



**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
CURSO DE ODONTOLOGIA**

ANDRÉ DA ROCHA ARAGÃO

**INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA POR
AMINOGUANIDINA NA SEVERIDADE DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES
INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

FORTALEZA

2025

ANDRÉ DA ROCHA ARAGÃO

INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA POR
AMINOGUANIDINA 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

2025

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)

A659i Aragão, André da Rocha.
 Influência do bloqueio da óxido nítrico sintase induzida por
 aminoguanidina na severidade de osteonecrose dos maxilares
 induzida por ácido zoledrônico em ratos / André da Rocha Aragão. -
 2025.
 30 f. : il. color.

 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro
 Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia,
 Fortaleza, 2025.
 Orientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

 1. Bisfosfonatos. 2. Osteonecrose dos maxilares induzida por
 medicamentos. 3. inflamação. I. Título.

CDD 617.6

ANDRÉ DA ROCHA ARAGÃO

INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA POR
AMINOGUANIDINA 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: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de
Barros Silva

Aprovado em: _____

Banca avaliadora

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

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

Profa. Dra. Dayrine Silveira de Paula
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Deus, obrigado pela força para
iniciar essa jornada na Odontologia,
e a minha família, obrigado pelo
apoio durante minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças a seguir durante a minha caminhada, dia após dia. Agradeço aos familiares, em especial minha mãe, que mesmo contrária a ideia de trocar uma instituição pública para particular, em momento algum deixou de me apoiar. Ao meu pai, por todo o esforço em seu trabalho durante minha graduação, por ter sustentado meu Fies e priorizar meu estudo.

Agradeço a Laiz, minha noiva/esposa, por ser um porto seguro durante momentos de dúvida e por ser quem me incentiva desde o momento em que nos conhecemos, que me cobra sempre a ser uma pessoa melhor, por quem eu me esforço de fato a ser.

Agradeço aos professores que tive, em especial ao meu orientador, Professor Paulo Goberlânio, que mesmo com as adversidades na caminhada, sempre me apoiou e não desistiu de me ajudar, sempre solícito.

Aos funcionários do biotério e do laboratório de patologia, que foram imprescindíveis a essa pesquisa, aos amigos que fiz durante essa jornada, Ailton, Marlon e Grazi.

Aos amigos e colegas que fiz durante o período da graduação, muitos levarei para minha vida, que sempre me apoiaram e ajudaram durante minha caminhada e durante minha pesquisa. Não consigo acreditar de ter conseguido tantos, mais do que esperava, durante toda minha trajetória, levarei vocês no coração.

RESUMO

Introdução: A osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB) é um grave efeito adverso da terapia com bisfosfonatos, em especial o Ácido Zoledrônico (AZ) e está diretamente relacionada a estresse oxidativo. **Objetivo:** Avaliar a influência do bloqueio da Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) no controle da OMB em ratos tratados com AZ. **Materiais e métodos:** Para isso foram selecionados 48 ratos Wistar machos que foram divididos em um grupo controle negativo tratado com solução salina e.v, um grupo controle positivo, tratado com 0,2mg/kg de AZ e.v., um grupo controle aminoguanidina tratado com 200 mg/kg de aminoguanidina e três grupos testes tratados com AZ e co-tratados com aminoguanidina 50, 100 e 200mg/kg s.c três vezes por semana desde o início do protocolo até o final do estudo. Quatro semanas após as três administrações semanais consecutivas de AZ os animais foram submetidos a exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdos e na semana seguinte, dose adicional de AZ foi administrada. A eutanásia foi realizada quatro semanas após exodontia (dia 70) e as mandíbulas foram removidas para análise radiomorfométrica da área sugestiva de OMB e análise histomorfométrica (contagem de lacunas de osteócitos vazias, osteoclastos viáveis e apoptóticos e células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares). Teste ANOVA/Bonferroni foi utilizado para análise estatística ($p < 0,05$, GraphPad Prism 5.0). **Resultados:** Os animais do grupo AMG.200 e os animais dos grupos AZ+AMG.100 e AZ+AMG.200 mostraram redução significativa do ganho de massa corporal comparados com os grupos salina e AZ ($p < 0,001$). Os animais do grupo AZ apresentaram aumento do percentual de lacunas osteócitos vazios e os grupos AZ+AMG.100 e AZ+AMG.200 mostraram retorno aos níveis basais ($p < 0,001$). A contagem de osteoclastos também foi aumentada no grupo AZ e os grupos AZ+AMG.100 e AZ+AMG.200 mostraram retorno aos níveis basais ($p = 0,006$) e a contagem de PMN foi aumentada no grupo AZ e reduzida em todos os grupos AZ+AMG ($p = 0,045$). Não houve diferença significativa na contagem de MN ($p = 0,864$). **Conclusão:** O tratamento com aminoguanidina reverte a OMB, mas possui toxicidade sistêmica significativa.

Palavras-chave: bisfosfonatos; osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos; inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) is a severe adverse effect associated with bisphosphonate therapy, particularly with Zoledronic Acid (ZA), and is directly linked to oxidative stress. **Objective:** To evaluate the influence of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition on the control of BRONJ in rats treated with ZA. **Materials and Methods:** Forty-eight male Wistar rats were selected and allocated into the following groups: a negative control group treated with intravenous saline solution; a positive control group treated with 0.2 mg/kg of ZA intravenously; an aminoguanidine (AMG) control group treated with 200 mg/kg AMG; and three experimental groups treated with ZA and co-treated with AMG at doses of 50, 100 and 200mg/kg subcutaneously, three times per week from the beginning of the protocol until the end of the study. Four weeks after three consecutive weekly administrations of ZA, the animals underwent extraction of the left mandibular first molars. In the following week, an additional dose of ZA was administered. Euthanasia was performed four weeks post-extraction (day 70), and mandibles were harvested for radiomorphometric analysis of the suspected BRONJ area and histomorphometric evaluation (quantification of empty osteocyte lacunae, viable and apoptotic osteoclasts, and polymorphonuclear and mononuclear inflammatory cells). ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test was used for statistical analysis ($p < 0.05$, GraphPad Prism 5.0). **Results:** Animals in the AMG.200 group and those in the AZ+AMG.100 and AZ+AMG.200 groups exhibited a significant reduction in body mass gain compared to the saline and ZA groups ($p < 0.001$). The ZA group demonstrated an increased percentage of empty osteocyte lacunae, whereas the AZ+AMG.100 and AZ+AMG.200 groups showed a return to baseline levels ($p < 0.001$). Osteoclast counts were elevated in the ZA group but returned to baseline in the AZ+AMG.100 and AZ+AMG.200 groups ($p = 0.006$). Polymorphonuclear cell count was increased in the ZA group and reduced in all AZ+AMG groups ($p = 0.045$), while mononuclear cell count showed no significant differences ($p = 0.864$). **Conclusion:** Aminoguanidine treatment reverses BRONJ; however, it is associated with significant systemic toxicity.

Keywords: bisphosphonates; drug-induced osteonecrosis of the jaw; 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 aminoguanidina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aspectos clínicos e histomorfométricos de ratos submetidos a modelo de OMB por AZ e tratados com diferentes doses de aminoguanidina

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AZ - Ácido zoledrônico

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

MRONJ - Osteonecrose da mandíbula relacionada a medicamentos

NO - Óxido nítrico

OMB - Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos

OPG - Osteoprotegerina

PMN - Polimorfonucleares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Animais, grupos e doses	16
4.2 Cálculo amostral	16
4.3 Protocolo experimental	17
4.4. Confeção de lâminas e estudo histomorfométrico	17
4.5 Análise estatística	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	30

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é composto por 70% de material mineral, como hidroxiapatita e íons cálcio e fósforo, e 30% de matéria orgânica, sendo o colágeno a principal proteína estrutural. A homeostase óssea resulta do equilíbrio entre osteoblastos, responsáveis pela síntese da matriz óssea, e osteoclastos, que promovem sua reabsorção. Esse processo ocorre continuamente e pode ser acelerado por estímulos inflamatórios, como os desencadeados por exodontias, que ativam células envolvidas na remodelação óssea (Tobeiha, et al., 2020).

A remodelação óssea ocorre em três fases: ativação, reabsorção e formação. Inicialmente, osteoclastos são recrutados e, após diferenciação, degradam a matriz óssea por meio da liberação de ácidos proteolíticos. Com a apoptose dos osteoclastos, osteoblastos são ativados e depositam nova matriz óssea. Esse ciclo é regulado por citocinas e fatores de crescimento, sendo o eixo RANK-RANKL-OPG um dos principais mediadores. A ligação de RANKL ao receptor RANK ativa osteoclastos, enquanto a osteoprotegerina (OPG) inibe essa interação, prevenindo a reabsorção óssea (Suzuki, et al., 2020).

Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , promovem a osteoclastogênese, enquanto IL-4 e IL-10 exercem efeito inibitório. O óxido nítrico (NO) também desempenha papel importante na regulação óssea. A isoforma endotelial (eNOS) mantém funções homeostáticas, enquanto a forma induzível (iNOS) é ativada por inflamação. Em baixas concentrações, NO estimula osteoblastos e a formação óssea; em níveis elevados, promove apoptose osteoblástica e ativa osteoclastos, intensificando a reabsorção (Datta, et al., 2008).

Dessa forma, a homeostase óssea depende do equilíbrio entre a atividade osteoclástica e osteoblástica, regulada por citocinas, fatores de crescimento e mediadores como o NO, fundamentais para a remodelação e manutenção do tecido ósseo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar influência do bloqueio do iNOS pela aminoguanidina, na severidade de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico em ratos.

2.2. Objetivos específicos

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

3. REFERENCIAL TEÓRICO

O tecido ósseo é composto por cerca de 70% de material mineral e 30% de matéria orgânica. Cristais de cálcio e fósforo, hidroxiapatita e íons como sódio, flúor e magnésio fazem parte da porção mineral e a parte orgânica é composta principalmente por fibras de colágeno e em menor quantidade, glicoproteínas e proteoglicanos. (Tobeiha, et al., 2020). Sua homeostase consiste em uma constante formação e degradação orquestrada por osteoblastos e osteoclastos e procedimentos invasivos como exodontias geram reações inflamatórias que ativam essas células e estimulam a remodelação óssea. Esse processo é dividido nas fases de ativação, que se trata do recrutamento de osteoclastos para o local lesado, reabsorção, onde os osteoclastos maduros começam a secretar ácidos proteolíticos e assim degradam a matriz óssea, e após essa degradação da matriz óssea, os osteoclastos entram em apoptose e é sinalizado o recrutamento de osteoblastos que, grosso modo, produzem uma nova matriz óssea. (Kim, et al., 2020).

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea. Eles são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Após a síntese de matriz extracelular, o osteoblasto se aprisiona e passa a ser chamado de osteócito, onde ocorre a deposição de cálcio. De contrapartida dos osteoblastos que são depositadores de matriz óssea, os osteoclastos são responsáveis pela degradação da matriz óssea, sendo de uma linhagem celular diferente. Eles partem dos monócitos, que no tecido ósseo, se unem para formar osteoclastos multinucleados. Sua atividade é coordenada por citocinas, tais como RANK-RANKL e OPG. (Suzuki, et al., 2020).

Ademais, a relação da modelação óssea é caracteristicamente ligada a modulação de citocinas e fatores de crescimento, as quais influenciam vias de interação, como RANK-RANKL. Essas interações podem ocorrer de forma direta ou indireta, a depender da citocina e do processo em questão. O receptor ósseo RANK detém afinidade com a citocina RANKL, sinalizando quimiotaxia e fazendo com que citocinas essenciais para o processo de reabsorção sejam sintetizadas. No caso de exodontias, o estímulo gerado recruta células pró inflamatórias que produzem citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α , que agem de forma a influenciar e iniciar a osteoclastogênese e

promovem a função dos osteoclastos. Em contrapartida, citocinas como IL-4 e IL-10 inibem a osteoclastogênese. (Datta., et al., 2008).

Assim como a reabsorção de matriz óssea pode ser notada com o aumento da expressão de RANKL, como ocorre na doença de Paget, é notado que o aumento da expressão de OPG está ligado ao aumento da atividade osteoblástica e a deposição de matriz óssea. Estudos demonstram aumento da densidade óssea de acordo com o aumento da expressão de OPG, logo, percebe-se uma direta ligação de homeostasia e modulação entre as citocinas. RANKL e OPG, sendo duas citocinas antagônicas que se mostram igualmente necessárias. Desse modo, com o OPG a nível citoplasmático superior ao nível de RANKL, este se relaciona com o receptor RANK, cessando o processo de reabsorção e dando início a neodeposição (Tobeiha., et al., 2020).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que possui efeitos importantes na função das células ósseas. A isoforma endotelial do óxido nítrico (eNOS) é encontrada amplamente no osso, enquanto a forma induzível da NOS (iNOS) é expressa apenas em resposta a estímulos inflamatórios. Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e TNF induzem a ativação da via iNOS nas células ósseas, resultando em NO que potencializa a reabsorção causada pelas citocinas e pelo eixo RANK-RANKL-OPG. (Hof, et al., 2001).

Evidências indicam que o NO possui efeitos diferentes na reabsorção óssea. Quando em pequena quantidade, estimula a neoformação óssea e diferenciação de osteoblastos, porém, quando há grandes quantidades, estimula a apoptose dos mesmos, prejudicando a neoformação óssea e estimulando a diferenciação de osteoclastos. Estudos indicam que a via iNOS estimulada por IL-1 é de suma importância para a reabsorção óssea, pois a atuação de IL-1 em osteoblastos induz a formação de NO que ativa a via iNOS e assim aumenta a produção de progenitores de osteoclastos. (Hof, et al., 2001).

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 15/23 e um total de 48 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 ratos foram aleatoriamente (comando “Aleatório”, Microsoft Excel, 2010, Microsoft Corporation®) divididos em 06 grupos (n=8/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 controle aminoguanidina (GCA): tratado com solução salina estéril (0,1ml/kg) por via intravascular (i.v., acesso peniano) e 200 mg/kg de aminoguanidina (Guimarães, et al., 2011) por via subcutânea (0,1ml/kg).
- Grupo teste aminoguanidina (GTA): tratado com AZ (0,20mg/kg, i.v.) e 50, 100 ou 200 mg/kg de aminoguanidina (Guimarães, et al., 2011) por via subcutânea (0,1ml/kg).

4.2 Cálculo amostral

Baseado no estudo de Paola et al., (2004) que em modelo de perda óssea induzida por ligadura em mandíbula de ratos observou que o tratamento com aminoguanidina reduziu significativamente a perda óssea radiográfica comparado a um grupo tratado com veículo ($1,0 \pm 0,2$ vs $1,4 \pm 0,1$ mm), estimou-se necessário, com uma confiança de 95%, oito 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 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, D0), mantendo-se a partir daí diariamente 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 Hollembach 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 (60 mg/kg) e quetamina (240 mg/kg). 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, 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 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 serão 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

Com relação a variação de peso, pôde-se observar que o grupo tratado com aminoguanidina apresentou menor ganho de peso que o grupo salina a partir do 14º dia de experimento. Os grupos tratados com AZ e 50, 100 ou 200mg/kg de aminoguanidina apresentaram menor ganho de massa corporal que os animais AZ ou salina ($p<0,001$) (Tabela 1).

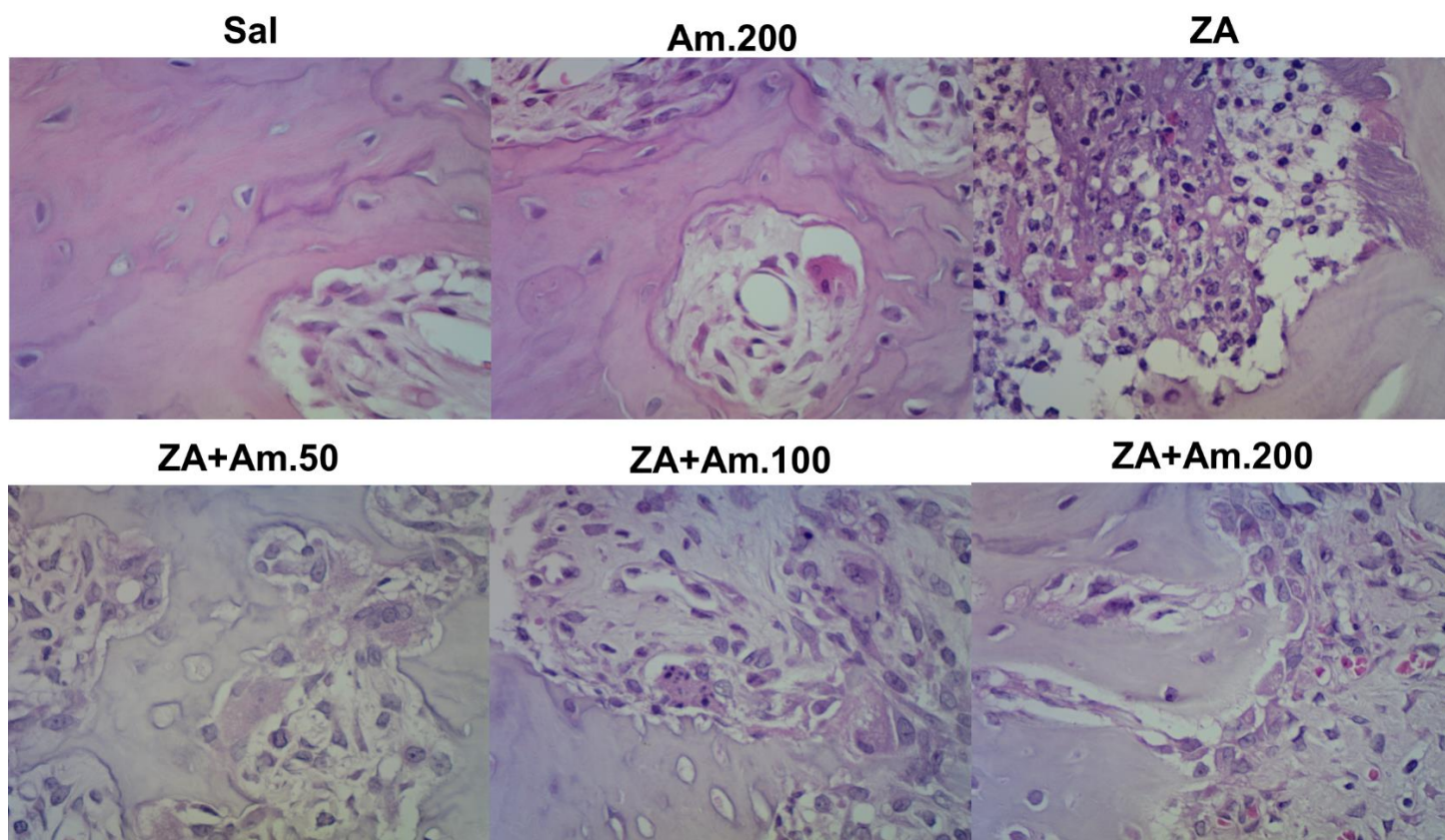
Tabela 1: Aspectos clínicos e histomorfométricos de ratos submetidos a modelo de OMB por AZ e tratados com diferentes doses de aminoguanidina

	Sal	Am.200	AZ (0,2 mg/kg)				p-Valor
			AZ	Am.50	Am.100	Am.200	
Dificuldade cirúrgica							
Fraturas	0.71±0.36	0.25±0.16	0.86±0.34	0.44±0.34	0.22±0.22	0.44±0.18	0,511
Tempo (s)	17.71±1.41	24.38±0.68	18.29±1.71	22.56±1.97	24.44±0.99	23.13±1.54	0,052
Peso (%)							
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	<0,001
7	123.93±0.63	104.04±0.62*	121.65±1.78	110.18±1.26	104.66±0.80*†	104.31±0.60*†	
14	142.15±2.08	110.33±1.06*	138.93±3.62	122.98±2.23	112.25±1.80*†	107.91±3.39*†	
21	152.42±2.76	110.16±1.49*	145.92±5.51	132.13±2.54	118.29±2.82*†	111.08±1.10*†	
28	164.10±3.78	115.56±2.28*	158.09±6.56	145.77±3.65*	127.54±3.32*†	117.75±1.45*†	
35	175.06±4.32	123.46±3.10*	167.73±7.19*	148.41±3.62*†	131.24±3.37*†	123.90±2.10*†	
42	183.54±5.09	126.19±3.56*	176.50±8.25*	155.45±4.26*†	135.85±3.79*†	125.33±1.92*†	
49	181.50±6.76	124.21±3.78*	172.07±8.81*	150.88±3.94*†	132.66±6.77*†	121.40±2.49*†	
56	179.73±4.83	124.21±3.78*	173.12±8.89*	154.43±3.90*†	137.00±7.09*†	121.40±2.49*†	
63	185.72±5.79	129.73±4.15*	178.82±8.65*	163.07±4.38*†	143.93±7.00*†	128.16±2.30*†	
70	191.37±6.23	129.73±4.15*	186.62±8.84*	164.94±4.36*†	145.07±7.06*	128.16±2.30*†	
Histologia							
Lacunas vazias (%)	32.32±2.18	42.30±2.05	56.75±2.07*	37.74±2.83†	44.56±2.49†	37.46±4.06†	<0,001
Osteoclastos	2.50±0.29	1.83±0.47	6.00±1.41*	1.80±0.53†	2.00±0.27†	3.00±0.73†	0,006
PMN	19.33±5.91	22.40±6.45	45.60±11.08*	23.25±8.14†	15.00±1.93†	14.75±2.38†	0,045
MN	38.14±5.60	34.14±5.14	33.00±10.34	45.25±6.25	35.80±7.41	42.75±6.30	0,864

* $p < 0,05$ versus grupo salina; $^{\dagger}p < 0,05$ versus grupo AZ; Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM).

A análise dos parâmetros histológicos demonstrou que o grupo AZ apresentou aumento significativa no percentual de lacunas de osteócitos vazias e os grupos tratados com 50, 100 ou 200 mg/kg de aminoguanidina apresentaram redução desse parâmetro ($p < 0,001$). A contagem total de osteoclastos também demonstrou aumento significativo no AZ e redução em todos os grupos tratados com aminoguanidina ($p = 0,008$). Não houve diferença significativa na contagem de células inflamatórias MN ($p = 0,864$), mas a contagem de PMN mostrou aumento no grupo AZ e redução nos grupos tratados com aminoguanidina ($p = 0,045$) (Tabela 1).

Figura 1 - Perfil histológico do alvéolo dentário de ratos submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico e tratados com aminoguanidina.



6. DISCUSSÃO

Neste modelo experimental, o grupo tratado exclusivamente com AZ apresentou aumento no percentual de lacunas de osteócitos vazias e maior contagem de osteoclastos, resultados que refletem a ação apoptótica e a alteração na atividade de remodelação óssea, mecanismos já relatados na literatura (Wyngaert et al., 2011). Esses parâmetros, quando elevados, sugerem comprometimento na vitalidade do tecido ósseo e indicam que o AZ, embora eficaz na redução da reabsorção, pode induzir toxicidade óssea.

A administração concomitante de aminoguanidina, em doses de 50, 100 ou 200 mg/kg, demonstrou efeito mitigador, evidenciado pela redução significativa das lacunas ósseas e pelo decréscimo na contagem de osteoclastos. Esse efeito sugere que a aminoguanidina exerce uma ação protetora, possivelmente através da modulação dos processos inflamatórios e do estresse oxidativo – mecanismos envolvidos na patogênese da osteonecrose da mandíbula relacionada a medicamentos (MRONJ) (Al-Salih et al., 2021). Estudos prévios já apontaram que a modulação inflamatória pode ser determinante na redução das respostas de osteonecrose induzidas por agentes antirreabsortivos, corroborando os resultados deste estudo (Wyngaert et al., 2011).

Além disso, a redução na contagem de células polimorfonucleares (PMN) no grupo tratado com aminoguanidina indica que esse agente pode atenuar a inflamação aguda, o que, por sua vez, contribui para a preservação da integridade do tecido ósseo (Al-Salih et al., 2021). Do ponto de vista sistêmico, o menor ganho de peso observado a partir do 14º dia em animais tratados com aminoguanidina – tanto isoladamente quanto em associação ao AZ – sugere a existência de efeitos metabólicos decorrentes da resposta inflamatória e de processos de estresse induzidos pelo AZ (Valachis et al., 2013), mas em especial, o tratamento com aminoguanidina parece demonstrar toxicidade significativa.

Embora o foco principal deste estudo seja o comportamento ósseo, tais alterações sistêmicas não podem ser desconsideradas, pois indicam que o impacto do tratamento vai além da localidade da intervenção, afetando o bem-estar geral dos animais. Essa observação encontra consonância em estudos que exploram os efeitos sistêmicos dos bisfosfonatos, os quais demonstram que, mesmo em doses terapêuticas, o AZ pode alterar parâmetros metabólicos e inflamatórios (Valachis et al., 2013).

Embora parte da literatura também destaque os potenciais efeitos benéficos da aminoguanidina, como a proteção contra o estresse oxidativo (Stevanović et al., 2010), esses achados devem ser ponderados com os dados de estudos experimentais que apontam para uma janela terapêutica limitada. O fato de que uma administração prolongada sem acompanhamento ou medidas protetivas pode resultar em toxicidade acentuada a necessidade de uma avaliação criteriosa dos benefícios versus os riscos, especialmente em tratamentos de longa duração. Desta forma, os mecanismos de toxicidade identificados reforçam a necessidade de definir regimes de dosagem seguros e de investigar regulamentos terapêuticos que possam neutralizar os efeitos adversos, antes que a aminoguanidina seja empregada de forma prolongada em contextos clínicos (Singh et al., 2018).

Adicionalmente, a evidenciação da modulação da atividade osteoclástica é de relevância, uma vez que a via RANK/RANKL tem sido implicada como um dos principais mecanismos patológicos ligados ao desenvolvimento da MRONJ (Wyngaert et al., 2011). A redução significativa na quantidade de osteoclastos em grupos tratados com aminoguanidina reforça a hipótese de que a inibição da ativação osteoclástica pode contribuir para a prevenção dos efeitos deletérios do AZ sobre o tecido ósseo. Essa perspectiva é apoiada por trabalhos que demonstram que, ao modular essa via, é possível reduzir a taxa de remodelação óssea e, conseqüentemente, preservar a integridade estrutural do osso (Wyngaert et al., 2011).

Por fim, a integração dos achados histológicos evidencia a complexidade do efeito do AZ quando associado a agentes moduladores inflamatórios. Enquanto o AZ, por si só, potencializa a apoptose osteocitária e aumenta a atividade de remodelação, a aminoguanidina parece equilibrar esses efeitos, promovendo um microambiente ósseo mais estável e menos suscetível à degeneração. Estudos experimentais em modelos animais, como o de Zhao et al. (Zhao et al., 2021), corroboram a eficácia de abordagens combinadas para prevenir a osteonecrose tecidual, sugerindo que a administração local ou sistêmica de agentes como a aminoguanidina possa ser uma estratégia promissora para mitigar os efeitos colaterais do AZ.

Em síntese, os dados apresentados evidenciam que a suplementação com aminoguanidina em modelos de MRONJ induzidos por AZ pode reduzir marcadores histológicos de necrose óssea, como as lacunas de osteócitos, além de modular a atividade osteoclástica e a resposta inflamatória. Esses achados são consistentes com a literatura que aponta para os efeitos adversos do AZ na homeostase óssea e para a

potencialidade de estratégias terapêuticas combinadas na mitigação dos mesmos (Valachis et al., 2013; Wyngaert et al., 2011). A confirmação desses mecanismos pode direcionar futuras investigações para aprimorar as abordagens de prevenção e tratamento da MRONJ, contribuindo para a melhoria do manejo clínico em pacientes submetidos ao tratamento com bisfosfonatos.

7. CONCLUSÃO

O tratamento com aminoguanidina reverte a OMB por meio de atenuação da resposta inflamatória e da ativação de osteoclastos e do percentual de lacunas de osteócitos vazias, mas possui toxicidade sistêmica significativa.

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**, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35935720/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- AL-SALIH, A.; DAM, A.; LINDBERG, P.; TRUEDSSON, A. Medication-related osteonecrosis of the jaws initiated by zoledronic acid and potential pathophysiology. **Dentistry Journal**, v. 9, n. 8, p. 85, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/dj9080085>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- BROZOSKI, M. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, p. 265–270, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/r5V35PrxMJ7xk9PJVyJn3JC/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- CREMERS, S. et al. Pharmacology of bisphosphonates. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 1052–1062, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30650219/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18441154/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- DE BARROS SILVA, P. G. et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Diseases**, v. 22, n. 7, p. 649–657, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27232600/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- 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, Patologia Oral y Cirugía Bucal**, v. 17, n. 4, p. e601, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22322496/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- ENDO, Y. et al. Basic studies on the mechanism, prevention, and treatment of osteonecrosis of the jaw induced by bisphosphonates. **Yakugaku Zasshi**, v. 140, n. 1, p. 63–79, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31902887/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- FAVIA, G. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: surgical or non-surgical treatment? **Oral Diseases**, v. 24, n. 1-2, p. 238–242, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29480596/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- FOX, S. W.; et al. Nitric oxide synthase expression in bone cells. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9662123/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.
- 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, v. 88, n. 5, p. 873–884, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12616527/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

GUIMARÃES, R. P. et al. Effects of induced diabetes and the administration of aminoguanidine in the biomechanical retention of implants: a study in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 6, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21732947/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

HANLEY, D. A. Biochemical markers of bone turnover. **The osteoporosis primer**. Cambridge University Press, 2000. p. 239–252.

KIM, D. et al. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 42, n. 5, p. 158–165, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23185696/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

KIM, J. M. et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2073, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32927921/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 9, p. 1115–1117, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12966493/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

MIGLIORATI, C. A.; BRENNAN, M. T.; PETERSON, D. E. Medication-related osteonecrosis of the jaws. **JNCI Monographs**, v. 2019, n. 53, p. lgz009, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31425596/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

MOSTAFA, A. M. et al. Protective effect of aminoguanidine against cardiovascular toxicity of chronic doxorubicin treatment in rats. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 106, n. 3, p. 193–202, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11485049/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

MURATSU, D. et al. Zoledronic acid enhances lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory reactions through controlled expression of SOCS1 in macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67906, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23874464/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

PAOLA, R. et al. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Dental Research**, vol. 83,4 (2004): 343-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15044511/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

PINTO, M. R. Role of induced nitric oxide synthases in orofacial nociception/discomfort after dental tooth bleaching with hydrogen peroxide. **Archives of Oral Biology**, v. 160, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38442471/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

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. 97–104, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27114946/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

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**, v. 72, n. 10, p. 1938–1956, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25234529/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

SAMBROOK, P.; COOPER, C. Osteoporosis. **Lancet**, v. 367,9527 (2006): 2010-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16782492/>. Acesso em 2 de Junho de 2025.

SHIBAHARA, T. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ): a twist of fate in the bone. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 247, n. 2, p. 75–86, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30713280/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

SILVA, P. G. B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 9, p. 1237–1245, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26093347/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

SINGH, M. et al. Effect of pyridoxine on toxicity of aminoguanidine and its neuroprotective effect in aluminum chloride induced dementia in rats. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 184–191, 2018. Disponível em: <https://ajpp.in/uploaded/p120.pdf>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

STEVANOVIĆ, I. et al. The effect of aminoguanidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, on AlCl₃ toxicity in the rat hippocampus. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 4, p. 981–991, 2010. Disponível em: <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0354-46641004981S>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

SUZUKI, A. et al. Role of metabolism in bone development and homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8992, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33256181/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

TOBEIHA, M. et al. RANKL/RANK/OPG pathway: A mechanism involved in exercise-induced bone remodeling. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 6910312, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32149122/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

TSUKAHARA, H. et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 270, n. 5, p. E840–E845, 1996. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3361509/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

VALACHIS, A. et al. Adjuvant therapy with zoledronic acid in patients with breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **The Oncologist**, v. 18, n. 4, p. 353–361, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23404816/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Immunology**, v. 103, n. 3, p. 255–261, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11454054/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

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 Odontológica Latinoamericana**, v. 28, n. 3, p. 215–221, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27095621/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

WYNGAERT, T. et al. Rank ligand inhibition in bone metastatic cancer and risk of osteonecrosis of the jaw (ONJ): Non bis in idem? **Supportive Care in Cancer**, v. 19, n. 12, p. 2035–2040, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21203781/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

ZHAO, J. et al. Local administration of zoledronic acid prevents traumatic osteonecrosis of the femoral head in rat models. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 27, p. 132–138, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33786320/>. Acesso em 21 de Junho de 2025.

ANEXO I: Parecer CEUA

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS



Of. No. 015/23

Protocolo a CEUA: 015/23

Pesquisador Responsável: PAULO GOBERLÂNIO DE BARROS SILVA

Título do Projeto: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA NA SEVERIDADE DE OSTEONECROSE INDUZIDA POR ÁCIDO ZOEDRÔNICO EM RATOS: ESTUDO HISTOMORFOMETICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

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 18 (dezoito) de julho de 2023.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:

Rattus Novergicus Machos

Número
Amostral:

40

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 18/07/2024.

Fortaleza, 18 de julho de 2023.

Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora

CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE