGCA - 3'	152

IL-10	5' - CAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA - 5' 5' -TGGCTCTGCAGGATTTTCATG - 3'	91
IL-6	5' - TTCCATCCAAGTTGCCTTCTTG - 3' 5' - TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA - 3'	102
TNF- $\alpha$	5' - ATCTTCTCAAAATTCGAGTGACCA - 3' 5' - TGGAGTAGACAAGGTACAACCC - 3'	173
GAPDH	5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3' 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'	96

\* BP (Pares de Base). Fonte: Banco de PrimerBank.

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (threshold cycle) e na eficiência de amplificação. Os Cts obtidos para os genes foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (GAPDH) para cada amostra. Com esse valor, agora chamado de  $\Delta$ Ct, calculou-se o  $\Delta\Delta$ Ct, que corresponde ao  $\Delta$ Ct amostra -  $\Delta$ Ct do calibrador. Os resultados foram obtidos no Bio-Rad SFX Manager Software e analisados no Prism 5.0. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “curva de melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

### 3.5 Análise em MicroCT

Análise em MicroCT foi realizada como descrita anteriormente (BALTO *et al.*, 2000). As maxilas do lado esquerdo foram removidas de cada camundongo com uma tesoura cirúrgica esterilizada, então foram fixados com Solução de Formol à 10%, tamponada com pH neutro. O tamanho da lesão periradicular foi medido a partir de imagens de Microtomografia computadorizada, onde foram calculados a área e o volume da lesão (BALTO *et al.*, 2000).

#### 3.5.1 Parâmetros para aquisição das Microtomografias

As hemimandíbulas dos camundongos foram fixadas e escaneadas no aparelho de MicroCT SkyScan 1173 (Bruker, Kontich, Bélgica). Os parâmetros para aquisição das imagens foram os seguintes: matriz 1120x1120, 50Kv e 150 mA, sem filtro, com tempo de exposição de 320 milissegundos, passo de rotação de 0.3° e 360° em torno do eixo vertical. A resolução isotrópica foi de 14  $\mu$ m. As imagens foram reconstruídas através do programa NRecon (v1.6.1.0; Bruker) com os seguintes

parâmetros: 4 de correção do artefato de anel, correção de endurecimento do feixe de 40% e suavização de 2 para todas as imagens.

### 3.5.2 Parâmetros para análise

O processamento e a análise de imagens em plano axial e coronal foram realizados através do programa CTan (v1.6.6.0, Bruker), em um processo de segmentação da imagem a fim de permitir a visualização e diferenciação da lesão perirradicular, do canal radicular e da dentina. A região de interesse (ROI – Region of Interest) determinada incluiu a área da lesão perirradicular e do ligamento periodontal em torno de todas as raízes do 1º molar, não incluindo o espaço referente aos canais radiculares e ligamento periodontal dos dentes adjacentes. A seleção do ROI foi feita de forma manual (ROI personalizado) em todos os conjuntos de imagens desde a primeira imagem em que todas as raízes aparecem circundadas pela crista óssea até o desaparecimento da lesão. A análise foi realizada por um avaliador calibrado, cego aos grupos experimentais. Através de análises bi e tridimensionais foram obtidas a área de superfície e volume da lesão perirradicular.

### 3.6 Análise dos dados

Os dados obtidos pelas análise de PCR e MicroCT foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o programa SigmaPlot® 14.5 (Systat Software Inc, For Windows, version 14.5), quando confirmado a normalidade foi realizado o teste-T, e para os dados que não apresentaram normalidade foram utilizados os testes Mann-Whitney. Para todos os teste foi considerado  $p < 0,05$ .

#### 4 ARTIGO

O artigo será submetido ao periódico internacional “Journal of Endodontics” (Qualis A1, Fator de impacto = 2,886).

##### **Título: Ácido Zoledrônico interfere na formação da lesão periapical**

**Resumo:** Introdução: As drogas antirreabsortivas são drogas utilizadas no mundo todo para tratar patologias ósseas como a osteoporose e outras doenças ósseas sistêmicas. No presente estudo examinamos os efeitos do Ácido Zoledrônico (ZOL) no desenvolvimento de Lesão Periapical (LP) em camundongos. Métodos: O ZOL foi injetado por via intraperitoneal (IP) uma vez por semana durante quatro semanas. Após a indução da medicação a câmara pulpar dos primeiros molares superiores direito e esquerdo dos camundongos foram expostas e deixadas abertas para o meio bucal para induzir a periodontite apical. A eutanásia dos animais foi realizada no 7º e 21º dias após a indução da LP e em seguida, foram realizadas as imagens de microtomografia computadorizada (MicroCT) e análises de Reação de cadeia de polimerase (PCR). Resultados: Na análise de MicroCT, foi demonstrado que o uso do ZOL pode levar à menor indução da lesão periapical. Já nas análises de PCR foi observada diferença estatística significativa no Grupo Controle dos marcadores inflamatórios, TNF- $\alpha$  nos períodos de 7 e 21 dias, IL-6 no período de 7 dias e IL-1 $\beta$  no período de 21 dias. Conclusão: Esses resultados sugerem que o uso de drogas antirreabsortivas como o ZOL administrado sistemicamente é distribuído para áreas de inflamação local na maxila pode levar a uma menor indução do desenvolvimento de LP em camundongos, além disso os resultados encontrados sugerem que o uso do Ácido Zoledrônico parece de alguma forma inibir a reabsorção óssea induzida por IL-1 $\beta$ .

**Palavras-chaves:** Periapical Lesion, Zoledronic Acid, Mouse Model.

##### **Introdução**

A inflamação que ocorre nos tecidos perirradiculares é uma continuidade da inflamação pulpar. A infecção bacteriana presente no sistema de canais radiculares (SCR), vai induzir uma resposta imuno-inflamatória do tecido que circunda o ápice radicular a partir do forame apical. Células inflamatórias como macrófagos, são ativadas e produzem citocinas inflamatórias para eliminar fatores patogênicos, resultando em aumento de osteoclastos, causando reabsorção óssea periapical e o desenvolvimento da LP (1–4).

Os bisfosfonatos (BFs) são drogas antirreabsortivas contendo nitrogênio, que apresentam efeitos para diminuição da reabsorção óssea osteoclástica (5,6). Estes medicamentos são usados em todo o mundo para tratar doenças ósseas como osteoporose, metástases ósseas, câncer, mieloma múltiplo e doença de Paget (7).

Como exemplo de drogas antirreabsortivas podemos citar o ZOL que tem como seu mecanismo de ação uma molécula que se liga ao tecido ósseo e tem alta afinidade com a hidroxiapatita. Quando isolado de uma superfície óssea por reabsorção óssea osteoclástica, a captação de ZOL pelos osteoclastos mostrou levar à inibição do metabolismo do mevalonato (síntese do colesterol) e iniciar o declínio funcional (8–11).

A relação entre o uso do ZOL e a formação da lesão periapical ainda é pouco estudada. Um estudo clínico realizado em 2021, relatou que o uso de BFs diminuiu a prevalência de lesão periapical em pacientes com osteoporoses (12). Outro estudo realizado em animais que avaliaram a formação da LP, concluíram que as drogas antirreabsortivas podem prevenir o desenvolvimento da lesão periapical (13). Nos estudos realizados por Kang e colaboradores foi observado que o tamanho das lesões periapicais nos ápices das raízes de molares foi significativamente menor para os animais tratados com BF, conforme avaliado por imagem de MicroCT (14).

Alguns autores procuraram relacionar a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada ao uso de Medicamentos (OMRM) com a formação da LP. A OMRM pode ser causada pela progressão da LP em pacientes que receberam os antirreabsortivos em altas doses (13–15). O efeito do ZOL sobre a formação da lesão periapical ainda é pouco estudado. Portanto o objetivo do presente estudo é avaliar a ação do ZOL na progressão e nos marcadores inflamatórios da LP induzidas em camundongos.

## **Materiais e Métodos**

### **Modelo Animal e Lesão Periapical**

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA – UFMG) protocolo de aprovação #217/2022. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais definidos como Grupo Controle (animais que receberam infusão de soro) e Grupo ZOL (animais que receberam aplicação de Ácido Zoledrônico) sendo cada grupo composto por 8 animais. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos, Grupo. Foram utilizados 16 camundongos fêmeas da linhagem isogênico BALB/c, com 6 semanas (CEBIO, Belo Horizonte, MG, Brasil).

### **Administração das drogas**

A indução da medicação foi realizada conforme descrito anteriormente (17,18). Após a divisão dos grupos, foi realizada a indução da medicação uma vez por semana durante 4 semanas por via intraperitoneal (IP). O Grupo Controle recebeu aplicação de Solução de Salina

de NaCl a 0,9%. Já o Grupo ZOL recebeu aplicação de 125 µg/kg de Ácido Zoledrônico (ZOL) (Accord Farmacêutica Ltda ®) solução injetável 4 mg/5mL diluído em solução estéril a 0,9%.

### **Exposição pulpar**

Após a indução da droga por 4 semanas foi realizada a exposição pulpar. Após a anestesia foi realizado a exposição pulpar do primeiro molar superior esquerdo e direito como descrito anteriormente (14,16) sob aumento de 40× de um microscópio endodôntico, utilizando uma Broca LN CA (Maillefer -Dentsply Sirona®), em baixa rotação com controle de rotação (Driller, São Paulo, Brasil). As câmaras pulpares foram abertas até que as entradas dos canais até que fossem visualizadas e sondadas com uma lima K endodôntica nº 8 (Maillefer - Dentsply Sirona®). Os dentes expostos foram deixados abertos ao meio bucal sem qualquer cobertura. A sacrificados com 7 dias após a realização do experimento e Grupo B sacrificados com 21 dias após a realização do experimento, cada subgrupo foi composto por 4 animais.

### **Análise MicroCT**

As maxilas dos lados esquerdos foram removidas de cada camundongo com uma tesoura cirúrgica esterilizada e então foram fixados em Solução de formol 10% , tamponada com pH neutro. As hemimaxilas dos camundongos foram fixadas e escaneadas no aparelho de MicroCT SkyScan 1173 (Bruker, Kontich, Bélgica). O processamento e a análise de imagens em plano axial foram realizados através do programa CTan (v1.6.6.0, Bruker), em um processo de segmentação da imagem a fim de permitir a visualização e diferenciação da lesão perirradicular, do canal radicular e da dentina. A região de interesse (ROI – Region of Interest) determinada incluiu a área da lesão perirradicular e do ligamento periodontal em torno de todas as raízes do 1º molar, não incluindo o espaço referente aos canais radiculares e ligamento periodontal dos dentes adjacentes. A seleção do ROI foi feita de forma manual (ROI personalizado) em todos os conjuntos de imagens desde a primeira imagem em que todas as raízes aparecem circundadas pela crista óssea até o desaparecimento da lesão. A análise foi realizada por um avaliador calibrado, cego aos grupos experimentais. Através de análises bi e tridimensionais foram obtidas a área de superfície e volume da lesão perirradicular (19).

### **Reação de cadeia de polimerase em Tempo Real – PCR-RT**

Amostras dos molares do lado direito foram trituradas no homogeneizador de tecido OmniTH (OMNI International, Kennesaw GA, Estados Unidos), incluindo a lesão periapical,

osso alveolar circundante e raízes. O RNA foi extraído utilizando o protocolo do fabricante NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. E para síntese do cDNA, utilizou-se o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies®, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Foi realizada a quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  por PCR em tempo real. O nível de expressão desses genes foi determinado utilizando-se 5  $\mu$ L de SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen™, EUA), 5  $\mu$ M de cada iniciador e 2  $\mu$ L de cDNA diluído 1:10 em um volume final de 10  $\mu$ L. Foi realizado um MIX e distribuído em 9  $\mu$ L em cada tubo. Foi acrescentado 1  $\mu$ L de cDNA (diluído em 1:10) no tubo. Em seguida foi realizada a diluição do primer 100  $\mu$ L para 5  $\mu$ M (1:20).

O protocolo foi realizado no termociclador (Rotor-Gene 5 plex HRM Platform) de amplificação constituiu-se de desnaturação inicial a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 segundos e anelamento / extensão a 60° C por 1 minuto. Em todas as reações realizadas havia um controle negativo, constituído por 5  $\mu$ L de SYBR Green SuperMix e 5  $\mu$ M de cada iniciador. A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (threshold cycle) e na eficiência de amplificação. Os Cts obtidos para os genes foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (GAPDH) para cada amostra. Os resultados foram obtidos no Bio-Rad SFX Manager Software e analisados no Prism 5.0. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “curva de melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

**Tabela 1.** Primers usados para realização da análise de PCR-RT. IL-1 $\beta$  interleucina 1 $\beta$ ; Interleucina 10 IL-10; Interleucina 6 IL-6; TNF- $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ; GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Gene	Sense and antisense
IL-1 $\beta$	FW: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG RV: GATCCACACTCCCAGCTGCA
IL-10	FW: CAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA RV: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
IL-6	FW: TTCCATCCAAGTTGCCTTCTTG RV: TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
TNF- $\alpha$	FW: ATCTTCTCAAATTCGAGTGACCA RV: TGGAGTAGACAAGGTACAACCC

---

GAPDH	FW: 5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3'
	RV 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'

---

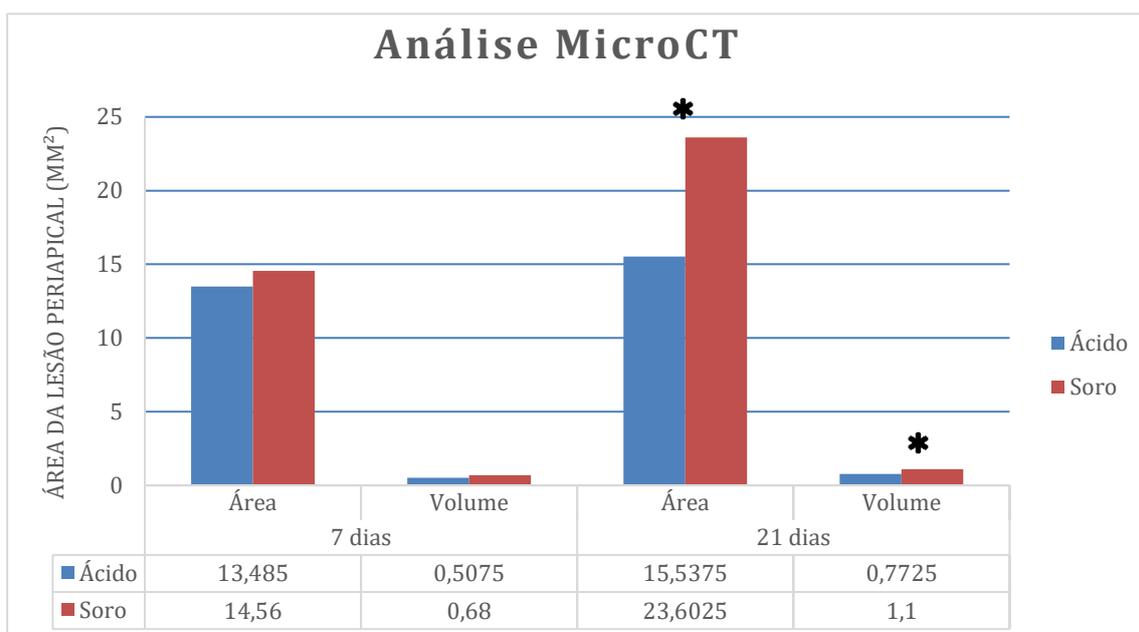
## Análise dos dados

Os dados obtidos pela análise de PCR e MicroCT foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o programa SigmaPlot® 14.5 (Systat Software Inc, For Windows, version 14.5), quando confirmado a normalidade foi realizado o teste-T, e para os dados que não apresentaram normalidade foram utilizados os testes Mann-Whitney. Para todos os testes foi considerado  $p < 0,05$ .

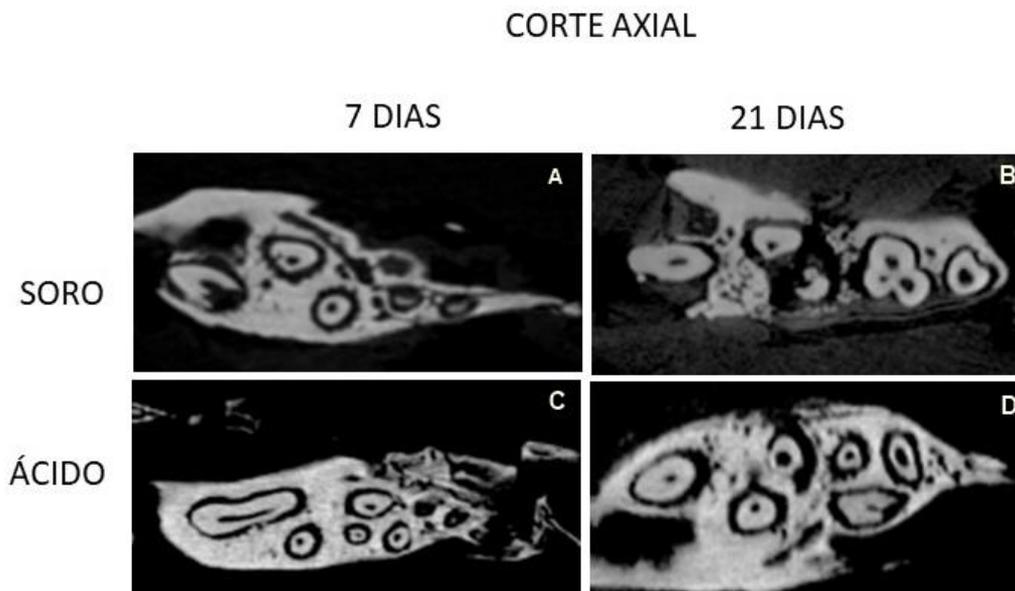
## Resultados

### Análise MicroCT

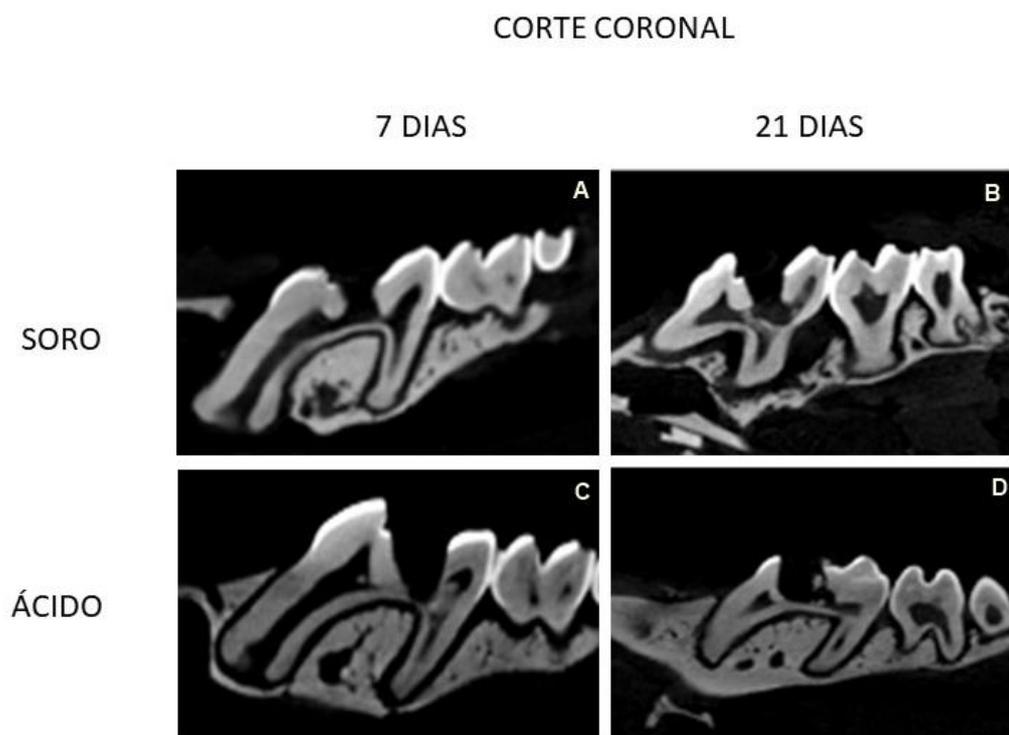
Os cortes de MicroCT foram realizados através da área apical dos molares superior esquerdo nos cortes Axial e Coronal (Figura 2 e Figura 3). Em ambos os momentos, o Grupo Controle teve maiores tamanhos de lesões periapicais em comparação com os outros Grupos ZOL (Figura 1). O tamanho da LP aumentou dentro do Grupo Controle ao comparar os subgrupos 7 dias com os 21 dias (Figura 2 A e B). Também foi observado um aumento da lesão em área e volume no Grupo ZOL, comparando-se 7 e 21 dias. O volume da lesão também foi maior quando comparamos o Grupo Controle com o Grupo Ácido.



**Figura 1.** Área e Volume da LP nos períodos de 7 e 21 dias nos Grupos Soro e Ácido. Achados de microtomografia computadorizada da região periapical da maxila esquerda após administração de ZOL por 4 semanas.



**Figura 2.** O uso ZOL promove menor aumento de volume e área da LP induzidas em camundongos. Imagens de MicroCT no corte Axial. (A) 7 dias após a indução da LP no Grupo Controle; (B) 21 dias após a indução da LP no Grupo Controle; (C) 7 dias após a indução da LP no Grupo Ácido; (D) 21 dias após a indução da LP no Grupo Ácido.



**Figura 3.** O uso ZOL promove menor aumento de volume e área da LP induzidas em camundongos. Imagens de MicroCT no corte Coronal. (A) 7 dias após a indução da LP no Grupo Controle; (B) 21 dias após a indução da LP no Grupo Controle; (C) 7 dias após a indução da LP no Grupo Ácido; (D) 21 dias após a indução da LP no Grupo Ácido.

### Análise PCR-RT

A expressão da citocina TNF- $\alpha$  foi significativamente maior no Grupo Controle nos períodos de 7 e de 21 dias quando comparado com o Grupo Ácido. A expressão da citocina IL-6 foi maior no período de 7 dias pelo Grupo Controle. Já a IL-1 $\beta$  foi mais expressa no período de 21 dias pelo Grupo Controle (Figura 4). Não houve diferença estatística encontrada em IL-10.

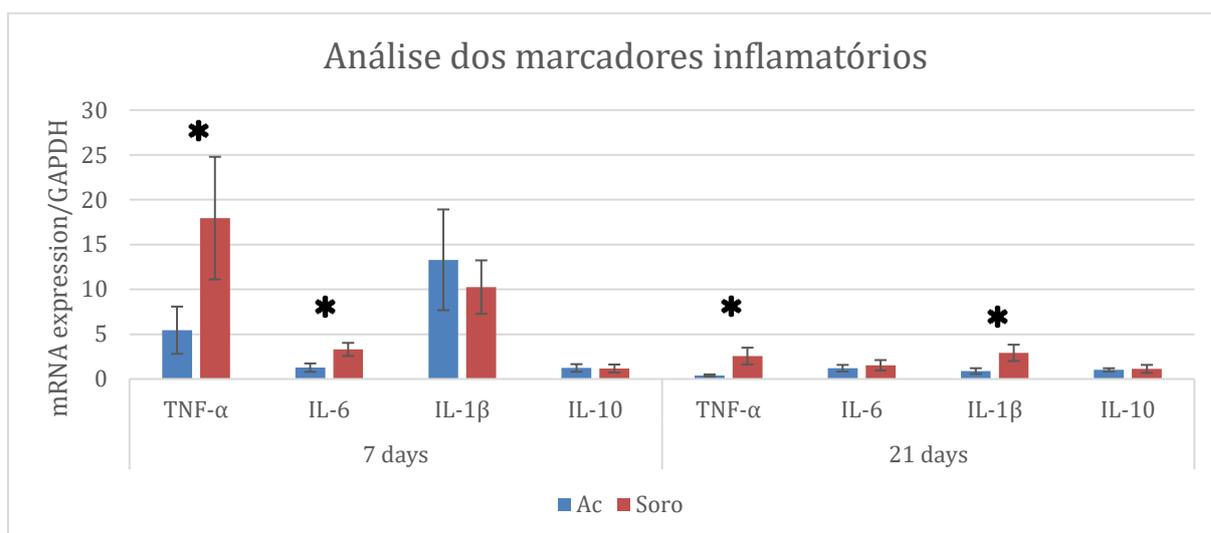


Figura 4. Citocinas inflamatórias da LP nos períodos de 7 e 21 dias nos Grupos Soro e Ácido. Marcadores inflamatórios da região periapical maxila esquerda após administração de ZOL por 4 semanas. \*Diferença estatística significativa no Grupo Controle dos marcadores inflamatórios, TNF- $\alpha$  nos períodos de 7 e 21 dias, IL-6 no período de 7 dias e IL-1 $\beta$  no período de 21 dias.

### Discussão

O presente estudo avaliou a formação da LP em camundongos que receberam doses IP de ZOL e comparou com um Grupo que recebeu Soro. Os resultados demonstraram em análise de MicroCT que o uso do ZOL pode levar à menor indução da lesão periapical em um modelo de experimento animal. Foi observado um menor aumento do volume da lesão do Grupo ZOL

de 21 dias quando comparado com o Grupo Controle. Já nas análises de PCR foi observado diferença estatística significativa no Grupo Controle dos marcadores inflamatórios, TNF- $\alpha$  nos períodos de 7 e 21 dias, IL-6 no período de 7 dias e IL-1 $\beta$  no período de 21 dias.

Interessantemente, no período de 7 dias, houve maior expressão dos genes de IL-1 $\beta$  no grupo que recebeu o ZOL. Entretanto, observamos menor indução de lesão periapical nestes animais com MicroCT. Desta forma, podemos inferir que nos animais em uso de ZOL houve inibição dos síntese da IL-1 $\beta$  ou dos seus receptores nos osteoclastos. Destarte, temos uma inibição da cascata da reabsorção mediada por IL-1 $\beta$ .

O ZOL é administrado por via intravenosa em humanos, porém no presente estudo foi administrado por via IP, semelhante aos procedimentos utilizados em outros trabalhos publicados (14,17,18). Mesmo sabendo que a administração IP resulta em menor concentração plasmática do fármaco, optou-se por essa via por ser mais segura e mais fácil de usar em pequenos animais. As doses utilizadas em estudos experimentais variam muito, porém o modelo utilizado para indução das drogas foi o mesmo descrito em estudos anteriores e mesmo sendo considerada uma dose alta, seu uso foi demonstrado seguro e eficaz (17,18).

Foi possível observar nos resultados obtidos pela análise de MicroCT que o Grupo Controle apresentou uma maior perda óssea nas LP em 21 dias. Resultado que também foi observado em um estudo que o ZOL foi aplicado em ratas com ovariectomia, onde o grupo no qual foi aplicado soro os animais também apresentaram uma maior perda óssea periapical(20). Assim como o trabalho citado anteriormente (20), no presente estudo foi observado uma menor indução da LP nos grupos em que foi aplicado o ZOL, o que está de acordo com outros estudos publicados(15,21,22).

A diminuição da reabsorção óssea, no Grupo ZOL pode ser explicada pela incorporação da droga ao tecido ósseo mineralizado, que tende a permanecer disponível por muito tempo. A droga permanece atuando especificamente sobre os osteoclastos inibindo o processo de reabsorção óssea, podendo assim interferir na formação das lesões periapicais. Este fenômeno também foi observado em estudos anteriores (23,24).

A inibição da atividade dos osteoclastos pode levar a menor indução de desenvolvimento da LP (14,22,25). Com isso podemos sugerir que mesmo na presença de infecção, os pacientes com uso de ZOL terão menor padrão de progressão de lesão. Tal fato faz com que o clínico necessite ter maior cuidado durante os exames de diagnóstico, pois casos infectados serão mais dificilmente reconhecidos pelo exame radiográfico de rotina.

A LP tem sua origem da resposta imune contra a infecção bacteriana presente no sistema de canais radiculares o que resulta em um processo inflamatório que é caracterizado por células

imunocompetentes que produzem uma grande variedade de mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 (26). Neste estudo, ao comparar a expressão do TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 por meio da análise de PCR-RT, entre os Grupo Controle e o Ácido, observou-se aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 na fase inicial (7 dias) e de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na fase tardia (21 dias) no Grupo Controle. O que sugere um aumento da reabsorção nesse grupo, uma vez essas citocinas pró-inflamatórias são promotoras da formação e função dos osteoclastos que são responsáveis pela reabsorção óssea (27).

A infusão crônica do ZOL aumenta significativamente o número de células inflamatórias e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no periodonto (28,29, 30). Uma das limitações do presente estudo é o tempo de aplicação do ZOL, o que pode influenciar na resposta dos marcadores inflamatórios. Além disso, não há outros estudos investigando o efeito do ZOL sobre essas citocinas inflamatórias na formação da LP, o que impossibilita a comparação dos resultados atuais com outros trabalhos.

O desenvolvimento da OMRM está diretamente associado a marcadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 (31). Por outro lado, uma dose alta e a administração a longo prazo de drogas antirreabsortivas levaram ao aparecimento de OMRM induzida por LP em modelos animais(14,15,32). No presente estudo, com aplicação de altas doses de ZOL, não foi observado nenhum indício ou sinal clínico de OMRM. No entanto, não foi realizada a extração do dente em nenhum dos camundongos. Sendo assim, não se pode concluir se o trauma pode causar OMRM. Ademais, os períodos mais longos de tratamento com ZOL devem ser estudados para avaliar os efeitos possíveis dessas terapias de longo prazo nas LP.

É de extrema importância ressaltar que este é um estudo in vivo e seus resultados não podem ser aplicados diretamente em humanos, pois seus resultados apresentam limitações. Novos estudos devem ser realizados para confirmar esses achados e aprimorar o modelo experimental.

De acordo com os resultados do presente estudo, as lesões periapicais foram significativamente menores nos animais tratados com ZOL. O uso do ZOL parece de alguma forma inibir a reabsorção óssea induzida por IL-1 $\beta$ . O desenvolvimento induzido da LP em camundongos aparentemente não representou um fator de risco significativo para o desenvolvimento de OMRM. Apesar disso, mais evidências científicas são necessárias para fornecer protocolos seguros para o tratamento endodôntico de pacientes que fazem uso de drogas antirreabsortivas.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse em relação a este artigo.

### Reconhecimento

Esta pesquisa foi financiada em parte pela FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. 5.24/2021- 12095

### Referências

- 1 Stashenko Philip. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Dental Traumatology* 1990;6(3):89–96. Doi: 10.1111/j.1600-9657.1990.tb00400.x.
- 2 Stashenko Philip, Yu Siu Min, Wang Cun-Yu. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *Journal of Endodontics* 1992;18(9):422–6. Doi: 10.1016/S0099-2399(06)80841-1.
- 3 Virtej Anca, Løes Sigbjørn S., Berggreen Ellen, Bletsa Athanasia. Localization and Signaling Patterns of Vascular Endothelial Growth Factors and Receptors in Human Periapical Lesions. *Journal of Endodontics* 2013;39(5):605–11. Doi: 10.1016/j.joen.2012.12.017.
- 4 de Brito L. C. N., Teles F. R., Teles R. P., Nogueira P. M., Vieira L. Q., Ribeiro Sobrinho A. P. Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV– and HIV+ patients. *International Endodontic Journal* 2015;48(6):533–41. Doi: 10.1111/iej.12345.
- 5 Henry David H., Costa Luis, Goldwasser Francois, *et al.* Randomized, Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid in the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Cancer (Excluding Breast and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(9):1125–32. Doi: 10.1200/JCO.2010.31.3304.
- 6 Sheedy Kellen C., Camara Maria I., Camacho Pauline M. Comparison Of The Efficacy, Adverse Effects, And Cost Of Zoledronic Acid And Denosumab In The Treatment Of Osteoporosis. *Endocrine Practice* 2015;21(3):275–9. Doi: 10.4158/EP14106.OR.
- 7 Ruggiero Salvatore L., Fantasia John, Carlson Eric. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006;102(4):433–41. Doi: 10.1016/j.tripleo.2006.06.004.
- 8 Coxon Fraser P., Helfrich Miep H., Van't Hof Robert, *et al.* Protein Geranylgeranylation Is Required for Osteoclast Formation, Function, and Survival: Inhibition by Bisphosphonates and GGTI-298. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000;15(8):1467–76. Doi: 10.1359/jbmr.2000.15.8.1467.
- 9 Nancollas G.H., Tang R., Phipps R.J., *et al.* Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006;38(5):617–27. Doi: 10.1016/j.bone.2005.05.003.

- 10 Rogers Michael J., Crockett Julie C., Coxon Fraser P., Mönkkönen Jukka. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 2011;49(1):34–41. Doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008.
- 11 Muratsu Daichi, Yoshiga Daigo, Taketomi Takaharu, *et al.* Zoledronic Acid Enhances Lipopolysaccharide-Stimulated Proinflammatory Reactions through Controlled Expression of SOCS1 in Macrophages. *PLoS ONE* 2013;8(7):e67906. Doi: 10.1371/journal.pone.0067906.
- 12 Katz Joseph, Rotstein Ilan. Prevalence of Periapical Lesions in Patients with Osteoporosis. *Journal of Endodontics* 2021;47(2):234–8. Doi: 10.1016/j.joen.2020.10.019.
- 13 Ikeda Megumi, Karakawa Akiko, Takizawa Hideomi, *et al.* Effects of Anti-Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand Antibody and Zoledronic Acid on Periapical Lesion Development in Mice. *Journal of Endodontics* 2022;48(5):632–40. Doi: 10.1016/j.joen.2022.02.002.
- 14 Kang Ben, Cheong Simon, Chaichanasakul Thawinee, *et al.* Periapical Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in Mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 2013;28(7):1631–40. Doi: 10.1002/jbmr.1894.
- 15 França Talita Ribeiro Tenório de, Ramos-Perez Flávia Maria de Moraes, Pontual Andrea dos Anjos, Castro Jurema Freire Lisboa de, Bonan Paulo Rogério Ferreti, Perez Danyel Elias da Cruz. Effects of Zoledronic Acid in Experimental Periapical Lesions in Rats: An Imaging and Histological Analysis. *Brazilian Dental Journal* 2017;28(5):566–72. Doi: 10.1590/0103-6440201601558.
- 16 Wang C.-Y., Stashenko P. Kinetics of Bone-resorbing Activity in Developing Periapical Lesions. *Journal of Dental Research* 1991;70(10):1362–6. Doi: 10.1177/00220345910700100901.
- 17 Bigueti Claudia Cristina, de Oliva André Hergesel, Healy Kent, *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. Doi: 10.1371/journal.pone.0214173.
- 18 Williams Drake W., Lee Cindy, Kim Teresa, *et al.* Impaired Bone Resorption and Woven Bone Formation Are Associated with Development of Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions by Bisphosphonate and Anti-Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Antibody in Mice. *The American Journal of Pathology* 2014;184(11):3084–93. Doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.010.
- 19 Balto K., Muller R., Carrington D.C., Dobeck J., Stashenko P. Quantification of Periapical Bone Destruction in Mice by Micro-computed Tomography. *Journal of Dental Research* 2000;79(1):35–40. Doi: 10.1177/00220345000790010401.
- 20 Wayama Marcelo Tadahihiro, Yoshimura Hitoshi, Ohba Seigo, *et al.* Diminished Progression of Periapical Lesions with Zoledronic Acid in Ovariectomized Rats. *Journal of Endodontics* 2015;41(12):2002–7. Doi: 10.1016/j.joen.2015.08.029.
- 21 Li Chun Lei, Lu Weijia William, Seneviratne Chaminda Jayampath, Leung Wai Keung, Zwahlen Roger A., Zheng Li Wu. Role of periodontal disease in

- bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clinical Oral Implants Research* 2016;27(1):1–6. Doi: 10.1111/clr.12502.
- 22 Leite de Marcelos Priscylla Gonçalves Correia, Perez Danyel Elias da Cruz Perez, Soares Diego Moura, *et al.* The effects of zoledronic acid on the progression of experimental periodontitis in rats: histological and microtomographic analyses. *Journal of Periodontal & Implant Science* 2021;51(4):264. Doi: 10.5051/jpis.2001100055.
  - 23 Troeltzsch Matthias, Oduncu Fuat, Mayr Doris, Ehrenfeld Michael, Pautke Christoph, Otto Sven. Root Resorption Caused by Jaw Infiltration of Multiple Myeloma: Report of a Case and Literature Review. *Journal of Endodontics* 2014;40(8):1260–4. Doi: 10.1016/j.joen.2013.12.030.
  - 24 Martins Caroline A., Leyhausen Gabriele, Volk Joachim, Geurtsen Werner. Effects of Alendronate on Osteoclast Formation and Activity In Vitro. *Journal of Endodontics* 2015;41(1):45–9. Doi: 10.1016/j.joen.2014.07.010.
  - 25 Xiong Haofei, Peng Bin, Wei Lili, Zhang Xiaolei, Wang Li. Effect of an Estrogen-deficient State and Alendronate Therapy on Bone Loss Resulting from Experimental Periapical Lesions in Rats. *Journal of Endodontics* 2007;33(11):1304–8. Doi: 10.1016/j.joen.2007.07.011.
  - 26 Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Archives of Oral Biology* 1999;44(1):55–66. Doi: 10.1016/S0003-9969(98)00094-6.
  - 27 Čolić Miodrag, Gazivoda Dragan, Vučević Dragana, Vasilijić Saša, Rudolf Rebeka, Lukić Aleksandra. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology* 2009;47(1):101–13. Doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.011.
  - 28 Dinarello C A, Ikejima T, Warner S J, *et al.* Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 1987;139(6):1902–10.
  - 29 Gowen M, Mundy G R. Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *J Immunol* 1986;136(7):2478–82.
  - 30 Brekalo Pršo Ivana, Kocjan Willy, Šimic Hrvoje, *et al.* Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 6 in Human Periapical Lesions. *Mediators of Inflammation* 2007;2007:1–4. Doi: 10.1155/2007/38210.
  - 31 de Barros Silva Paulo Goberlânio, Ferreira Junior Antonio Ernando Carlos, de Oliveira Camila Carvalho, *et al.* Chronic treatment with zoledronic acid increases inflammatory markers in periodontium of rats. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2017. Doi: 10.1111/jop.12640.
  - 32 Aghaloo Tara L, Cheong Simon, Bezouglaia Olga, *et al.* RANKL Inhibitors Induce Osteonecrosis of the Jaw in Mice With Periapical Disease. *Journal of Bone and Mineral Research* 2014;29(4):843–54. Doi: 10.1002/jbmr.2097.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou a formação da lesão periapical em camundongos que receberam doses IP de Ácido Zoledrônico e comparou com um grupo que recebeu Soro. Os resultados demonstraram em análise de MicroCT que o uso do Ácido Zoledrônico pode levar a menor indução da lesão periapical em um modelo de experimento animal. Além disso, nas análises de PCR foi observado diferença estatística significativa no Grupo Controle dos marcadores inflamatórios, TNF- $\alpha$  nos períodos de 7 e 21 dias, IL-6 no período de 7 dias e IL-1 $\beta$  no período de 21 dias.

De acordo com os resultados encontrado o uso do Ácido Zoledrônico parece de alguma forma inibir a reabsorção óssea induzida por IL-1 $\beta$  e levar a uma menor indução da lesão. No entanto é de extrema importância ressaltar que este é um estudo em modelo animal e seus resultados não podem ser aplicados diretamente em humanos, pois seus resultados apresentam limitações. Novos estudos devem ser realizados para confirmar esses achados e aprimorar o modelo experimental.

Além disso, o desenvolvimento da lesão periapical em animais usuários de Ácido Zoledrônico aparentemente não representaram um fator de risco significativo para o desenvolvimento de OMRM. Apesar disso, mais evidências científicas são necessárias para fornecer protocolos seguros para o tratamento endodôntico de pacientes que fazem uso de drogas antirreabsortivas.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL. Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **J Oral Maxillofac Surg.** v.65, n.3, p. 369-76. Mar. 2007. doi: 10.1016/j.joms.2006.11.003.

BAMBIRRA, W.J.R. *et al.* Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heatshock protein, and proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. **J Endod.**v.41, n. 7, p.1085-90. Jul. 2015

BIGUETTI, C.C. *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**, v. 14, n. 6, p. e0214173, 2019.

BRAGA DINIZ, J. M. *et al.* Immunological profile of periapical endodontic infection in patients undergoing haematopoietic transplantation. **Clinical oral investigations**, v.14. jul. 2020.

CAIRES, N. C. M. *et al.* Epidemiological analysis and need for endodontic treatment among the indigenous Sateré-Mawé and Tikuna. **Brazilian oral research**, v.32, n.19. Mar. 2018.

COLIĆ, M. *et al.* Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Molecular immunology**. v. 47, n.1, p. 101-13. Fev. 2009.

DE BRITO, L.C.N. *et al.* T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. **J Endod**, v.38, n.4, p.481-85. Abr. 2012.

DE BRITO, L.C.N. *et al.* Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. **Int Endod**, n.48, n.6, p.533–541. Set. 2015.

BRYANT, V.L.; SLADE, C.A., Chemokines, their receptors, and human disease: the good, the bad and the itchy. **Immunol Cell Biol.** v.93, p. 364-371. Abr. 2015.

COLEMAN, R.E. Bisphosphonates: clinical experience. **Oncologist**. v.4, p. 14-27. Set. 2004.

DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin. Proc.*, v.83, n.9, p.1032-1045, set. 2008.

FABRICIUS, L. *et al.* Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. **Eur J Oral Sci.** v.114, p.278–85. Ago.2006

FERNANDES, C. *et al.* Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 274-280, Mar. 2005.

FRANCA, T.R.T. *et al.* Effects of Zoledronic Acid in Experimental Periapical Lesions in Rats: An Imaging and Histological Analysis. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 5, p. 566-572. Set. 2017.

FUKADA, S. Y. *et al.*, Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral microbiology and immunology**, v. 24, n.1, p.25-31. Fev. 2009.

GAO, B. *et al.* Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. **Journal of dental research**, v. 92, n. 2, p. 180-186, 2013.

GARLET, G P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of dental research**. v. 89, n.12, p. 1349-63. Ago. 2010.

GRAVES, D.T. *et al.* Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **J Oral Microbiol.** v.17, n.3. Jan. 2011.

HENRIQUES, L.C. *et al.* Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. **J Endod.** v.37, n.12, p. 1659-62. Dez. 2011.

HEWITT, C.; FARAH, C.S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a comprehensive review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.36, p. 319-328. Abr. 2007.

HSIAO, A.; GLICKMAN, G.; He, J. A retrospective clinical and radiographic study on healing of periradicular lesions in patients taking oral bisphosphonates. **J Endod.** v.351, p.525–1528, Jul. 2009.

IKEDA, M. *et. al.* Effects of Anti–Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand Antibody and Zoledronic Acid on Periapical Lesion Development in Mice. *Journal of Endodontics*, v. 48, n. 5, p. 632-640, 2022.

KANG, B. *et. al.* Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 7, p. 1631-1640, 2013.

KAKEHASHI, S. *et. al.* “the effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats.” **Oral surgery, oral medicine, and oral.** v. 20, p.340-9. Set.1965.

MAIA, L. M. *et al.* Clinical endodontic procedures modulate periapical cytokine and chemokine gene expressions. **Clinical oral investigations.** v. 24, n.10, p. 3691-3697. Out. 2020.

MÀRTON, I. J., *et. al.* Overlapping Protective and Destructive Regulatory Pathways in Apical Periodontitis. **J Endod.** v.40, n. 2, p-155-63. Fev. 2014.

MARX, R. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 61, n. 9, p. 1115-1117, Set. 2003.

MARX, R. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg.** v.63, n.11, p.1567-75. 2005.

MALTOS, K. L.M. *et. al.* Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 6, p. 443-450, 2004.

MCGEACHY, M. J.,; CUA, D. J. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. **Immunity.** v.28, n.4, p.445–453. Abr. 2008

MÖLLER, A. J. *et. al.* Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scandinavian journal of dental research**. v.89, n.6, p.475-84. Dez. 1981.

MOSMANN, T. R.;COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual review of immunology** v. 7, p.145-73. 1989.

RICUCCI, D. Repair of extensive apical root resorption associated with apical periodontitis: radiographic and histologic observations after 25 years. **J Endod**. v.40, p.1268–1274. 2014.

RICUCCI, D. *et. al.* Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. **Journal of endodontics**. v. 40, n.12, p. 1932-9. Out. 2014.

RITTLING, S. R. *et. al.* Protective role of osteopontin in endodontic Infection. **Immunology**. v.129, n.1, p.105-114. Jan. 2009

ROSELLA, D. *et. al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 6, n. 2, p. 97, 2016.

ROSEN, L. S. New generation of bisphosphonates: broad clinical utility in breast and prostate cancer. **Oncology**. v.18, p.26-32. Jun. 2004.

RUGGIERIO, S.L.; FANTASIA, J.; CALSON. E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**. v.102, n.4, p.433-41. 2006.

RUGGIERO, S.L. *et.al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws- 2009 update. **J Oral MaxillofacSurg**, v.67, n.5, p. 2-12. Mai. 2009.

RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates from bench to bedside. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1068, p. 367–401, 2006.

STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Dental Traumatology**, v.6, p.89-96, Jun, 1990.

SETTE-DIAS A.C., *et al.* Cytokine Expression in Patients Hospitalized for Severe Odontogenic Infection in Brazil. **J Endod.** v.42, n.5, p.706-10. Maio. 2016.

SILVA, M.J.; VIEIRA, L.Q.; SOBRINHO, A.P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.105, n.5, p.70-6, maio, 2008.

SIQUEIRA. J.F.; ROCCAS. I.N.; RICUCCI. D. Biofilms in endodontic infection. **Endoditic Topics.** v.22, p.33–49. Set. 2012.

SONG, M. *et al.* Preexisting Periapical Inflammatory Condition Exacerbates Tooth Extraction-induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw Lesions in Mice. **Journal of endodontics.** v.42, n.11, p, 1641-1646. Set. 2016.

SUNDQVIST, G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. **Odontological Dissertation.** n.7. 1976.

TEIXEIRA-SALUM, T.B. *et al.* Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.** v.6. n.39, p. 250-6. Jan,2010.

VIRTEJ, A, *et al.* Localization and signaling patterns of vascular endothelial growth factors and receptors in human periapical lesions. **J Endod.** v.39, p.605-11. Jan. 2013.

WANG, C.-Y.; TANI-ISHII, N.; STASHENKO, P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. **Oral microbiology and immunology,** v. 12, n. 2, p. 65-71, 1997.

WILLIAMS, D.W. *et al.* Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and Anti–Receptor Activator of NF-κB Ligand Antibody in mice. **The American journal of pathology,** v. 184, n. 11, p. 3084-3093, 2014.

## ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise do padrão de resposta imunológica periapical relacionada ao uso dos bisfosfonatos frente à infecção endodôntica induzida em camundongos", protocolo do CEUA: 217/2021 sob a responsabilidade de Warley Luciano Fonseca Tavares que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 09/12/2021.

Vigência da Autorização	06/12/2021 a 05/12/2026
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	4
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais

Considerações posteriores:

09/12/2021	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 06/12/2021. Validade: 06/12/2021 à 05/12/2026.
------------	---

Belo Horizonte, 09/12/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)