



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS - UNICHRISTUS
CURSO DE ODONTOLOGIA

JEMERSON SANTOS DO MONTE

**INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR
PROLIFERADORES DE PEROXISOMA GAMA (PPAR- γ) PELA PIOGLITAZONA
NA SEVERIDADE DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR
ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

FORTALEZA

2024

JEMERSON SANTOS DO MONTE

INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR
PROLIFERADORES DE PEROXISOMA GAMA (PPAR- γ) PELA PIOGLITAZONA NA
SEVERIDADE DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO EM RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia do
Centro Universitário Christus, como
requisito parcial para obtenção do título
de bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio
de Barros Silva

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Centro Universitário Christus - Unichristus

Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M772i Monte, Jemerson Santos do.
Influência da ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxisoma gama (ppar- γ) pela pioglitazona na severidade da osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico em ratos / Jemerson Santos do Monte. - 2024.
27 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva .

1. Bisfosfonatos. 2. Osteonecrose associada a bisfosfonatos. 3. PPAR gama. 4. Pioglitazona. 5. Inflamação. I. Título.

CDD 617.6

JEMERSON SANTOS DO MONTE

INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR
PROLIFERADORES DE PEROXISOMA GAMA (PPAR-Y) PELA PIOGLITAZONA NA
SEVERIDADE DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO EM RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia do
Centro Universitário Christus, como
requisito parcial para obtenção do título
de bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio
de Barros Silva

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (Orientador)
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof^a. Dra. Thinali Sousa Dantas
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof. Dr. Antonio Ernando Carlos Ferreira Junior
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim, mesmo quando eu duvidei. Em especial, aos meus pais, à minha companheira, à minha família, aos amigos e professores. Vocês fizeram toda a diferença, e cada conquista é, também, parte de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente aos meus pais, Aurilene Severiano dos Santos e Antônio Ednardo Rodrigues do Monte, cujos sacrifícios abriram caminhos e cujas histórias me inspiram a sonhar mais alto. Sempre estiveram ao meu lado, oferecendo amor, apoio e incentivo incondicional ao longo dessa caminhada. Sem o apoio de vocês, nada disso seria possível. Agradeço também ao meu amor e eterna companheira Sara Maciel Brasil, por estar ao meu lado nos momentos mais desafiadores, sendo minha fonte de força e inspiração. Sou muito grato pela sua parceria e por todos os momentos que passamos juntos, dividindo desafios, vitórias e conquistas. Aos meus avós e à minha família em geral, sou grato por sempre me fornecerem um ambiente de amor, união e compreensão, essencial para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

Quero também dedicar um agradecimento aos amigos que criei no curso e para a vida, em especial à minha dupla de faculdade Jamilly Barbosa Rodrigues. Compartilhei com ela os maiores aprendizados dessa jornada, e a sua amizade foi fundamental para minha formação, tanto acadêmica quanto pessoal.

Por fim, agradeço profundamente ao meu orientador, Paulo Goberlânio de Barros Silva. Um profissional excelente, sempre uma inspiração de conhecimento, bem-humorado e disposto a me ajudar. Suas orientações foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, e sua forma única de guiar e ensinar fez toda a diferença nesse processo. A sua dedicação e paciência foram fundamentais para que eu chegasse até aqui com confiança e competência. A todos vocês, meu muito obrigado!

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMM) é uma doença fortemente associada ao uso de Ácido Zoledrônico (AZ), tem causa multifatorial, mas intimamente atrelada a processo inflamatório e estresse oxidativo. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), especialmente o PPAR- γ , desempenham um papel no metabolismo de carboidratos e lipídios. E agonistas do PPAR- γ , como a pioglitazona, têm efeitos anti-inflamatórios mediante inibição de fatores de transcrição como NF-kB. Dessa forma é objetivo desse estudo avaliar a influência da ativação de PPAR- γ por pioglitazona na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ em ratos. Para isso, 24 ratos Wistar machos foram divididos em três grupos (n=8/cada) nos quais foi administrada solução salina (grupo controle) intravascular e por gavagem, AZ 0,2mg/kg intravascular e gavagem de 0,1ml/kg de solução salina (grupo AZ) ou AZ 0,2mg/kg intravascular e gavagem de 15mg/kg de pioglitazona (grupo Pio). As administrações intravasculares foram realizadas nos dias 0, 7, 14 e 49 e as gavagens foram realizadas três vezes por semana até o dia 70 (eutanásia). A exodontia foi realizada após 42 dias do início do experimento e foram analisados peso do dente e número de fraturas radiculares. Após eutanásia, 0,2ml de sangue foi coletado (após jejum de 12h) para glicemia em jejum, os animais foram pesados (peso inicial e final do experimento) e as mandíbulas foram coletadas para análise histológica (contagem de células inflamatórias polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN), osteoclastos viáveis e apoptóticos e lacunas de osteócitos vazias e preenchidas. Teste ANOVA foi utilizado. Não houve diferença significativa no peso dos dentes (p=0,975) e número de fraturas radiculares (p=0,920), mas os animais do grupo Pio apresentaram perda de peso significativa (p<0,001) e menor glicemia em jejum (p=0,018). O percentual de lacunas de osteócitos viáveis (p=0,001) foi maior no grupo Pio comparado com AZ (p=0,001), bem como e o número de células PMN (p=0,002) e MN(p=0,048). Número de osteoclastos não diferiu entre os grupos (p=0,850). Dessa forma, o tratamento com Pio mostrou redução da inflamação e atenuação da OMM, apesar da perda de peso e da hipoglicemia já previstas devido seu efeito hipoglicemiante.

Palavras-chave: Bisfosfonatos; Osteonecrose Associada a Bisfosfonatos; PPAR gama; Pioglitazona; Inflamação.

ABSTRACT

Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) is a disease strongly associated with the use of Zoledronic Acid (ZA). It has a multifactorial etiology, closely tied to inflammatory processes and oxidative stress. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), particularly PPAR- γ , play a role in carbohydrate and lipid metabolism. PPAR- γ agonists, such as pioglitazone, exhibit anti-inflammatory effects through inhibition of transcription factors like NF- κ B. Therefore, this study aims to evaluate the influence of PPAR- γ activation by pioglitazone on the severity of ZA-induced osteonecrosis of the jaw in rats. For this purpose, 24 male Wistar rats were divided into three groups (n=8 per group), receiving either intravenous saline solution (control group) and oral gavage, ZA 0.2 mg/kg intravenously with oral gavage of 0.1 ml/kg saline solution (ZA group), or ZA 0.2 mg/kg intravenously with oral gavage of 15 mg/kg pioglitazone (Pio group). Intravenous administrations were performed on days 0, 7, 14, and 49, while gavages were conducted three times a week until day 70 (euthanasia). Tooth extraction was performed 42 days after the start of the experiment, and tooth weight and the number of root fractures were analyzed. Following euthanasia, 0.2 ml of blood was collected (after 12 hours of fasting) to measure fasting blood glucose. The animals were weighed (initial and final weights), and the mandibles were collected for histological analysis (counting polymorphonuclear inflammatory cells (PMNs), mononuclear cells (MNs), viable and apoptotic osteoclasts, as well as empty and filled osteocyte lacunae). The ANOVA test was used for statistical analysis. There was no significant difference in tooth weight (p=0.975) and number of root fractures (p=0.920). However, animals in the Pio group showed significant weight loss (p<0.001) and lower fasting blood glucose levels (p=0.018). The percentage of viable osteocyte lacunae (p=0.001) was higher in the Pio group compared to the ZA group (p=0.001), as well as the number of PMNs (p=0.002) and MNs (p=0.048). The number of osteoclasts did not differ between groups (p=0.850). Thus, treatment with Pio demonstrated a reduction in inflammation and attenuation of MRONJ, despite the anticipated weight loss and hypoglycemia due to its hypoglycemic effect.

Keywords: Diphosphonates; Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw; PPAR gamma; Pioglitazone; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil histológico do alvéolo dentário de ratos submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico e tratados com pioglitazona 15m/kg. HE, 400x.....	20
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência da ativação de PPAR γ por pioglitazona na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico em ratos.....	19
--	----

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ADA	American Dental Association
AP-1	Proteína Ativadora 1
AZ	Ácido Zoledrnico
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferon- γ
iNOS	xido Ntrico Sintase Induzível
LPS	Lipopolissacarídeos
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
OMB	Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Bisfosfonatos
OMM	Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos
OPG	Osteoprotegerina
PIO	Pioglitazona
PPAR-a	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Alfa
PPAR-b	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma beta
PPAR- γ	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Gama
PPARs	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma
PPREs	Elementos de resposta PPAR
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa Beta
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa Beta
RXR	Receptor Retinóide X
SAL	Salina
TNBS	Ácido Trinitrobenzenosulfnico
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
VSMCs	Células do Músculo Liso Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Animais, grupos e doses	16
4.2 Cálculo amostral	16
4.3 Protocolo experimental	16
4.4 Análise radiográfica digital	17
4.5 Confecção de lâminas e estudo histomorfométrico	18
4.6 Análise estatística	18
5 RESULTADOS.....	19
6 DISCUSSÃO	21
7 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS.....	24
ANEXO I: Parecer CEUA.....	27

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos são uma classe de fármacos destinados ao tratamento de doenças relacionadas a perda óssea, devido ao aumento de sua reabsorção, que pode ser decorrente da idade, osteoporose, ou de condições patológicas como tumores malignos (Dotto e Dotto, 2011). O principal representante desse grupo é o ácido zoledrônico (AZ) (Koy *et al.*, 2015). A fisiopatologia desses medicamentos ainda não foi totalmente elucidada (Kemp *et al.*, 2022), acredita-se que sua ação se dá pela deposição no tecido ósseo, por meio da afinidade com a hidroxiapatita, e durante a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos, são internalizados, e irão agir inibindo o recrutamento e maturação destes, assim como de seus precursores, além de induzir apoptose. Este mecanismo de bloqueio da atividade osteoclástica associada aos seus efeitos antiangiogênicos tem papel fundamental do aparecimento da osteonecrose dos maxilares relacionada a bisfosfonatos (OMB) (Koy *et al.*, 2015).

À medida que esses fármacos foram sendo estudados, pesquisadores relataram sua associação com osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMM) (Koy *et al.*, 2015). Esses casos são ainda subdivididos em osteonecrose dos maxilares relacionada a bisfosfonatos, termo cunhado pela American Dental Association (ADA) em 2008 (Hellstein *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da ativação de PPAR- γ por pioglitazona na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar histomorfometricamente a influência da ativação de PPAR- γ por pioglitazona em animais submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ.
- Avaliar a influência da ativação de PPAR- γ por pioglitazona na perda de peso de animais submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ.
- Avaliar a influência da ativação de PPAR- γ por pioglitazona na glicemia de animais submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A OMB é definida como uma doença inespecífica, multifatorial, resultante de diversas condições que culminam na morte celular de osteócitos, devido ao comprometimento do aporte sanguíneo ósseo. Esse fenômeno pode ocorrer devido a diversos fatores, porém podendo ocorrer também de maneira idiopática (Pavelka, 2000).

Na pesquisa de Dotto e Dotto (2011), foi observado que a OMB está relacionada a alguns fatores que ampliam o risco do seu desenvolvimento; dentre eles, podemos citar os ligados a medicação: o tipo de bisfosfonato, sua administração, sendo a intravenosa (IV) a responsável pelo maior risco, número de infusões, a duração do tratamento, utilização concomitante de corticosteroides, quimioterapia, assim como o tipo de câncer. Alguns estudos ainda mostram condições sistêmicas que reduzem o aporte sanguíneo como diabetes, obesidade, deficiência de hemoglobinas (Vilela-Carvalho *et al.*, 2018). Tabagismo e higiene oral deficiente que resulte em focos infecciosos durante ou após o tratamento medicamentoso também estão ligados a uma maior incidência de casos de OMB, e por fim, a presença de traumas cirúrgicos (principalmente relacionadas a extrações) são o fator local predominantemente associado a essa condição (Kemp *et al.*, 2022).

Estudos prévios demonstraram que após exodontias em ratos tratados com AZ houve o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1b, TNF-a, iNOS (Óxido nítrico sintase induzida), e ativação da via NF-KB (Barros Silva *et al.*, 2016). Isso ocorre em decorrência do trauma cirúrgico e consequente morte dos osteócitos presentes no alvéolo, mas que também pode ocorrer de forma espontânea na OMB (Koy *et al.*, 2015). Os osteócitos viáveis secretam RANKL (Ligante do receptor nuclear kappa B), responsável por induzir a osteoclastogênese de macrófagos, por meio da via NF-Kappa B, e formar osteoclastos que têm o papel de degradação óssea viabilizado por suas enzimas TRAP (Fosfatase ácida resistente ao tartarato) e iNOS (Óxido nítrico sintase induzida). Enquanto houver inflamação, há também a secreção de RANKL, e quando esta cessa, os osteócitos juntos aos osteoclastos liberam uma citocina denominada OPG (osteoprotegerina), de ação anti-inflamatória do tecido ósseo, bloqueando o receptor RANK dos macrófagos (Morita *et al.*, 2017).

Além disso, um estudo realizado com cultura de células feitas com macrófagos murinos, importante mediador da imunidade inata, foi feito para observar a relação dos bisfosfonatos com inflamação. Desse modo, foi induzida a produção de citocinas IL-1, IL-6 e TNF-a por meio de Lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) após tratamento com Ácido Zoledrônico (ZA), o que acelerou um resultado de expressão aumentada dessa produção em relação ao grupo controle

que não foi tratado com AZ, o que os autores concluem como um sinal positivo para a desregulação inflamatória induzida por AZ na produção e manutenção do estado inflamatório por meio da via NF-KB e produção de citocinas inflamatórias (Muratsu *et al.*, 2013).

Os PPARs (receptor ativado por proliferador de peroxissoma) fazem parte da superfamília de receptores nucleares hormonais, atuando no mecanismo de carboidratos e lipídios. Atualmente, têm-se o conhecimento de 3 tipos: PPAR- α , PPAR- β (também conhecido como PPAR- δ ou NUC1) e PPAR- γ . Enquanto o PPAR- α e o PPAR- β estão mais relacionados ao catabolismo de lipídios intracelulares, o PPAR- γ , em contrapartida, atua na diferenciação e maturação de adipócitos, aumentando a sensibilidade dos tecidos à insulina, que reduz os níveis glicêmicos extracelulares, sendo usado assim para o tratamento de diabetes por meio das glitazonas, grupos de fármacos ligantes sintéticos de PPAR- γ . Recentemente, mostrou-se um importante imunorregulador no controle da resposta inflamatória (Sokołowska *et al.*, 2005).

Em camundongos, duas isoformas de PPAR- γ splicing foram identificadas: PPAR- γ 1 e PPAR- γ 2; entretanto, em humanos, foi observada a existência de pelo menos outras 2 isoformas: PPAR- γ 3 e PPAR- γ 4. Enquanto a PPAR- γ 2 é expressa principalmente em adipócitos, o PPAR- γ 1, PPAR- γ 3 e PPAR- γ 4 são expressos nos mais variados tecidos, inclusive em células do músculo liso vascular (VSMCs), células endoteliais, macrófagos e cardiomiócitos. Sua expressão nuclear se dá por meio da formação de um heterodímero com outro receptor nuclear, o Receptor Retinóide X (RXR), este heterodímero sendo ativado tanto por ligantes PPAR- γ como RXR, e ligando-se a sequências DNA específicas, chamados elementos de resposta PPAR (PPREs), nas regiões reguladoras do gene-alvo (Duan *et al.*, 2008).

Sánchez-Hidalgo *et al.* (2005), descreveu que em modelo de colite ulcerativa em ratos induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) que a administração de rosiglitazona diariamente resultou na redução da infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e queda significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e dos níveis de NF-Kappa β (NF-KB), indicando papel anti-inflamatório do PPAR- γ provavelmente através das vias de sinalização da inflamação. Já em Li *et al.* (2004), observa-se a ação dos PPARs α , β e γ na formação de células espumosas e seu papel na aterosclerose, e é descrito que essa família de receptores tem a capacidade de inibir a expressão de genes pró-inflamatórios como o NF-kB, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α e membros da família da proteína ativadora 1 (AP-1) de maneira dependente de ligantes; contudo, apenas PPAR- α e os agonistas de PPAR- γ mostraram efeitos de inibição da aterosclerose. Foi observada também repressão do gene promotor da iNOS, conseguida parcialmente por antagonismo das atividades de NF-kB, AP-1 e STAT1 (Li *et al.*, 2000). Desse

modo, o presente estudo foi desenhado para avaliar o papel anti-inflamatório do PPAR- γ frente à indução de osteonecrose farmacológica induzida por bisfosfonatos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais, grupos e doses

Este estudo foi submetido à Comissão Ética no Uso de Animais da Unichristus, sendo protocolado com o número 14/24 (Anexo I). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Um total de 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos foram utilizados nessa pesquisa. Os animais (180-200g) foram mantidos com água e ração ad libitum, em ciclo claro-escuro de 12h, temperatura de 20-25°C e pesados três vezes por semana. Os animais foram aleatoriamente (comando “Aleatório”, Microsoft Excel, 2010, Microsoft Corporation®) divididos em 03 grupos (n = 8/grupo):

- **Grupo controle negativo (SAL):** tratado com solução salina estéril (0,1ml/kg) por via intravascular (i.v., acesso peniano) e por gavagem;
- **Grupo controle positivo (AZ+SAL):** tratado com AZ (Eurofarma®) 0,20mg/kg, i.v. (0,1ml/kg) e solução salina estéril por gavagem (0,1ml/kg)
- **Grupos testes pioglitazona (AZ+P):** tratado com AZ (Eurofarma®) 0,20mg/kg, i.v. (0,1ml/kg) e pioglitazona (0,1ml/kg) por gavagem na concentração de 15 mg / kg (Moezi *et al.*, 2013)

4.2 Cálculo amostral

A fim de estimar a amostra necessária está pesquisa se baseou no estudo de Domi *et al.* (2016) que observou que o tratamento com pioglitazona, um agonista do PPAR γ melhora a resposta ao estresse em estudos de comportamento animal quando comparado ao grupo controle não tratado (Média \pm DP = 58,00 \pm 43,27 versus 113,80 \pm 36,06 segundos), estimando-se necessário avaliar 8 animais por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente com 80% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste estudo (teste t de Student).

4.3 Protocolo experimental

Foi utilizado o protocolo experimental de Barros Silva *et al.* (2016) no qual os animais foram inicialmente submetidos a três administrações semanais consecutivas (Dias 0, 7 e 14) de ácido zoledrônico 0,2mg/kg ou solução salina estéril (controle) em volume equivalente de 0,1ml/kg. Após um mês da última administração (Dia 42) foi realizada a exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdos e um mês após as exodontias (Dia 70) os animais foram eutanasiados.

A administração por gavagem da solução salina estéril (SAL e AZ+SAL) e pioglitazona 15mg/kg foi realizada sendo adotado mesmo volume para todos os animais (0,1ml/kg). As administrações das medicações por gavagem iniciaram no mesmo dia do início do protocolo experimental (primeira infusão de AZ – D0), mantendo-se 3 vezes por semana até o desfecho do estudo totalizando 70 administrações.

Para a exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdos foi realizada anestesia dos animais com quetamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) por via intraperitoneal. Foi realizada a sindesmotomia com auxílio de sonda exploradora, a luxação com auxílio de espátula Holleback 3s e a extração com espátula Lecron-Zalle em movimento de alavanca. Todos os procedimentos foram executados por um mesmo operador previamente treinado. Os dentes foram secos em papel absorvente e pesados em balança de 10^{-5} g de precisão. Adicionalmente, um operador contou cegamente o número de fraturas radiculares sem o conhecimento dos grupos experimentais (Barros Silva *et al.* 2016).

Os animais foram eutanasiados após um mês da extração dentária (Dia 70) por sobredose de xilazina e quetamina. Após 12h de jejum foi realizada anestesia com quetamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) para coleta de uma pequena gota de sangue para análise de glicemia em jejum utilizando um glicosímetro digital por meio de coleta por acesso via plexo retro-orbital. Então, dose complementar de cada um dos anestésicos para totalizar 200 mg/kg de quetamina e 100 mg/kg de xilazina foram administrados pela mesma via para indução de eutanásia. As hemimandíbulas foram excisadas cirurgicamente, armazenadas em formol neutro a 10% durante 24h para descalcificação e confecção de lâminas histológicas (hematoxilina-eosina).

4.4 Análise radiográfica digital

As hemimandíbulas foram posicionadas paralelamente ao filme radiográfico e o posicionador com localizador perpendicular ao filme, distando 10cm deste. Para as tomadas

radiográficas foi utilizado um aparelho de raios-X convencional (DabiAtlante®; 63Kvp, 8mA) com um tempo de exposição de 0.18 segundos em função para radiografia digital periapical de bateria dentária anterior superior (13-23).

As radiografias foram exportadas para o formato de imagem .jpeg e posteriormente analisadas quantitativamente por meio do software de análise de imagem ImageJ. Após aleatorização, um operador, de forma cega, mensurou em triplicata a área radiolúcida sugestiva de OMB através do comando de seleção de área livre (Freehand selections) e considerou como unidade amostral a média aritmética das três medidas (Barros Silva et al. 2016).

4.5 Confeção de lâminas e estudo histomorfométrico

Assim, após descalcificação em solução 10% EDTA (pH 7.3; NaOH, PA) durante 30 dias para confecção de lâminas histológicas (Hematoxilina-eosina, 3µm) e análise qualitativa por microscopia de luz foram realizadas fotomicrografias em um aumento de 400x no sítio referente ao primeiro molar inferior esquerdo com um total de 10 imagens por amostra.

Os números de lacunas de osteócitos vazias e com células viáveis, e os números osteoclastos viáveis e com sinais histológicos de apoptose (hipo ou hiper cromatismo nuclear, vacuolização intracitoplasmática) foram contados. Também foram contadas as células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares. O somatório dos campos de cada lâmina foi considerado como unidade amostral, e o percentual de lacunas de osteócitos vazias como também o percentual de osteoclastos em apoptose foram anotados para avaliação quantitativa. (Barros Silva *et al.* 2016)

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como os valores médios \pm erro padrão. Para comparações múltiplas de dados paramétricos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA unidirecional), com o teste post hoc de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS

Após a realização da exodontia, não houve diferença significativa no peso dos dentes ($p=0,975$) e no número de fraturas radiculares entre os animais ($p=0,920$). Após a eutanásia, os animais tratados com AZ demonstraram perda de peso em relação ao grupo salina e o tratamento com pioglitazona reduziu ainda mais esse parâmetro ($p<0,001$). A glicemia em jejum média dos grupos salina e AZ não diferiu significativamente, mas o grupo tratado com pioglitazona mostrou redução significativa em relação a esses dois grupos controles ($p=0,018$) (Tabela 1).

Tabela 1: Influência da ativação de PPAR γ por pioglitazona na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico em ratos

	Grupos			p- Valor
	Sal	ZA	ZA+PIO	
Dificuldade cirúrgica				
Peso dos dentes (mg)	1.77±0.14	1.83±0.17	1.77±0.21	0,975
Número de fraturas radiculares (n)	0.71±0.36	0.86±0.34	0.70±0.21	0,920
Parâmetros sistêmicos				
Variação de peso (%)	191.40±6.23	186.60±8.84*	147.40±6.28*†	<0,001
Glicemia em jejum (mg/dL)	295.00±18.86	321.70±10.02	262.80±12.40*†	0,018
Área radiolúcida (mm²)	3.23±0.15	9.17±1.00*	3.83±0.29†	<0,001
Parâmetros histológicos				
Osteócitos apoptóticos (%)	12.23±1.09	19.32±3.18*	6.02±1.82†	0,001
Osteoclastos (n)	0.60±0.60	0.40±0.22	0.30±0.15	0,850
Osteoclastos apoptóticos (%)	0.00±0.00	0.50±0.50	0.25±0.25	0,438
PMN (n)	0.10±0.10	4.75±2.75*	0.10±0.10†	0,002
MN (n)	0.30±0.21	1.40±0.75*	0.20±0.13†	0,048

* $p<0,05$ versus salina, † $p<0,05$ versus AZ (ANOVA/Bonferroni, média±EPM)

Radiograficamente, o grupo tratado com AZ apresentou aumento significativo da área radiolúcida sugestiva de osteonecrose e o tratamento com pioglitazona reverteu completamente esse parâmetro ($p<0,001$).

Na análise histológica o grupo tratado com AZ apresentou aumento significativo do percentual de lacunas de osteócitos vazias e o tratamento com pioglitazona reverteu completamente esse parâmetro ($p=0,001$). Não houve diferença na contagem total de osteoclastos ($p=0,850$) nem no percentual de osteoclastos com sinais de apoptose ($p=0,428$). Mas enquanto o grupo AZ apresentou aumento significativo da média de células inflamatórias PMN e MN o grupo tratado com pioglitazona apresentou redução significativa de ambos os parâmetros ($p=0,002$ e $p=0,048$, respectivamente) (Tabela 1 e Figura 1).

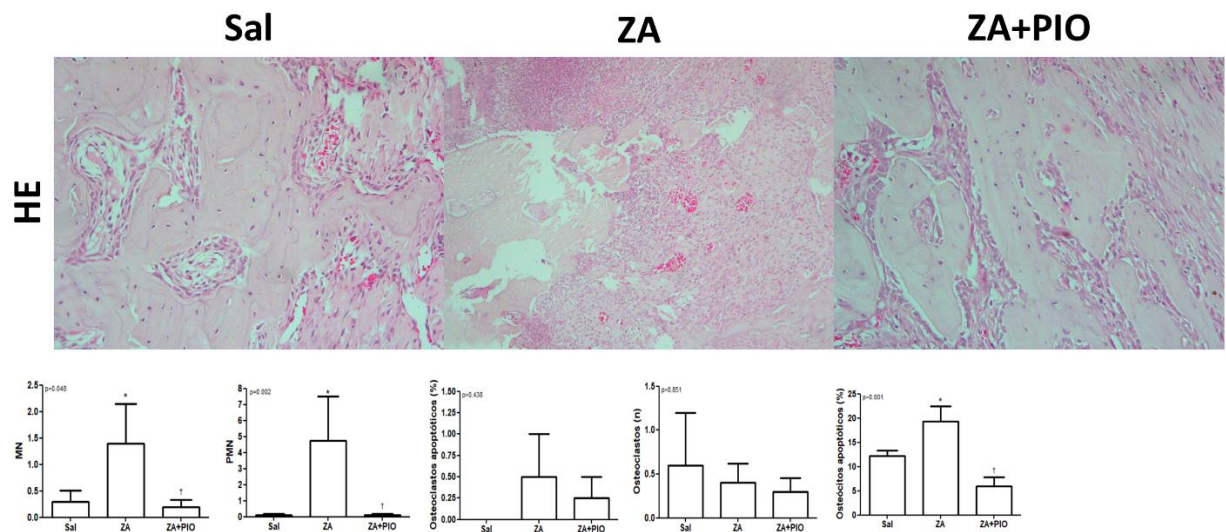


Figura 1: Perfil histológico do alvéolo dentário de ratos submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico e tratados com pioglitazona 15m/kg. HE, 400x.

6 DISCUSSÃO

O AZ é o principal fármaco disponível no mercado associado ao desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares (Dotto e Dotto, 2011; Kizub *et al.*, 2021; Kemp *et al.*, 2022; Hadad *et al.*, 2024) principalmente quando o tratamento se dá por via endovenosa (Koy *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2023). Esta pesquisa explorou o impacto da Pioglitazona na severidade da ONMB induzida por AZ demonstrando a capacidade de reversão da condição após tratamento com esse medicamento.

A pioglitazona é um fármaco membro da classe das glitazonas, com características hipoglicêmicas para tratar diabetes mellitus tipo 2. Ela demonstra seus efeitos sendo um agonista sintético de PPAR- γ (Alhowail, 2024). Pesquisas recentes indicam efeito imunorregulador nos agonistas de PPARs, devido a suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes por meio da regulação negativa de citocinas inflamatórias e redução do estresse oxidativo (Alhowail, 2024; Ali *et al.*, 2023)

Os resultados deste estudo indicam que a administração simultânea de pioglitazona e AZ resultou em uma melhora da osteonecrose histologicamente. Essa melhora pode ser atribuída à restauração dos níveis fisiológicos inflamatórios observados por meio do número de células inflamatórias, densidade óssea radiográfica reestabelecida no sítio cirúrgico dos animais.

A morte celular dos osteócitos está associada a quadros de inflamação aguda (Pacheco *et al.*, 2018). Posto que os agentes antirreabsortivos convertem os progenitores dos osteoclastos em macrófagos que expressam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que por sua vez promovem a apoptose dos osteócitos, levando à osteonecrose (Morita *et al.*, 2017). O fator nuclear- κ B (NF- κ B), é um fator de transcrição essencial para respostas inflamatórias, que controla direta e indiretamente a inflamação, é possível observar níveis elevados de IL-1, IL-6 e TNF- α atribuídas a sua sinalização (Duan *et al.*, 2008; Taniguchi; Karin, 2018). O mecanismo de PPAR- γ é capaz de codificar genes I κ B, para transrepressão da sinalização de NF- κ B (Govindarajulu *et al.*, 2018). O que pode justificar a modulação da resposta inflamatória e reduzir os efeitos apoptóticos dos osteócitos observado nesse estudo.

Além dos seus efeitos imunorreguladores, os agonistas de PPAR- γ , aqui representado pela Pioglitazona, são primariamente agentes da homeostase da glicose e diferenciação de lipídios, sendo amplamente utilizado para tratar diabetes mellitus tipo 2 (Duan *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2000). Neste estudo foi avaliado, os índices de glicemia em jejum, ao final do protocolo experimental de 70 dias, que demonstrou índices reduzidos de glicose no grupo AZ + PIO,

assim como de perda de peso relevante em comparação aos grupos não tratados. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Jin *et al.*, (2016) tanto para os índices glicêmicos, quanto para perda de peso, porém este último, iniciou a partir da 14^a semana, o que pode ser em razão da menor dosagem de Pioglitazona adotada (PIO 10mg/kg) e do regime de pesagem ser feito a cada 4 semanas na pesquisa apontada.

7 CONCLUSÃO

O tratamento com pioglitazona atenuou o processo inflamatório no sítio de exodontia revertendo histologicamente a OMB em ratos. Todavia, o aspecto hipoglicemiante e capacidade de reduzir peso, esperados durante seu uso, devem ser levados em consideração para tratamentos de longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ALHOWAIL, A. H. Pioglitazone ameliorates DOX-induced cognitive impairment by mitigating inflammation, oxidative stress, and apoptosis of hippocampal neurons in rats. **Behavioural Brain Research**, Holanda, v. 457, p. 114714, 4 fev. 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166432823004321?via%3Dihub>. Acesso em: 23 de março de 2024.
- ALI, A. A. *et al.* Impact of peroxisome proliferator activated receptor agonist drugs in a model of nephrotoxicity in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Estados Unidos, v. 37, n. 6, p. e23350, jun. 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbt.23350>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.
- BARROS SILVA, P. G. *et al.* Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Diseases**, Dinamarca, v. 22, n. 7, p. 649–657, out. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/odi.12513>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.
- DOMI, E. *et al.* Further evidence for the involvement of the PPAR γ system on alcohol intake and sensitivity in rodents. **Psychopharmacology**, Alemanha, v. 237, n. 10, p. 2983–2992, out. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-020-05586-w>. Acesso em: 24 de novembro de 2023.
- DOTTO, M. L.; DOTTO, A. C. Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos - revisão de literatura e relato de caso. **RFO UPF**, Passo Fundo, v. 16, n. 2, p. 229–233, ago. 2011. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-40122011000200021. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.
- DUAN, S. Z. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Effects in the Vasculature. **Circulation Research**, Estados Unidos, v. 102, n. 3, p. 283–294, 15 fev. 2008. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.107.164384>. Acesso em: 21 de junho de 2023.
- GOVINDARAJULU, M. *et al.* Signaling Mechanisms of Selective PPAR γ Modulators in Alzheimer's Disease. **PPAR Research**, Estados Unidos, v. 2018, p. 1–20, 21 out. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2018/2010675>. Acesso em: 13 de julho de 2024.
- HADAD, H. *et al.* Rodents as an animal model for studying tooth extraction-related medication-related osteonecrosis of the jaw: assessment of outcomes. **Archives of Oral Biology**, Inglaterra, v. 159, p. 105875, mar. 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996923002637?via%3Dihub>. Acesso em: 10 de agosto de 2024.
- HELLSTEIN, J. W. *et al.* Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis. **The Journal of the American Dental Association**, Inglaterra, v. 142, n. 11, p. 1243–1251, nov. 2011. Disponível em: [https://jada.ada.org/article/S0002-8177\(14\)62814-2/fulltext](https://jada.ada.org/article/S0002-8177(14)62814-2/fulltext). Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

JIN, X. *et al.* Pioglitazone alleviates inflammation in diabetic mice fed a high-fat diet via inhibiting advanced glycation end-product-induced classical macrophage activation. **The FEBS journal**, Inglaterra, v. 283, n. 12, p. 2295–2308, jun. 2016. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13735>. Acesso em: 13 de julho de 2024.

KEMP, A. P. T. *et al.* Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaw and salivary IL-6 IN cancer patients. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, [São Paulo], v. 88, n. 5, p. 683–690, set. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1808869420301762?via%3Dihub>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

KIZUB, D. A. *et al.* Risk factors for bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in the prospective randomized trial of adjuvant bisphosphonates for early-stage breast cancer (SWOG 0307). **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, Alemanha, v. 29, n. 5, p. 2509–2517, maio 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7956914/>. Acesso em: 24 de novembro de 2023.

KOY, S. *et al.* Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen. **Der Schmerz**, Alemanha, v. 29, n. 2, p. 171–178, abr. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00482-014-1499-y>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

LI, A. C. *et al.* Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β/δ , and γ . **Journal of Clinical Investigation**, Estados Unidos, v. 114, n. 11, p. 1564–1576, 1 dez. 2004. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/18730>. Acesso em: 24 de novembro de 2023.

LI, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. **Molecular and Cellular Biology**, Estados Unidos, v. 20, n. 13, p. 4699–4707, jul. 2000. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC85890/>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

MARTINS, L. H. I. *et al.* Frequency of osteonecrosis in bisphosphonate users submitted to dental procedures: A systematic review. **Oral Diseases**, Dinamarca, v. 29, n. 1, p. 75–99, jan. 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/odi.14003>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

MOEZI, L. *et al.* Enhanced anti-ulcer effect of pioglitazone on gastric ulcers in cirrhotic rats: the role of nitric oxide and IL-1 β . **Pharmacological reports: PR**, Suíça, v. 65, n. 1, p. 134–143, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563031/>. Acesso em: 24 de novembro de 2023.

MURATSU, D. *et al.* Zoledronic Acid Enhances Lipopolysaccharide-Stimulated Proinflammatory Reactions through Controlled Expression of SOCS1 in Macrophages. **PLoS ONE**, Estados Unidos, v. 8, n. 7, p. e67906, 9 jul. 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067906>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

PACHECO, V. N. *et al.* Nitrogen-containing bisphosphonate therapy-Part II: Assessment of alveolar bone tissue inflammatory response in rats-A blind randomized controlled trial. **International Journal of Experimental Pathology**, Inglaterra, v. 99, n. 5, p. 258–263, out. 2018. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6302789/>. Acesso em: 13 de julho de 2024.

PAVELKA, K. Osteonecrosis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, Inglaterra, v. 14, n. 2, p. 399–414, jun. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S152169420090072X?via%3Dihub>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

SÁNCHEZ-HIDALGO, M. *et al.* Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**, Inglaterra, v. 69, n. 12, p. 1733–1744, jun. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295205001760?via%3Dihub>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

SOKOŁOWSKA, M. *et al.* [Peroxisome proliferator-activated receptors-gamma (PPAR-gamma) and their role in immunoregulation and inflammation control]. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczałnej (Online)**, Polônia, v. 59, p. 472–484, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16258412/>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, Inglaterra, v. 18, n. 5, p. 309–324, maio 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.142>. Acesso em: 13 de julho de 2024.

VILELA-CARVALHO, L. N. *et al.* Osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicações: Diagnóstico, tratamento e prevenção. **CES Odontología**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 48–63, dez. 2018. Disponível em: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/4552>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

ANEXO I: Parecer CEUA

 <p>CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS</p>	<p>Of. No. 014/24</p>
	<p>Protocolo da CEUA: 014/24</p>
	<p>Pesquisador Responsável: PAULO GOBERLÂNIO DE BARROS SILVA</p>
	<p>Título do Projeto: PAPEL DO PPAR (PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS) NA INCIDÊNCIA E SEVERIDADE DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS</p>

Título do Projeto: PAPEL DO PPAR (PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS) NA INCIDÊNCIA E SEVERIDADE DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BISFOSFONATOS

Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 30 (trinta) de abril de 2024.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) Machos	Número Amostral:	32
----------	---	------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 30/04/2025.

Fortaleza, 30 de abril de 2024.



Olga Vale Oliveira Machado
 Coordenadora
 CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE