



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
CURSO DE ODONTOLOGIA

YANE MARIA COELHO SALES

**INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA POR
INFLIXIMABE NA SEVERIDADE DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES
INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

FORTALEZA

2024

YANE MARIA COELHO SALES

INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA POR
INFLIXIMABE NA SEVERIDADE DE 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(a): 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)

S163i Sales, Yane Maria Coelho.

Influência do bloqueio do fator de necrose tumoral alfa por
infiximabe na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por
ácido zoledrônico em ratos / Yane Maria Coelho Sales. - 2024.
30 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.
Inflamação. I. Título.

CDD 617.6

YANE MARIA COELHO SALES

INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA POR
INFLIXIMABE NA SEVERIDADE DE 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(a): 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 Deus, pois sem ele nada seria possível. Aos meus pais, **Glyss Yane e Jasil Sales**, que sempre estiveram comigo, me apoiando, me dando forças, não medindo nenhum esforço para eu estar onde eu estou hoje. Ao meu irmão **Airton**, que é minha grande inspiração e sempre me apoiou nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Para começar, queria agradecer a Deus pelo dom da vida que ele me deu, por ter me dado saúde, me ajudado a enfrentar os obstáculos, ter me dado forças nos momentos que eu não creditava em mim. Agradecer a São Miguel Arcanjo por ter tirado tudo de ruim da minha vida, pensamentos ruins, pessoas que não queriam meu bem e isso fez com que eu chegasse onde estou hoje.

Aos meus pais, Glyss e Jasil, por sempre acreditarem no meu potencial, por nunca desistirem de mim, sempre serem os meus maiores incentivadores, sempre me mostrando que eu sou capaz que qualquer coisa. Obrigada por entrarem nesse sonho comigo e fazer o possível e o impossível para tudo ocorrer da melhor forma possível. Obrigada por sempre priorizarem o estudo, mesmo quando não tínhamos condições, vocês sempre faziam o impossível para que eu fizesse algum curso, me levaram para FOU SP, SBPQO mesmo sendo bem caro. Jamais esquecerei o que fizeram por mim, vocês dois são o meu maior orgulho, amor e inspiração. Espero que um dia eu possa retribuir todo o amor e tudo que vocês me proporcionam. Amo muito vocês;

A minha avó Julieta, que desde o ensino médio me apoiou nos estudos, sempre priorizou minha escola, me ajudou de todas as formas possíveis para que eu tivesse o melhor e fosse a melhor aluna. Infelizmente hoje você não vai me ver como tanto a senhora queria, Dra. Yane Sales, mas prometo visitar a senhora sempre e fazer você lembrar do nosso sonho. Aos meus anjinhos, vovô Airton e vovó Silva, que estão torcendo por mim aí de cima.

Ao meu tio Aldrin que tanto falava que um dia ia ser Dra. Yane Sales. Obrigada por mesmo distante, ter se feito presente e eu ter percebido somente quando você se foi. Nunca vou esquecer que quando meus pais não conseguiam pagar minha primeira boneca, bicicleta, aniversário e que quando o senhor percebeu que eu era excluída na escola por isso, você fez tudo. Minha primeira boneca e bicicleta você estava lá me dando com tanto amor e carinho. Sei que você está aí com Deus torcendo por mim e vendo o quanto estou me esforçando. Prometo que nunca vou desistir de você e que essa injustiça vai acabar e os culpados de você não está aqui hoje vão pagar.

A minha duplinha da faculdade que esteve sempre comigo me apoiando, me ajudando, me incentivando, obrigada por toda a ajuda e paciência que você tiver comigo durante esse período de faculdade, você foi essencial. De forma especial a minha amiga Amanda que segurou minha mão muitas vezes e me fez acreditar em mim mesma quando eu achei que eu não

conseguiria. Ao meu amigo Filipe, meu segundo aluno de monitoria e que hoje eu chamo de irmão. Obrigada por ter sido minha base, meu melhor amigo, meu irmão.

Ao meu orientador, Paulo Goberlânio, que acreditou em mim até nos momentos em que nem eu acreditava. Obrigada pela paciência, conhecimento e disponibilidade que foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto. Sou eternamente grata pelo senhor ter confiado em mim, não estaria aqui hoje sem os seus conhecimentos.

A minha banca, Thinali e Ernando, que aceitaram o convite para fazer parte da banca. Minha sincera gratidão pela atenção, tempo e sugestões oferecidas durante a avaliação deste trabalho. Suas observações serão fundamentais para aprimorar a qualidade do projeto e ampliar minha visão sobre o tema abordado.

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB) é uma subclasse da condição caracterizada como osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMM), sendo o principal medicamento associado é o Ácido Zoledrônico (AZ), que é fortemente associada a desregulação inflamatória, em especial à superexpressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O infliximabe é um de um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino contra o TNF- α . O objetivo desse estudo é avaliar influência do TNF- α por um anticorpo anti-TNF- α , infliximabe, na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico 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 via subcutânea, AZ 0,2mg/kg intravascular e subcutânea de 0,1ml/kg de solução salina (grupo AZ) ou AZ 0,2mg/kg intravascular e 5mg/kg de infliximabe (grupo INF) por via subcutânea. As administrações intravasculares foram realizadas nos dias 0, 7, 14 e 49 e as subcutâneas foram realizadas semanalmente 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 para contagem total e diferencial de leucócitos, 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 saudáveis e apoptóticos e lacunas de osteócitos vazias e preenchidas). Teste ANOVA foi utilizado. Não houve diferença significativa no peso dos dentes ($p=0,338$) e número de fraturas radiculares ($p=0,930$), mas os animais do grupo AZ e infliximabe apresentaram perda de peso significativa ($p<0,001$) em relação ao grupo salina e grupo AZ. O percentual de lacunas de osteócitos viáveis foi revertida no grupo Infliximabe comparado com AZ ($p=0,002$), bem como e o número de células PMN ($p=0,005$) e MN($p=0,005$). Número de osteoclastos não diferiu entre os grupos ($p=0,898$). Dessa forma, o tratamento com Infliximabe mostrou redução da inflamação e reversão da OMM, apesar da perda de peso e da hipoglicemia já previstas devido seu efeito hipoglicemiante.

Palavras-chave: Bisfosfonatos; Osteonecrose Associada a Bisfosfonatos; Inflamação.

ABSTRACT

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is a subclass of the condition characterized as medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ), with the primary medication associated being Zoledronic Acid (ZA). This condition is strongly linked to inflammatory dysregulation, particularly the overexpression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). Infliximab is a chimeric human-murine monoclonal antibody against TNF- α . The aim of this study is to evaluate the influence of TNF- α through an anti-TNF- α antibody, infliximab, on the severity of zoledronic acid-induced osteonecrosis of the jaw in rats. For this purpose, 24 male Wistar rats were divided into three groups (n=8 each), where saline solution was administered intravascularly and subcutaneously (control group), ZA 0.2 mg/kg intravascularly and 0.1 ml/kg saline solution subcutaneously (ZA group), or ZA 0.2 mg/kg intravascularly and 5 mg/kg infliximab subcutaneously (INF group). Intravascular administrations were performed on days 0, 7, 14, and 49, while subcutaneous administrations were conducted weekly until day 70 (euthanasia). Tooth extraction was performed 42 days after the beginning of the experiment, and tooth weight and the number of root fractures were analyzed. After euthanasia, 0.2 ml of blood was collected for total and differential leukocyte counts, the animals were weighed (initial and final weights), and the mandibles were collected for histological analysis (counting polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) inflammatory cells, healthy and apoptotic osteoclasts, and empty or filled osteocyte lacunae). ANOVA was used for statistical testing. No significant differences were observed in tooth weight (p=0.338) or the number of root fractures (p=0.930). However, animals in the ZA and infliximab groups showed significant weight loss (p<0.001) compared to the saline and ZA groups. The percentage of viable osteocyte lacunae was restored in the infliximab group compared to the ZA group (p=0.002), as well as the number of PMN cells (p=0.005) and MN cells (p=0.005). The number of osteoclasts did not differ among groups (p=0.898). Thus, infliximab treatment demonstrated a reduction in inflammation and reversal of MRONJ, despite the weight loss and hypoglycemia already anticipated due to its hypoglycemic effect.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil radiográfico do alvéolo dentário de ratos submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico e tratados com infliximabe 5m/kg.....22

Figura 2 - Perfil histológico do alvéolo dentário de ratos submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico e tratados com infliximabe 5m/kg. HE, 400x.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência do uso de infliximabe na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico em ratos.....21

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

anti-TNF- α	Anti Fator de Necrose Tumoral Alfa
AZ	Ácido Zoledrônico
BRONJ	Osteonecrose Induzida por Bisfosfonatos
GCN	Grupo Controle Negativo
GCP	Grupo Controle Positivo
GTI	Grupo Teste Infliximabe
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-11	Interleucina 11
IL-18	Interleucina 18
INF	Infliximabe
IV	Intravenoso
MEK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno
MN	Mononucleares
OMB	Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos
OMM	Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos
OPG	Osteoprotegerina
PMN	Polimorfonucleares
RANK	Receptor de Ativação do Fator Nuclear Kappa Beta
RANKL	Ligante do Receptor de Ativação do Fator Nuclear Kappa B
SAL	Salina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos	14
3.2 Efeitos dos bisfosfonatos sobre a desregulação imunológica	15
3.3 Efeito do infliximabe sobre o fator de necrose tumoral alfa	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Animais, grupos e doses	18
4.2 Cálculo amostral	18
4.3 Protocolo experimental	18
4.4 Confecção de lâminas e estudo histomorfométrico	19
4.5 Análise estatística	19
5 RESULTADOS	21
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO I: Parecer CEUA	30

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos são uma classe de drogas utilizadas para tratamento de pacientes com osteoporose e cânceres de mama, próstata, e pulmão metastático para o osso, bem como em pacientes com mieloma múltiplo (Brozoski *et al.*, 2012). Dependendo da sua dosagem, os bisfosfonatos podem ser administrados por via oral ou intravenosa. Os bisfosfonatos intravenosos (IV) são medicamentos antirreabsortivos usados para controlar condições relacionadas ao câncer, incluindo hiperglicemia de malignidade e os bisfosfonatos orais são utilizados para tratamentos de osteoporose e osteopenia. Eles também são utilizados em condições menos comuns como doença óssea de Paget e osteogênese imperfeita. Dentre os mais amplamente usados estão o alendronato, o risedronato, o ácido zoledrônico e o ibandronato (Sambrook e Cooper, 2006).

Os bisfosfonatos são potentes antirreabsortivos funcionando em nível celular por meio de inativação da atividade dos osteoclastos. Portanto, eles são eficazes em diminuir a possibilidade de fraturas causadas, por exemplo, pela osteoporose por meio do aumento da densidade óssea (Alrowis *et al.*, 2022). Este efeito é visto na sua redução causada por citocinas osteoclastogênicas, bem como indução de morte celular desse grupo de células (Shiabahara, 2019).

O ácido zoledrônico é o bisfosfonato mais potente pertencente a subclasse dos bisfosfonatos aminados sendo o mais potente inibidor da reabsorção óssea osteoclástica. É administrado na dose de 4mg por via endovenosa ao longo de cerca de 15 minutos. Sua ação seletiva no osso é baseada na sua elevada afinidade por osso mineralizado (Muratsu *et al.*, 2013) e sua meia-vida desses podem durar ou exceder uma década devido à grande conexão com os cristais ósseos, embora 95% do fármaco seja excretado em poucas horas (Favia *et al.*, 2018). Portanto, manipulação óssea em pacientes em uso desse fármaco tem sido contraindicada por conta da possibilidade de indução de necrose óssea por inabilidade de osteoclastos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar influência do bloqueio do TNF- α por um anticorpo anti-TNF- α , infliximabe, na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do tratamento com infliximabe na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ em ratos.
- Avaliar a influência do tratamento com infliximabe na perda de peso de animais submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ.
- Avaliar a influência do tratamento com infliximabe no perfil hematológico de animais submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por AZ.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos

Em 2003 foi relatada pela primeira vez a osteonecrose em maxilares, quando foram demonstradas 36 lesões ósseas em mandíbula e/ou maxila em pacientes que faziam o uso de pamidronato ou zoledronato. A partir disso, a osteonecrose induzida por bisfosfonatos e maxilares passou a ser reconhecida como uma entidade com impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes que fazem o uso desse fármaco (Marx, 2003). De acordo com American Society of Bone and Mineral Research A American Association of Maxillofacial Surgeons a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos foi definida como uma complicação oral em pacientes nos quais todos os critérios a seguir sejam atendidos (Migliorati *et al.*, 2019): em tratamento atual ou anterior com antirreabsortivos e antiangiogênicos; osso exposto ou osso que pode ser sondado através de uma fístula intraoral ou extraoral na região maxilofacial que persistiu por mais de 8 semanas e ausência de história de radioterapia nos maxilares ou doença metastática. Para direcionar diretrizes racionais de tratamento e coletar dados para avaliar o prognóstico em pacientes que usaram agente antirreabsortivos e antiangiogênicos intravenosos ou orais, o comitê propõe o uso do seguinte sistema de estadiamento revisado (Ruggiero *et al.*, 2014):

- Em risco: não há osso necrótico aparente em pacientes assintomáticos;
- Estágio 0: não apresentam evidência clínica de osso necrótico, mas apresentam sintomas inespecíficos e alterações radiográficas
 - Estágio 1: definido como osso exposto e necrótico ou uma fístula que sonda o osso em pacientes assintomáticos e sem evidência de infecção;
 - Estágio 2: definido como osso exposto e necrótico ou uma fístula que sonda o osso com evidência de infecção;
 - Estágio 3: definido como osso exposto e necrótico ou fístulas que sondam o osso com evidência e pelo menos um dos seguintes: osso necrótico estendendo-se além da região do osso alveolar, fratura patológica, fístula extraoral, comunicação oral antral ou oral nasal, osteólise estendendo-se até a borda inferior da mandíbula ou assoalho do seio.

A osteonecrose induzida por bisfosfonatos (BRONJ) é uma condição crônica associada à extração dentária. Então, após uma exodontia ocorre o aumento da expressão TNF, osteoclastogênese, reabsorção óssea e deposição de matriz óssea ocorrem com uma redução de citocinas pró-inflamatórias para níveis basais após 10 dias (Kim *et al.*, 2012). Porém, a apoptose de osteoclastos induzida por ácido zoledrônico adiciona efeitos pró-inflamatórios no tecido

conjuntivo no qual perpetua e regula essas células pró-inflamatórias, levando a apoptose de osteócitos desregulada (Muratsu *et al.*, 2013).

A supressão da remodelação e remodelação óssea, mediada pelo efeito inibitório sobre os osteoclastos que determina o efeito antirreabsortivo, tem sido proposta como a principal causa da osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos. Sem osteoclastos, não há sinal para formação de novos osteoblastos e o osso torna-se acelular e necrótico induzindo uma superexpressão de citocinas pró-inflamatórias (Ruggiero *et al.*, 2014).

3.2 Efeitos dos bisfosfonatos sobre a desregulação imunológica

Após uma exodontia, principal fator de risco a OMB, a resposta pró- inflamatória inicial envolve a secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e de interleucinas sendo elas a IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18, por macrófagos, células inflamatórias e células de origem mesenquimal. Ocorre um pico dessas citocinas no período de 24 horas e voltam aos seus valores normais dentro de 72 horas após o trauma, levando posteriormente. Esses fatores, quando são produzidos dentro do período e intensidade adequada, recrutam células inflamatórias, aumentam a síntese da matriz extracelular e estimulam a angiogênese (Ferreira Junior *et al.*, 2020).

Esses mecanismos induzem a produção de citocinas ósseas e diferenciação das células da linhagem osteoclástica que é controlado pelas células osteoblásticas, através do RANKL (Ligante do Receptor de Ativação do Fator Nuclear Kappa B), RANK (Receptor de Ativação do Fator Nuclear Kappa B) e OPG (Osteoprotegerina). Portanto, o equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea depende do equilíbrio entre RANK/RANKL Mas os bisfosfonatos levam a uma redução dessas citocinas osteoclásticas inibindo além da reabsorção óssea, a capacidade de cicatrização óssea (Shibahara, 2019).

A secreção rápida e regulada de moléculas pró-inflamatórias que, após uma lesão aguda, é fundamental para a reparação do tecido (Hanley *et al.*, 2000). Elas estimulam a osteoclastogênese e a reabsorção do tecido lesado e posterior neoformação óssea. Contudo, sabe-se que uma expressão prolongada e crônica de citocinas inflamatórias possuem um efeito negativo no osso, no qual essa supressão pode ser modulada pelo uso de fármaco como o Ácido Zoledrônico (Gerstenfeld *et al.*, 2003).

Os membros RANK/ RANKL/OPG formam um sistema envolvido na formação de osteoclastos. A formação de osteoclastos é estimulada pela presença de osteoblastos, no qual aumenta a secreção do ligante ativados do receptor do fator nuclear (RANKL) na superfície do

osteoblasto. O RANKL liga-se ao ativador do receptor de fator nuclear kappa (RANK). Dessa forma, a ligação entre RANK e RANKL auxilia na cicatrização óssea (Verde *et al.*, 2015).

O RANK é um receptor responsável pela formação e ativação dos osteoclastos sendo uma célula responsável pela reabsorção óssea. Para controlar o efeito do RANKL, os osteoblastos secretam osteoprotegerina (OPG), um receptor que se liga ao RANKL, impedindo de o RANKL de ligar-se aos receptores dos osteoclastos (Verde *et al.*, 2015). Dessa forma, a diferenciação de osteoblastos é suprimida e a produção de osteoclastos é reduzida, causando a inibição da reabsorção óssea (Shibahara, 2019). Esses mecanismos podem ser facilmente ativados por citocinas não específicas como o TNF- α , uma das primeiras citocinas envolvidas no processo inflamatório agudo, porém, inibidores de TNF podem reduzir a cicatrização óssea, inibindo as etapas inflamatórias proliferativas e de remodelação óssea, alterando a diferenciação osteoblástica e o Receptor ativador do fator nuclear-kappa B/Receptor ativador do fator nuclear-kappa B ligante/ Eixo osteoprotegerina (RANK/RANKL/OPG) devido suas atividades antirreabsortivas (Shibahara, 2019).

3.3 Efeito do infliximabe sobre o fator de necrose tumoral alfa

O infliximabe é indicado para tratamento da artrite reumatóide, doença de Crohn em adultos e crianças, colite ulcerativa, espondilite anquilosante e artrite psoriática (Favia *et al.*, 2017). Trata-se de um anticorpo monoclonal quimérico humano contra o fator de necrose tumoral (TNF). O TNF-a é um regulador local parácrino e autócrino para leucócitos de baixa densidade e células endoteliais, no qual estimulam fagócitos mononucleares e outros tipos de células que produzem várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, induzindo a migração de leucócitos (Turgut *et al.*, 2014). As atividades inibidas por anticorpos anti-TNF-a incluem indução de interleucinas, aumento da migração de leucócitos e expressão de moléculas de adesão. Os biológicos anti-TNF-a estão relacionados a uma melhor cicatrização da mucosa, mas podem interferir na fisiologia e renovação óssea e no reparo de feridas (Favia *et al.*, 2017).

O infliximabe se liga com alta afinidade às formas solúveis e transmembranares do TNF. Ele atua ligando-se aos receptores de TNF, produzindo uma sinalização reversa através do ligante ancorado a membrana, podendo induzir a supressão de citocinas e até apoptose da célula produtora, ou bloqueando as interações entre o TNF-a transmembranar com os receptores de TNF (Eissner, *et al.*, 2000). O TNF-a desempenha um papel importante na perda e renovação óssea sistêmica, devido sua capacidade de promover a atividade de osteoclastos e osteoblastos.

Os anti-TNF- α são responsáveis pela inibição do turnover ósseo pela redução do RANKL, resultando na inibição da função dos osteoclastos (Ferreira Junior *et al.*, 2020).

A resposta pró-inflamatória inicial envolve a secreção de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL), como IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18 por macrófagos, células inflamatórias e células de origem mesenquimal. Esses fatores recrutam nas células inflamatórias, aumentando a síntese da matriz extracelular a angiogênese (Ferreira Junior *et al.*, 2020). O TNF ativa o fator nuclear Kappa B e está envolvido na sinalização de mecanismo intracelulares, como proteínas quinases ativadas por mitógeno (MEK), quinase regulada por sinal extracelular e quinase terminal (Ferreira Junior *et al.*, 2020). Assim, desempenha um papel importante na ativação dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. Os inibidores de TNF podem reduzir a cicatrização óssea, inibindo as etapas inflamatórias e de remodelação, alterando também a diferenciação osteoblástica e o RANK, RANL e OPG em detrimento de suas atividades antirreabsortivas, participando das etapas iniciais e final do processo de reparo ósseo (Shibahara, 2019).

Recentemente Silva (2016), demonstraram que a superexpressão de TNF- α está diretamente associada a severidade da OMB em ratos, portanto, bloqueio específico utilizando um anticorpo monoclonal contra essa citocina pode ser uma ferramenta terapêutica promissora no controle da OMB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais, grupos e doses

Este projeto foi submetido a Comissão Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Christus sendo protocolado com o número 39/19 e um total de 30 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 a cada três dias. Os animais foram aleatoriamente (comando “Aleatório”, Microsoft Excel, 2010, Microsoft Corporation®) divididos em 04 grupos (n=10/grupo):

- **Grupo controle negativo (GCN):** tratado com solução salina estéril (0,1ml/kg) por via intravascular (i.v., acesso peniano) e por via subcutânea (0,1ml/kg);
- **Grupo controle positivo (GCP):** tratado com AZ (0,20mg/kg, i.v.) e solução salina estéril por via subcutânea (0,1ml/kg);
- **Grupo teste infliximabe (GTI):** tratado com AZ (0,20mg/kg, i.v.) e 5mg/kg de infliximabe por via subcutânea (0,1ml/kg) (Ferreira Junior *et al.*, 2020).

4.2 Cálculo amostral

Baseado no estudo de Gonçalves *et al.* (2014) que após três dias de indução de doença periodontal experimental em ratos observou uma média (\pm desvio-padrão) de $54,3 \pm 31,3$ neutrófilos/mg de tecido gengival no grupo tratado previamente com solução salina estéril e $20,0 \pm 6,4$ neutrófilos/mg de tecido gengival no grupo tratado previamente com infliximabe (5mg/kg), estima-se necessário, com uma confiança de 95%, 10 animais por grupo de estudo a fim de obter uma amostra com 90% de poder de rejeitar a hipótese de nulidade deste trabalho.

4.3 Protocolo experimental

Foi utilizado o protocolo experimental de Silva *et al.* (2015) 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 depois da exodontia (Dia 70) os animais foram eutanasiados.

A administração por via subcutânea da solução salina estéril ou infliximabe foi realizada adotando o mesmo volume para todos os animais (0,1ml/kg). As administrações por via subcutânea iniciaram no mesmo dia do início do protocolo experimental (primeira infusão de

AZ, Dia 0), mantendo-se a partir semanalmente até o desfecho do estudo. Adicionalmente, os animais foram pesados semanalmente até o fim do estudo.

Após anestesia com ketamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) por via intraperitoneal foi realizada a sindesmotomia com auxílio de sonda exploradora, a luxação com auxílio de espátula Hollemback 3s e a extração com espátula Lecron-Zalle em movimento de alavanca. Todos os procedimentos foram realizados 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 o número de fraturas radiculares (Silva *et al.*, 2015) sem o conhecimento dos grupos experimentais.

Os animais foram eutanasiados após um mês da extração dentária (Dia 70) por sobredose de xilazina e quetamina. Após anestesia com quetamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) foi coletado 2mL de sangue pelo plexo retro-orbital para análise hematológica. Então, dose complementar de cada um dos anestésicos para totalizar 200 mg/kg de quetamina e 100 mg/kg de xilazina foi administrada pela mesma via para indução de eutanásia. As hemimandíbulas foram excisadas cirurgicamente, armazenadas em formol neutro a 10% durante 24h para confecção de lâminas histológicas (hematoxilina-eosina).

4.4 Confecção 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, 3 μ m) 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 hipercromatismo 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. (Silva *et al.*, 2015)

4.5 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 ($p= 0,338$) e no número de fraturas radiculares entre os animais ($p= 0,930$). Após a eutanásia, os animais tratados com AZ e infliximabe demonstraram perda de peso em relação ao grupo salina e ao grupo AZ ($p<0,001$). A contagem de leucócitos ($p=0,422$) e linfócitos ($p=0,657$) não diferiu significativamente entre os grupos, mas com relação aos neutrófilos circulantes o grupo AZ mostrou aumento significativo e o tratamento com infliximabe reverteu esse parâmetro ($p=0,042$) (Tabela 1).

Tabela 1- Influência do uso de infliximabe na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico em ratos

	Grupos			p-Valor
	Sal	AZ	AZ+INF	
Dificuldade cirúrgica				
Peso dos dentes (mg)	17.71±1.41	17.71±1.87	20.67±1.87	0,338
Número de fraturas	0.71±0.36	0.86±0.34	0.67±0.49	0,930
Variação de peso (%)	191.40±6.23	186.60±8.84	118.60±2.40*†	<0,001
Parâmetros hematológicos				
Leucócitos	8758±1123	8025±1724	6710±258	0,422
Linfócitos	6254±658	6083±1319	5329±168	0,657
Neutrófilos	665±75	1676±653*	919±107†	0,042
Área radiolúcida	3,84±0,26	7,32±0,87*	4,55±0,58†	0,004
Parâmetros histológicos				
Osteócitos apoptóticos (%)	12.23±1.09	19.32±3.18*	4.17±2.64†	0,002
Osteoclastos (n)	0.60±0.60	0.40±0.22	0.33±0.33	0,898
Osteoclastos apoptóticos (%)	0.00±0.00	0.50±0.50	0.17±0.17	0,445
PMN	0.10±0.10	4.75±2.75*	1.00±0.67†	0,017
MN	10.10±3.92	217.10±59.73*	87.40±43.53†	0,005

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

Fonte: Produção do autor

Radiograficamente o grupo tratado com AZ apresentou aumento significativo do percentual da área radiolúcida sugestiva de osteonecrose e o tratamento com infliximabe reverteu completamente esse parâmetro ($p=0,004$).

Não houve diferença na contagem total de osteoclastos ($p=0,898$) nem no percentual de osteoclastos com sinais de apoptose ($p=0,445$). Mas enquanto o grupo AZ apresentou aumento significativo da média de células inflamatórias PMN e MN o grupo tratado com infliximabe apresentou redução significativa de ambos os parâmetros ($p=0,017$ e $p=0,005$, respectivamente) (Tabela 1 e Figura 2).

6 DISCUSSÃO

Os principais mecanismos estudados da BRONJ envolvem efeitos inibitórios do bisfosfonato na renovação óssea e na angiogênese. Esse fármaco aumenta a produção de mediadores inflamatórios agudos *in vitro* (Muratsu *et al.*, 2013) e *in vivo* (Norton *et al.*, 2012) e modifica o perfil imunológico e celular de pacientes em tratamento crônico. Além disso, eles têm propriedades antiangiogênicas o que pode contribuir para deficiência do prognóstico de BRONJ (Lescaille *et al.*, 2014). Em estudos animais não foi observado infiltrado inflamatório intenso em sítios de exodontia, implicando o desenvolvimento de BRONJ (Lopez-Jornet *et al.*, 2011).

A BRONJ é uma condição crônica fortemente associada à extração dentária. Após a extração de um dente, há aumento da expressão de TNF- α , osteoclastogênese, reabsorção óssea e deposição de matriz óssea ocorrem com uma redução nas citocinas pró inflamatórias para níveis basais após 10 dias (Kim *et al.*, 2012). O TNF- α modula o aumento da apoptose dos osteócitos. A formação de corpos apoptóticos em osteócitos é um estímulo para o recrutamento e ativação de macrófagos e osteoclastos (Cheung *et al.*, 2011). No presente estudo o bloqueio do TNF- α reduziu significativamente o infiltrado inflamatório e o percentual de lacunas de osteócitos vazias, demonstrando que essa citocina participa ativamente nesse processo de morte celular.

A apoptose dos osteoclastos induzida por AZ acrescenta ainda efeitos pró-inflamatórios nas células do tecido conjuntivo e parece perpetuar e regular positivamente esses mediadores pró-inflamatórios, levando à apoptose desregulada dos osteócitos (Bonewald, 2004; Bakker *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2011; Almeida e O'Brien, 2013), infiltração e ativação de macrófagos (Kogianni *et al.*, 2008; Harre *et al.*, 2012) e maior produção de citocinas (Muratsu *et al.*, 2013).

No estudo de Silva (2016) foi observado um aumento de neutrófilos polimorfonucleares nos grupos tratados com AZ quando comparado com o grupo salina e Ferreira Junior *et al.* (2020) mostrou que animais submetidos a administração de infliximabe, houve redução significativa da imunexpressão de TNF- α , do infiltrado inflamatório e do número de osteoclastos. Dessa forma, o bloqueio do TNF- α pelo infliximabe impacta fortemente no metabolismo ósseo. O Infliximabe é um potente inibidor de TNF- α , citocina pró inflamatória que tem sido amplamente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias (Ferreira Junior, 2020).

Em relação aos neutrófilos, estudos *in vitro* anteriores demonstraram que este fármaco tem a capacidade de reduzir a quimiotaxia e a produção de espécies reativas de oxigênio, devido

ao bloqueio da ação das células mononucleares sobre as células polimorfonucleares (Pay *et al.*, 2005). Esta ação tem sido atribuída à diminuição dos níveis e da ação dos quimiotáticos.

A maior limitação do nosso estudo, apesar da eficácia do infliximabe em reverter a BRONJ em ratos, foi a perda de peso nos animais tratados com esse fármaco. Estudos relatam que o TNF- α pode estar envolvido na alteração do metabolismo, podendo aumentar a degradação muscular e melhorar a lipólise de lipídios. Como o infliximabe bloqueia o TNF- α , isso pode gerar a degradação muscular, além de alterar o metabolismo de maneira que o apetite diminua ou cause efeitos colaterais gastrointestinais (Miskaza, 2013). Essa inibição do TNF- α pode alterar o metabolismo basal e como a energia é armazenada e utilizada pelo corpo em ratos, resultando em alterações na absorção de nutrientes ou no gasto de energia (Curry, 2008).

Além disso, o infliximabe pode causar efeitos tóxicos quando utilizado por longos períodos. Um dos principais riscos é a supressão do sistema imunológico podendo causar infecções graves oportunistas ou fúngicas, além da elevação das enzimas hepáticas no qual pode causar danos graves ao fígado (Mota, 2015). Além disso, o uso prolongado do infliximabe é a formação de autoanticorpos contra essa medicação, reações alérgicas, anafilaxia e doenças autoimunes. Essas toxicidades podem, portanto, estar associadas à perda de peso significativa (Barbosa, 2008).

Apesar disso, o bloqueio da via TNF- α se mostrou como uma importante via associada a redução do processo inflamatório local no sítio pós exodontia, redução da área radiolúcida e da extensão de necrose, corroborando a sugestão de estudos prévios de que o controle da inflamação é crucial no controle da BRONJ.

7 CONCLUSÃO

O tratamento com infliximabe reverte radiográfica e histologicamente a BRONJ em ratos. Apesar disso, a toxicidade evidenciada pela perda de peso é um limitante de seu uso prolongado.

REFERÊNCIAS

- ALROWIS, R. *et al.* Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): A Review of Pathophysiology, Risk Factors, Preventive Measures and Treatment Strategies. **The Saudi Dental Journal**, Arábia Saudita, v. 34, n. 3, p. 202–210, mar. 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9346931/>. Acesso em: 23 de março de 2024.
- BROZOSKI, M. A. *et al.* Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Brasil, v. 52, p. 265–270, abr. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/r5V35PrxMJ7xk9PJVyJn3JC/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.
- DINIZ-FREITAS, M. *et al.* Criteria for the prescription of oral bisphosphonates for the treatment of osteoporosis in a series of women referred for tooth extraction. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, Espanha, v. 17, n. 4, p. e601–e604, jul. 2012. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3476022/>. Acesso em: 13 de julho de 2024.
- EISSNER, G. *et al.* Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, Estados Unidos, v. 164, n. 12, p. 6193–6198, 15 jun. 2000. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/164/12/6193/33099/Reverse-Signaling-Through-Transmembrane-TNF>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.
- FAVIA, G. *et al.* A Case of Osteonecrosis of the Jaw in a Patient with Crohn’s Disease Treated with Infliximab. **The American Journal of Case Reports**, Estados Unidos, v. 18, p. 1351–1356, 19 dez. 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5737229/>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.
- FAVIA, G. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw: Surgical or non-surgical treatment? **Oral Diseases**, Dinamarca, v. 24, n. 1–2, p. 238–242, mar. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/odi.12764>. Acesso em: 24 de novembro de 2023.
- FERREIRA-JUNIOR, A. E. C. *et al.* Influence of infliximab therapy on bone healing post-dental extraction in rats. **Archives of Oral Biology**, Inglaterra, v. 112, p. 104680, abr. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996920300583?via%3Dihub>. Acesso em: 21 de junho de 2023.
- GERSTENFELD, L. C. *et al.* Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, Estados Unidos, v. 88, n. 5, p. 873–884, 1 abr. 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.10435>. Acesso em: 10 de agosto de 2024.
- GONÇALVES, D. C. *et al.* Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, Suíça, v. 239, n. 4, p. 442–453, abr. 2014. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370213520114?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

GOUJON, C.; BACHELEZ, H.; GROUPE DE RECHERCHE SUR LE PSORIASIS DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE DERMATOLOGIE. Infiximab. **Annales De Dermatologie Et De Venereologie**, França, v. 146, n. 6–7, p. 483–486, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0151963819301504?via%3Dihub>. Acesso em: 13 de julho de 2024.

HANLEY, D. A. Biochemical markers of bone turnover. Em: **The Osteoporosis Primer**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2000. p. 239–252. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/abs/osteoporosis-primer/biochemical-markers-of-bone-turnover/EE4516614AFE9A99E0DC2DC2816F8C83>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

KIM, D.J. *et al.* Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. **Journal of Periodontal & Implant Science**, Coreia (Sul), v. 42, n. 5, p. 158–165, out. 2012. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3498300/>. Acesso em: 24 de novembro de 2023.

MARX, R. E. 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**, Estados Unidos, v. 61, n. 9, p. 1115–1117, set. 2003. Disponível em: [https://www.joms.org/article/S0278-2391\(03\)00720-1/fulltext](https://www.joms.org/article/S0278-2391(03)00720-1/fulltext). Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

MIGLIORATI, C. A. *et al.* Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, Estados Unidos, v. 2019, n. 53, p. lgz009, 1 ago. 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/jncimono/article/2019/53/lgz009/5551354?login=false>. 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, 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3706453/>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, Estados Unidos, v. 72, n. 10, p. 1938–1956, out. 2014. Disponível em: [https://www.joms.org/article/S0278-2391\(14\)00463-7/fulltext](https://www.joms.org/article/S0278-2391(14)00463-7/fulltext). Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

SAMBROOK, P.; COOPER, C. Osteoporosis. **Lancet (London, England)**, Inglaterra, v. 367, n. 9527, p. 2010–2018, 17 jun. 2006. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(06\)68891-0/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(06)68891-0/abstract). Acesso em: 21 de junho de 2023.

SHIBAHARA, T. Antiresorptive Agent-Related Osteonecrosis of the Jaw (ARONJ): A Twist of Fate in the Bone. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Japão, v. 247, n. 2, p. 75–86, fev. 2019. Disponível em:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/247/2/247_75/_article. Acesso em: 24 de novembro de 2023.

SILVA, P. G. B. **Expressão de marcadores inflamatórios na osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos e efeito do tratamento crônico com ácido zoledrônico nos tecidos gengival e ósseo dentário de ratos**. 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/21659>. Acesso em: 12 de janeiro de 2023.

SILVA, P. G. B. *et al.* Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, Inglaterra, v. 60, n. 9, p. 1237–1245, set. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996915001387?via%3Dihub>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

TURGUT, B. *et al.* Topical infliximab for the suppression of wound healing following experimental glaucoma filtration surgery. **Drug Design, Development and Therapy**, Nova Zelândia, v. 8, p. 421–429, 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4018311/>. Acesso em: 13 de julho de 2024.

VERDE, M. E. *et al.* Effect of Bisphosphonates on the Levels of Rankl and Opg in Gingival Crevicular Fluid of Patients With Periodontal Disease and Post-menopausal Osteoporosis. **Acta odontologica latinoamericana: AOL**, Argentina, v. 28, n. 3, p. 215–221, dez. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27095621/>. Acesso em: 13 de janeiro de 2023.

ANEXO I: Parecer CEUA

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Unichristus
Centro Universitário Christus

Of. No. 019/22

Protocolo da CEUA: 019/22

Pesquisador Responsável: PALLO GOBERLÂNIO DE BARROS SILVA

Título do Projeto: INFLUÊNCIA DO PRÉ TRATAMENTO COM INFLIXIMABE NA PREVENÇÃO DE OSTEONECROSE INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM RATOS.

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 09 (nove) de dezembro de 2022.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	Wistar, 200gr	Número Amostal:	40
----------	---------------	-----------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 09/12/2023.

Fortaleza, 09 de dezembro de 2022.



Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora

CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE