

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ESTUDO MURINOMÉTRICO, HISTOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO
DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR BIFOSFONATO**

Wilson José de Miranda Lima

SAPIENTIA AEDIFICAT

2023

WILSON JOSÉ DE MIRANDA LIMA

**ESTUDO MURINOMÉTRICO, HISTOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO
DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR BIFOSFONATO**

**MURINOMETRIC, HISTOLOGICAL, AND
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE INFLUENCE OF
OBESITY ON THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL
BISPHOSPHONATE-INDUCED OSTEONECROSIS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Francisco Alves

João Pessoa

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732e Lima, Wilson José de Miranda.

Estudo murinométrico, histológico e imuno-histoquímico da influência da obesidade no desenvolvimento da osteonecrose experimental induzida por bifosfonato / Wilson José de Miranda Lima. - João Pessoa, 2023.

100 f. : il.

Orientação: Adriano Francisco Alves.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia - Osteonecrose. 2. Ácido zoledrônico.
3. Obesidade. 4. Maxila. 5. Ratos Wistar. I. Alves, Adriano Francisco. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314(043)

Informações Complementares:

Título em outro idioma: Murinometric, histological, and immunohistochemical study of the influence of obesity on the development of experimental bisphosphonate-induced osteonecrosis.

Palavras-chave em outro idioma: Osteonecrosis. Bisphosphonates. Obesity. Jaws.

Área de concentração: Ciências Odontológicas.

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos Tecidos Buco-Maxilo-Faciais.

Banca examinadora: Examinador 1 (Dr. Adriano Francisco Alves, Programa de Pós-Graduação em Odontologia); Examinador 2 (Dra. Leopoldina de F Dantas de Almeida, Programa de Pós-Graduação em Odontologia); Examinador 3 (Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Odontologia); Examinador 4 (Dra. Luciene Simões de Assis Tafuri, Programa de Pós-Graduação em ensino de biologia em rede nacional); Examinador 5 (Dr. Luiz Henrique Cesar Vasconcelos, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos).

Data da defesa: 29-09-2023

Informações acadêmicas e profissionais do aluno

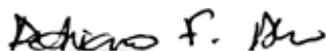
- ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8749-2137>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1118244271051841>

WILSON JOSÉ DE MIRANDA LIMA

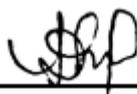
**ESTUDO MURINOMÉTRICO, HISTOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO
DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR BIFOSFONATO**

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a defesa de Tese apresentada em sessão pública no dia 29 de setembro de 2023 e atribuiu o conceito APROVADO.



Prof. Dr. Adriano Francisco Alves

Orientador - Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dra. Leopoldina de F Dantas de Almeida
Examinador – Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa
Examinador – Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dra. Luciene Simões de Assis Tafuri
Examinador - Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Luiz Henrique Cesar Vasconcelos
Examinador - Universidade Federal da Paraíba

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente para minha formação acadêmica e que ajudaram a manter este sonho vivo, em especial aos meus avós (*in memoriam*) Wilson Inácio de Lima e Maria Cavalcante de Lima que com certeza estão orgulhosos de todas as conquistas alcançadas. Eles ofereceram apoio significativo em termos financeiros, emocionais e espirituais para que eu pudesse chegar até este ponto.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Paraíba que tanto contribuiu e contribui com minha formação profissional.

Ao meu pai Francisco Inácio de Lima que nunca soltou minha mão, sempre me impulsionou a ir mais longe. Desde a época do vestibular, ele sempre me deu liberdade e disse: "Siga o que você desejar; quando você passar, arranjarémos uma maneira e você realizará". E assim foi até hoje, e aqui estamos, muito próximo de concretizar a maior conquista de nossas vidas. Sim, esta conquista é também sua, meu pai.

A Anderson dos Santos por toda contribuição emocional e suporte durante a realização do curso.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Adriano Alves por ter acreditado em mim desde o primeiro e-mail enviado (antes mesmo de me conhecer), por tanto cuidado, atenção, dedicação, empatia e por não desistir de me incentivar em nenhum momento. Por ser espelho para minha vida como profissional e ser humano.

Ao professor Dr. Ricardo Castro por todo apoio e por ter aceitado me orientar no início deste projeto.

À professora Dra. Jailane que contribuiu com orientações importantes e cedeu espaço do Laboratório de Nutrição Experimental para que parte deste estudo pudesse ser realizado.

Aos membros do Laboratório de Imunopatologia Experimental – LABIPEX por toda ajuda e contribuição que tiveram com a construção do trabalho, vocês foram fundamentais (Rubens Araújo, Mayara Nunes, Carolina Paiva, Jannerson Pontes, Ludmila, Gabrielle e Ana Beatriz).

Aos meus colegas de trabalho que tanto me incentivaram e me ajudaram diretamente e indiretamente na realização deste sonho (em especial a Sandra Martins, Pamella Kelly e Patrícia Almeida).

A vocês, muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.” —

Hipócrates.

RESUMO

A osteonecrose é uma doença caracterizada pela morte dos constituintes ósseos. Alguns compostos, como bifosfonatos, que atuam inibindo a reabsorção óssea, podem induzir a osteonecrose. Quando a doença ocorre nos maxilares induzida pelo uso de bifosfonatos ela é chamada de *BRONJ - Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaws*. A obesidade é considerada um problema de saúde pública e apresenta relação com outras doenças orais, como cárie e doença periodontal. Este estudo é pioneiro na identificação da relação entre obesidade e osteonecrose induzida por bifosfonatos. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência da obesidade no desenvolvimento da osteonecrose por bifosfonatos por meio de análises murinométricas, histológicas, imuno-histoquímicas e morfométricas. O experimento foi composto por 24 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade e peso aproximados de 30 dias e 180g. Foram divididos aleatoriamente e de maneira simples em quatro grupos: saudável, osteonecrose, obeso e obeso com osteonecrose. Foi realizada a indução da osteonecrose com utilização de ácido zoledrônico em solução injetável de 4mg/5mL via intraperitoneal, para cada 250µg/Kg, uma vez por semana, durante oito semanas, associada ao trauma ósseo (exodontia do primeiro molar inferior esquerdo) e indução da obesidade com uso de dieta de alto índice glicêmico. Cada grupo foi avaliado qualitativamente e quantitativamente com relação a: desenvolvimento da obesidade; desenvolvimento da osteonecrose, além da macroscopia e microscopia das lesões maxilares. Os resultados foram expressos como a percentagem da média e o desvio padrão, e analisados estatisticamente empregando-se análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). Os grupos obeso e obeso com osteonecrose apresentaram maiores médias e desvios padrões em relação aos seguintes parâmetros de avaliação da obesidade: evolução ponderal (350.6 ± 92.19 g e 341.9 ± 91.43 g, respectivamente), comprimento nasoanal (27.17 ± 1.16 cm), índice de Lee (0.30 ± 0.00 g/cm), índice de massa corporal (0.68 ± 0.04 g/cm² e 0.69 ± 0.04 g/cm²) e circunferência abdominal (20.5 ± 0.21 cm e 19.1 ± 0.14 cm). Em relação à circunferência torácica esta foi maior no grupo obeso (18.0 ± 1.28 cm), assim como o índice de adiposidade que foi maior nos animais que receberam a dieta de alto índice glicêmico (grupo obeso - 10.0 ± 1.03 g e grupo

obeso com osteonecrose - 10.4 ± 0.86 g). Morfologicamente foi observado que os animais no grupo com osteonecrose e no grupo obeso com osteonecrose apresentaram áreas maiores de necrose (médias: $172.83 \pm 18.19 \mu\text{m}^2$ e $290.33 \pm 15.77 \mu\text{m}^2$, respectivamente) ($p < 0,0001$). Foi observado esteatose hepática e aumento do tamanho dos adipócitos no grupo obeso (média: $97.75 \pm 1.91 \mu\text{m}^2$) e no grupo obeso com osteonecrose (média: $98.41 \pm 1.56 \mu\text{m}^2$), indicando maior dano nos tecidos nesses grupos ($p < 0,0001$). Em relação às análises imunohistoquímicas, os grupos saudável e obeso apresentaram intensa deposição de matriz extracelular. Quanto ao TNF-alfa, observou-se marcação intensa e multifocal nos grupos osteonecrose ($27.59 \pm 7.65 \mu\text{m}^2$) e obeso ($25.52 \pm 8.31 \mu\text{m}^2$). Para o TGF- β , a marcação também foi intensa e multifocal especialmente no grupo obeso com osteonecrose ($44.98 \pm 3.93 \mu\text{m}^2$). Já para o colágeno I a marcação foi mais intensa nos animais saudáveis ($26.73 \pm 8.29 \mu\text{m}^2$), enquanto nos outros grupos foi discreta e focal. Percebe-se a influência da obesidade no desenvolvimento da osteonecrose uma vez que os animais dos grupos obeso e obeso com osteonecrose demonstraram maiores danos teciduais. O estudo sugere que o TNF-alfa e o TGF- β podem desempenhar papéis importantes no dano e reparo do tecido ósseo. A possível interação entre o TGF- β , TNF-alfa e o colágeno I no tecido ósseo pode ser essencial para compreender o remodelamento ósseo, prevenção e tratamento de doenças, portanto mais estudos são necessários para explorar os mecanismos existentes.

Palavras-chave: Osteonecrose; Ácido zoledrônico; Obesidade; Maxila; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Osteonecrosis is a disease characterized by the death of bone constituents. Some compounds, such as bisphosphonates, which work by inhibiting bone resorption, can induce osteonecrosis. When the disease occurs in the jaws induced by the use of bisphosphonates, it is called BRONJ - Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaws. Obesity is considered a public health problem and is related to other oral diseases, such as caries and periodontal disease. This study is pioneering in identifying the relationship between obesity and bisphosphonate-induced osteonecrosis. The aim of this work was to analyze the influence of obesity on the development of bisphosphonate-induced osteonecrosis through murinometric, histological, immunohistochemical, and morphometric analyses. The experiment consisted of 24 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with an approximate age and weight of 30 days and 180g. They were randomly and simply divided into four groups: healthy, osteonecrosis, obese, and obese with osteonecrosis. Osteonecrosis was induced using zoledronic acid in an injectable solution of 4mg/5mL via intraperitoneal, at a dose of 250µg/Kg, once a week for eight weeks, along with bone trauma (extraction of the left lower first molar) and induction of obesity using a high-glycemic-index diet. Each group was qualitatively and quantitatively evaluated for obesity development, osteonecrosis development, as well as macroscopic and microscopic maxillary lesions. The results were expressed as the mean percentage and standard deviation and statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test ($\alpha = 5\%$). The obese and obese with osteonecrosis groups showed higher means and standard deviations for the following obesity evaluation parameters: weight gain (350.6 ± 92.19 g and 341.9 ± 91.43 g, respectively), nasoanal length (27.17 ± 1.16 cm), Lee index (0.30 ± 0.00 g/cm), body mass index (0.68 ± 0.04 g/cm² and 0.69 ± 0.04 g/cm²), and abdominal circumference (20.5 ± 0.21 cm and 19.1 ± 0.14 cm). The obese group also had a larger chest circumference (18.0 ± 1.28 cm), as well as a higher adiposity index in animals receiving the high-glycemic-index diet (obese group - 10.0 ± 1.03 g and obese with osteonecrosis group - 10.4 ± 0.86 g). Morphologically, it was observed that animals in the osteonecrosis group and obese with osteonecrosis group had larger areas of

necrosis (means: $172.83 \pm 18.19 \mu\text{m}^2$ and $290.33 \pm 15.77 \mu\text{m}^2$, respectively) ($p < 0.0001$). Hepatic steatosis and increased adipocyte size were observed in the obese group (mean: $97.75 \pm 1.91 \mu\text{m}^2$) and the obese with osteonecrosis group (mean: $98.41 \pm 1.56 \mu\text{m}^2$), indicating greater tissue damage in these groups ($p < 0.0001$). Regarding immunohistochemical analyses, the healthy and obese groups showed intense extracellular matrix deposition. For TNF-alpha, intense and multifocal staining was observed in the osteonecrosis ($27.59 \pm 7.65 \mu\text{m}^2$) and obese ($25.52 \pm 8.31 \mu\text{m}^2$) groups. For TGF- β , staining was also intense and multifocal, especially in the obese with osteonecrosis group ($44.98 \pm 3.93 \mu\text{m}^2$). As for collagen I, staining was more intense in healthy animals ($26.73 \pm 8.29 \mu\text{m}^2$), while in other groups, it was discrete and focal. The influence of obesity on the development of osteonecrosis is evident, as animals in the obese and obese with osteonecrosis groups demonstrated greater tissue damage. The study suggests that TNF-alpha and TGF- β may play important roles in bone tissue damage and repair. The potential interaction between TGF- β , TNF-alpha, and collagen I in bone tissue could be essential for understanding bone remodeling, disease prevention, and treatment. Therefore, further studies are needed to explore the existing mechanisms.

Keywords: Osteonecrosis; Zoledronic acid; Obesity; Maxilla; Wistar Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS - Associação Americana de Cirurgiões Bucomaxilofaciais

ABESO - Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica

AGP - Glicoproteína ácido alfa-1

ANOVA - Análise de variância

ATP - Adenosina trifosfato

BMP - Proteína morfogenética óssea

BRONJ – Osteonecrose nos maxilares relacionada a bifosfonatos

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

DAIG - Dieta de alto índice glicêmico

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina-1

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 - Interleucina-6

IMC - Índice de Massa Corporal

MRONJ - Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamento

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPG - Osteoprotegerina

PCR - Proteína C reativa

POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares

PTH - Paratormônio

RANK - Receptor ativador do NF- κ B

RANKL - Ligante do receptor ativador do NF- κ B

TGF- β - Fator transformador do crescimento beta

TNF - Fatores de necrose tumoral

TNF-alfa - Fator de necrose tumoral alfa

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

VIGITEL - Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

1ºMIE – Primeiro molar inferior esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos	4
2.2 Fisiopatologia do reparo ósseo	6
2.3 Estágios e tratamentos da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos	10
2.4 Modelos animais de indução da osteonecrose por medicamentos	12
2.5 Definição, epidemiologia e etiologia da obesidade	13
2.6 Fisiopatologia e comorbidades associadas a obesidade	16
2.7 Modelos animais de indução de obesidade	16
3. OBJETIVOS	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 Amostra	19
4.2 Indução da osteonecrose	19
4.3 Indução e avaliação do modelo experimental	21
4.4 Exame físico da cavidade oral	25
4.5 Eutanásia	26
4.6 Processamento histológico	26
4.7 Análises histológicas em microscopia de luz e histomorfométrica	26
4.8 Análises imuno-histoquímica e histomorfométrica	27
4.9 Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Indução e avaliação do modelo experimental	29
5.2 Análise anatomo-patológica e morfométrica	34
5.3 Análise imuno-histoquímica e morfométrica	41
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

A Associação Americana de Cirurgiões Bucomaxilofaciais (AAOMS) definiu a osteonecrose relacionada a medicamentos nos maxilares (MRONJ) como a presença de exposição óssea ou osso que possa ser sondado através de uma fístula intraoral ou extraoral na região bucomaxilofacial, persistindo sem reparo por mais de oito semanas em pacientes submetidos a tratamento com medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos, com ausência de terapia prévia por radiação ou doenças metastáticas nos maxilares (1).

Dentre os medicamentos antiangiogênicos e antirreabsortivos com potencial para induzir a doença, podemos mencionar os bifosfonatos, que pertencem a uma classe de medicamentos indicados para o tratamento de distúrbios osteolíticos ou do metabolismo ósseo, como osteoporose, doença de *Paget*, metástases ósseas (principalmente resultantes de tumores primários localizados na mama, pulmão, próstata ou mieloma múltiplo), hipercalcemia associada a malignidades e osteogênese imperfeita (2).

Os bifosfonatos atuam inibindo a reabsorção óssea, e esse efeito é principalmente atribuído à sua ação inibitória sobre os osteoclastos. Eles se concentram nos ossos, devido à sua alta afinidade por cristais de hidroxapatita. Durante a reabsorção osteoclástica, esses medicamentos são fagocitados pelos osteoclastos juntamente com a matriz óssea degradada por meio da ação de proteases e ácidos liberados por essas células. Uma vez fagocitados, os bifosfonatos atuam dentro dos osteoclastos, prejudicando sua função (3).

Na fase de reabsorção óssea dos osteoclastos, o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) é liberado da matriz óssea e ativado, deste modo passa a recrutar células-tronco mesenquimais para a área de reabsorção. Em seguida as células-tronco mesenquimais passam pelo processo de diferenciação osteoblástica e depositam novas células ósseas na área de reabsorção mantendo assim a integridade estrutural do tecido (4). Além disso, o TGF- β também recruta fibroblastos, que atuam na síntese de colágeno do tipo I, importante para a remodelação (5) (Figura 01).

O TGF- β é produzido inicialmente na forma inativa associado ao LAP (peptídeo associado a latência), sendo incapaz de interagir com seus receptores

específicos e assim desempenhar seu papel biológico. Após a síntese, esta citocina é secretada no interstício, sendo armazenada em associação com proteínas de matriz extracelular até sua ativação onde fica apta para interagir com seus receptores específicos (6). Sua liberação na matriz óssea durante a reabsorção óssea osteoclástica é fundamental para o direcionamento e migração de células-tronco mesenquimais ósseas para as superfícies de reabsorção (7).

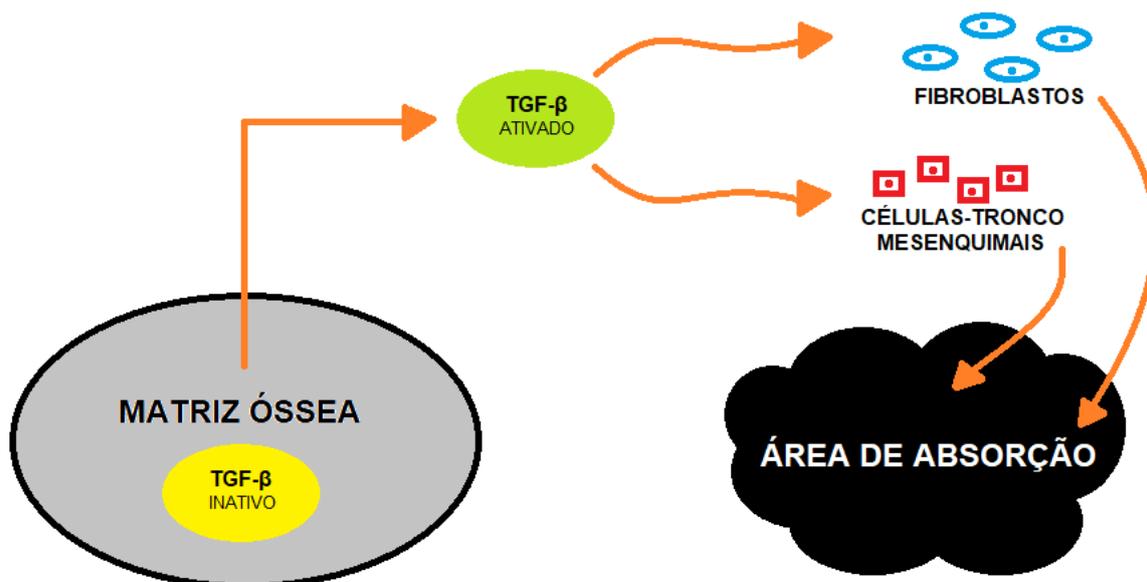


Figura 01 – Representação do processo de reabsorção óssea com liberação do TGF- β .

Um dos problemas de saúde que pode afetar o tecido ósseo é a obesidade. Este, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), atinge aproximadamente 650 milhões de adultos em todo o mundo. A obesidade resulta do acúmulo de gordura no corpo. O excesso de tecido adiposo leva a um estado de inflamação crônica e estresse oxidativo, que causam danos celulares (8). Ambas as situações estão relacionadas ao desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade, incluindo resistência à insulina, dislipidemia, esteatose hepática, problemas intestinais, doenças renais, hipertensão e o surgimento de vários tipos de câncer, como o câncer colorretal (9).

A Osteonecrose nos maxilares relacionada a bifosfonatos (BRONJ) apresenta alto grau de morbidade, também com impacto negativo na qualidade de

vida do paciente (10). Muitas perguntas relacionadas à BRONJ ainda precisam ser esclarecidas. No entanto, existe uma contradição nesta situação, pois um dos efeitos mais sérios causados pelo uso destes medicamentos ocorre exatamente no tecido onde ele deveria exercer função de proteção (11). Apesar da existência de hipóteses que buscam elucidar os mecanismos que culminam na osteonecrose, se faz necessário o estudo dos complexos e dinâmicos mecanismos que envolvem a fisiopatologia óssea e associado a isso, os fatores ainda não estudados, que podem influenciar esses mecanismos como por exemplo, a obesidade (12).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos

A osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamento (MRONJ) é uma condição de saúde crítica (11). Dentre os medicamentos que podem gerar este problema podemos citar os bifosfonatos, que correspondem a uma classe de medicamentos indicados para o tratamento de doenças ósseas (2,13), porém existem estudos que comprovam que o uso destes bifosfonatos influencia diretamente no desenvolvimento da osteonecrose (14–16).

Os bifosfonatos se acumulam na matriz óssea, por adsorção e incorporação à estrutura da hidroxiapatita, mantendo-se por um longo tempo gerando seus efeitos farmacológicos desejáveis e indesejáveis (17). Na estrutura química dos bifosfonatos (Figura 02) existem dois grupos fosfatos que são essenciais para sua ligação à hidroxiapatita e dois radicais R1 e R2. O radical R1 atua aumentando sua afinidade pelo cálcio da hidroxiapatita enquanto o radical R2 atua determinando a potência antirreabsortiva (18).

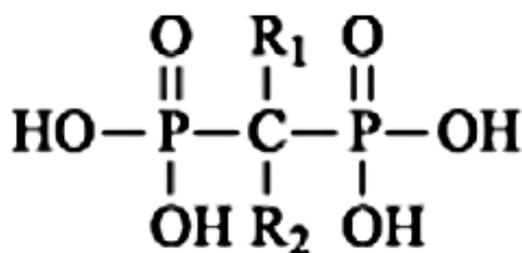


Figura 02 - Estrutura química básica dos bifosfonatos.

FONTE: Adaptado de Fernandes et al. (2005) (19)

A absorção de bifosfonatos é baixa quando administrado por via oral em taxas iguais ou inferiores a 1% da dose total. Quando administrados por via intravenosa, são rapidamente removidos pelo plasma apresentando taxa de excreção renal de 40% nas primeiras 24 horas, sem metabolização. Nos ossos, a meia vida dos bifosfonatos dura cerca de 10 anos. Diferentes grupos de bifosfonatos podem atuar por meio de mecanismos distintos, porém todos têm em comum a diminuição da atividade osteoclástica e indução de sua apoptose (20).

A apresentação oral é muito utilizada no tratamento de osteoporose, sendo o alendronato, o risedronato e o ibandronato os mais utilizados. Essas drogas têm a capacidade de induzir a apoptose de osteoclastos, diminuindo as áreas de reabsorção, aumentando assim a densidade mineral do osso (21). De acordo com Tardast et al. (2015) o aparecimento de osteonecrose da mandíbula ocorre mais rapidamente nos pacientes tratados com bifosfonatos por via parental (média de 2,5 anos) quando comparados aos pacientes que fazem uso de bifosfonatos orais (média de 6 anos) (22).

Existem os bifosfonatos nitrogenados e não nitrogenados. O aumento da potência ocorre devido à reestruturação farmacológica da molécula-base do bifosfonato, na qual cadeias laterais contendo nitrogênio são adicionadas à estrutura de carbono. Eles podem ser divididos em três gerações sendo a primeira e a segunda formada por bifosfonatos não nitrogenados e a terceira por nitrogenados (23).

Na primeira geração encontramos os fármacos: etidronato, clodronato e tiludronato, os quais induzem a formação de metabólitos citotóxicos do trifosfato de adenosina (ATP), análogos dos bifosfonatos, que interferem com as enzimas metabólicas intracelulares. Esta citotoxicidade pode induzir à apoptose das células osteoclásticas (24).

A segunda geração é formada pelos fármacos: pamidronato, alendronato, neridronato, olpadronato e ibandronato, sendo esta de 10 a 1000 vezes mais potentes, comparativamente com os da primeira geração. O seu mecanismo centra-se na inibição da farnesil pirofosfatase, enzima que participa na via intracelular do mevalonato e na formação do colesterol, como produto (25).

Por fim, na terceira geração estão os fármacos: risedronato e zolendronato, que são dotados de maior atividade farmacológica, menos efeitos secundários e menor absorção ao nível ósseo (26), por isso a escolha desse fármaco na indução do modelo experimental (Figura 03).

A osteonecrose da mandíbula relacionada ao uso de bifosfonatos trata-se de uma reação adversa grave, que afeta a mandíbula por meio de alterações, com potencial para causar destruição no tecido ósseo, sendo uma complicação de interesse para o cirurgião dentista. Clinicamente é evidenciada pela presença de osso exposto na cavidade oral (28,29).

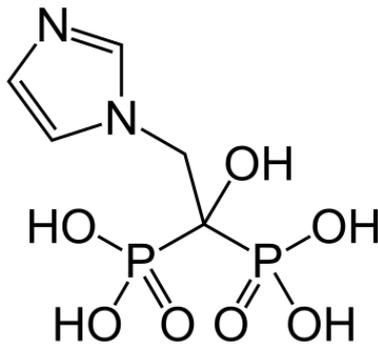


Figura 03 - Estrutura química do ácido zoledrônico.

FONTE: (27)

Santos et al., (2011) (30) descrevem em seu trabalho que a mandíbula em comparação com a maxila é considerada uma das regiões mais afetadas pela osteonecrose por ter menos vascularização. Além disso, sob a presença de ácido zoledrônico podem ocorrer distúrbios na microcirculação comprometendo a circulação e angiogênese. Além disso, existem outros fatores que podem dificultar o tratamento na área, como a presença de dentes com higienização precária, que pode levar a contaminação e gerar infecções por via endodôntica ou periodontal.

A osteonecrose mandibular associada a bifosfonatos foi descrita pela primeira vez em 2003, por meio de relatos de séries de casos, com o uso de zolendronato e pamidronato intravenosos em pacientes com tratamento oncológico. É o resultado da incapacidade do osso e agravos durante processo de mastigação, manipulação ou infecções dentárias, que requerem uma maior reserva óssea funcional (31).

Apesar das várias teorias buscarem elucidar os mecanismos que culminam na osteonecrose, o discernimento dessa condição também caminha com a evolução no conhecimento dos complexos e dinâmicos mecanismos que envolvem a fisiopatologia óssea (12), por esse motivo, eles devem ser estudados.

2.2 Fisiopatologia do reparo ósseo

O tecido ósseo pode ser considerado um dos principais componentes do esqueleto, servindo de suporte para os tecidos moles e proteção para órgãos importantes, como encéfalo, coração, pulmões e medula óssea, além disso, ele é

um depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os e liberando-os controladamente para o corpo (32).

Composto por células e matriz óssea, ele é um tipo especializado de tecido conjuntivo (Figura 04). Existem duas linhagens celulares, a osteoblástica que é formada por osteoblastos e osteócitos e a osteoclástica composta por osteoclastos originados de monócitos produzidos pela medula hematopoiética (32).



Figura 04 - Detalhe da zona de ossificação do disco epifisário. Microscopia óptica. HE. 20x.

FONTE: (32)

A interação entre os osteoblastos e osteoclastos resulta em alterações no tecido ósseo. Células da linhagem osteoblástica não estão apenas envolvidas na formação óssea, mas também regulam a diferenciação de osteoclastos e sua ativação e sobrevivência. Para que isso ocorra, se faz necessário a liberação de várias moléculas, entre citocinas, neurotransmissores e fatores de crescimento, por meio de alterações da microvascularização local. Desse modo, no sítio de compressão, ocorrerá um aumento da expressão de fatores da osteoclastogênese enquanto, no lado da tensão, o aumento de fatores osteogênicos (33).

Durante o processo de remodelação óssea, os osteoclastos se movem pela superfície óssea escavando e formando depressões pela secreção de íons hidrogênio e de enzimas proteolíticas. Esse mecanismo libera as citocinas: fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e o fator transformador do crescimento beta (TGF- β), que ficam no osteóide destas. Em seguida, os osteoclastos recrutam e ativam osteoblastos à se diferenciarem a partir de células precursoras (osteoblastos) e ficam aguardando a sinalização para exercer sua função. Os osteoblastos por sua vez, adentram o local, sintetizando e secretando o osteóide, além de secretar IGF-1 e TGF- β – que ficam presos no osteóide. Alguns osteoblastos acabam formando osteócitos enquanto outros interagem com os precursores dos osteoclastos fazendo a ativação deles dando início novamente ao processo (34).

Segundo Santos et al. (2011) (30), o metabolismo da osteoclastogênese é dependente dos osteoblastos e é regulada por três importantes moléculas: osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor ativador do NF-kB (RANKL) e o receptor ativador do NF-kB (RANK). RANKL é um membro da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF), sintetizado pelos osteoblastos, pelas células do estroma da medula óssea, linfócitos T e células endoteliais. Ao se ligar ao RANK expresso nos precursores de osteoclastos, linfócitos T e células endoteliais, o RANKL ativa os osteoclastos e deste modo ocorre a formação de células multinucleadas. Em seguida, paratormônio (PTH), glicocorticoides e prostaglandinas E2 aumentam a atividade do RANKL e reduzem a atividade da osteoprotegerina (OPG) no tecido ósseo. Por outro lado, os efeitos do RANKL são bloqueados pela OPG, que age como um receptor antagonista de RANKL prevenindo a reabsorção óssea (Figura 05).

Durante a reabsorção óssea, a proteína morfogenética óssea (BMP) e IGF-1 e -2 são liberados e permanecem como citocinas ativas. Em seguida, elas se ligam às superfícies da membrana celular das células-tronco locais e induzem a diferenciação em osteoblastos que posteriormente serão estimulados a secretar osteóide. Os osteoblastos sintetizam e liberam osteoprotegerina (OPG), que é uma proteína, idêntica ao RANK e funciona como um sinal inibitório para o osteoclasto que regula a taxa de reabsorção (35).

Em um processo conjunto de neutralização dos precursores de osteoblastos e de osteoclastos, a OPG pode se ligar a RANKL inibindo sua ligação ao receptor RANK no precursor de osteoclasto. A proporção de RANKL/OPG é crítica para a formação e atividade dos osteoclastos, e o sistema RANK, RANKL, OPG é fundamental para o processo de remodelação óssea (34). À medida que o osteoblasto amadurece em um osteócito, ele perde gradualmente sua capacidade de secretar OPG e se torna vulnerável à reabsorção osteoclástica normal (35).

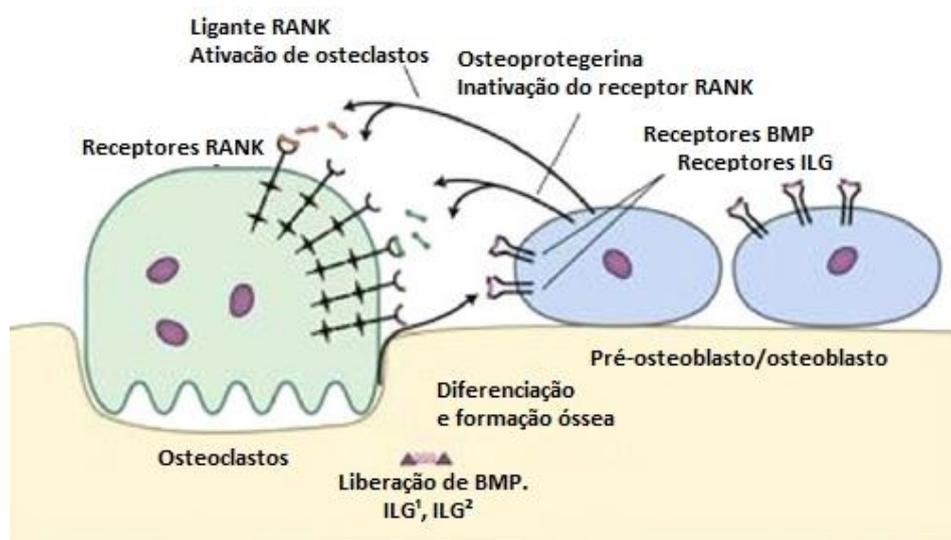


Figura 05 – Interação molecular entre osteoclasto e osteoblasto.

FONTE: Adaptado de Marx (2007) (35).

Desde a sua descoberta na década de 90, os papéis de RANKL, RANK e OPG, na regulação da osteoclastogênese, têm sido amplamente estudados. Ao longo do tempo, foram evidenciadas suas implicações na regulação não só na remodelação do tecido ósseo, mas de outros, como por exemplo: formação de linfonodos, desenvolvimento de glândulas mamárias e controle da febre. Esse sistema pode passar por desordens que podem estar associadas a algumas doenças, incluindo osteoporose pós-menopausa, artrite reumatoide e tumores ósseos (37,38).

Como o RANKL é o ligante conhecido para o RANK, faz-se necessário compreender o efeito da expressão deste, sob condições normais e alteradas, durante o processo de remodelação óssea. Sabe-se que paratormônio,

prostaglandina E2, dexametasona, citocinas inflamatórias (IL-1, TNF-alfa) e 1,25 dihidrovitamina D3 estimulam a expressão de RANKL. Por outro lado, estrogênio e TGF- β atenuam sua expressão (39).

A descoberta de que esses fatores (RANKL e RANK) são importantes para a osteoclastogênese e ativação osteoclástica *in vivo* impulsionou o desenvolvimento de novas pesquisas na área de terapêutica medicamentosa (37,38). Embora IL-1 e TNF-alfa tenham sido propostos como efetivos no controle da perda óssea em artrites, são muito menos potentes que o RANKL em termos de indução de osteoclastos. Portanto, o controle de RANKL e RANK, em nível de receptores ou de via de sinalização, pode ser uma importante ferramenta no tratamento de reabsorção óssea indesejada. Isso pode ser alcançado, por exemplo, com o uso de OPG recombinante e anticorpos anti-RANKL (39,40).

2.3 Estágios e tratamentos da Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos

De acordo com a AAOMS a MRONJ pode se manifestar por meio de diferentes sinais e sintomas com níveis distintos de gravidade e complexidade, sendo dividida em alguns estágios que obedecem a critérios específicos de classificação. São eles: em risco, estágio 0, estágio 1, estágio 2 e estágio 3 (11). As principais características desta classificação estão descritas abaixo (Quadro 01).

Quadro 01 – Descrição das principais características da classificação dos estágios da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos.

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
Em risco	Nesta classificação se enquadram pacientes que fazem ou fizeram uso de medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos, mas que não apresentam sinais e sintomas ou evidências de osso necrótico. O paciente precisa ser orientado sobre os riscos potenciais.

<p style="text-align: center;">Estágio 0</p>	<p>Clinicamente não há indícios de exposição óssea necrótica, porém os pacientes apresentam achados clínicos, radiográficos e sintomas inespecíficos.</p> <p><u>Achados clínicos:</u> presença de fístula periodontal ou periapical que não está assoada a processos infecciosos orais, apresenta relação com necrose pulpar decorrente de traumas, restaurações ou cárie, mobilidade dentária não associada à doença periodontal.</p> <p><u>Achados radiográficos:</u> Áreas osteoescleróticas (radiopacas ou hipodensas) no osso alveolar ou basilar; mudanças no padrão trabecular como maior densidade óssea e ausência de remodelação óssea pós-extração constatada por persistência da cavidade alveolar, lâmina dura espessa, esclerótica e redução do espaço do ligamento periodontal.</p> <p><u>Sintomas inespecíficos:</u> Dor óssea na mandíbula que pode irradiar para a região da articulação temporomandibular, dor sinusal que pode vir acompanhada de espessamento ou inflamação da parede do seio maxilar ou ainda dor de dente sem fundamentação odontogênica.</p> <p><u>Tratamento:</u> Abordagem restauradora de lesões cariosas e doença periodontal. Se necessário, deve ser realizada a prescrição de medicamentos para a dor crônica e antibióticos para o controle da infecção.</p>
<p style="text-align: center;">Estágio 1</p>	<p>Como sinais radiográficos os podem ser semelhantes aos elencados no estágio 0, a diferença é que no estágio 1 os pacientes não apresentam infecção e são assintomáticos e o tratamento cirúrgico está contraindicado, sendo importante a manutenção da higiene oral e o uso de enxaguantes antimicrobianos, além do acompanhamento odontológico.</p>

<p style="text-align: center;">Estágio 2</p>	<p>Pacientes apresentam infecção e frequentemente são sintomáticos e o tratamento é realizado com uso combinado de analgésicos, antibióticos e enxaguantes antimicrobianos, sendo recomendado o desbridamento cirúrgico para a diminuição da irritação nos tecidos moles.</p>
<p style="text-align: center;">Estágio 3</p>	<p>Estágio mais severo no qual os pacientes apresentam osso necrótico exposto com infecção ou sondado por meio de fístula associado a pelo menos uma das seguintes complicações: fratura patológica, fístula extraoral, comunicação oro-sinusal ou oro-nasal, apresentam osteólise que atinge o assoalho do seio ou a borda inferior da mandíbula, exposição de osso necrótico além do osso alveolar, afetando áreas de seio maxilar, zigomático, margem inferior ou ramo da mandíbula, é recomendado como tratamento o debridamento cirúrgico com ressecção e combinação à terapia antibiótica e ao uso de enxaguantes antimicrobianos e analgésicos.</p>

FONTE: Adaptado de Ruggiero et al. (11).

2.4 Modelos animais de indução de osteonecrose por medicamentos

Em 1981 foi relatado o potencial osteonecrótico dos bifosfonatos por Gotcher e Jee (41), porém apenas no ano de 2008 ocorreu um dos primeiros estudos em modelos animais com o objetivo de estudar a MRONJ. Este foi desenvolvido em cães a fim de avaliar os efeitos de bifosfonatos administrados via oral no tecido ósseo (42). Logo em seguida em 2009, foi publicado um estudo com ratos que associou a administração de bifosfonatos e corticosteroides à exodontia para indução da MRONJ (43).

O interesse no desenvolvimento de modelos animais, que possam reproduzir com sucesso lesões de osteonecrose equivalentes as que ocorrem em humanos (clínica, radiográfica e histopatologicamente), vem aumentando e

estudos vem sendo desenvolvidos com esse objetivo (14–16). Clinicamente, a osteonecrose é definida pela presença de osso exposto (28,29).

Podem ser realizados exames de imagem microtomográficos e radiográficos para identificação de reação periosteal, sequestro ósseo, destruição cortical, osteólise, osteoesclerose, aumento do volume ósseo entre outros (44,45). Com relação à histopatologia em modelos animais são evidenciadas as seguintes características: necrose óssea, caracterizado por lacunas osteolíticas, presença de infecção, sequestro ósseo, inflamação e reação periosteal (46).

Estudos relataram que osteoclastos, na presença de bifosfonatos, podem apresentar mudanças de forma e de tamanho, sendo maiores e mais arredondados (47,48). Alguns estudos destacam a importância do trauma associado (exodontia), como estímulo para a manifestação da doença (49,50), outros buscam compreender a associação com comorbidades como diabetes (51) e uso de corticosteroides (43), papel da infecção nesse processo (46,49) e como ocorre a inibição da angiogênese (52). Vale ressaltar que a maioria dos modelos utilizou ratos e camundongos para o estudo da MRONJ. Também existem modelos que objetivaram investigar possibilidades de eficácia em tratamento e prevenção da MRONJ, como a laserterapia (53), pentoxifilina (54), vitamina D (55), teriparatida – que é contraindicada para pacientes com osteossarcoma e metástase óssea (17).

São utilizadas diversas metodologias de pesquisa, e essa diversidade metodológica pode tornar a comparação entre os resultados desafiadora. No entanto, devido à natureza variável da doença existe a possibilidade de simulação de diversas situações clínicas às quais os pacientes podem estar expostos (diferenças nas doses, tempo de administração, como a doença se manifesta na presença ou ausência de traumas, bem como de comorbidades) (45).

2.5 Definição, epidemiologia e etiologia da obesidade

A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve a obesidade como acúmulo anormal ou excessivo de gordura podendo ser prejudicial à saúde e afirma que a maioria da população vive em países onde a obesidade mata mais

peças do que a desnutrição, sendo considerada como uma epidemia mundial e um dos problemas de saúde pública mais graves da atualidade (56).

Por se tratar de uma doença multifatorial, com agravos muitas vezes silenciosos, se não houver prevenção e tratamento correto, a obesidade pode gerar consequências para o indivíduo (57). A prevalência de excesso de peso e obesidade está aumentando de maneira acelerada em muitos países. Este aumento pode ser explicado por fatores como: mudanças comportamentais ocorridas nas últimas décadas, alimentação inadequada e sedentarismo (58).

A obesidade está relacionada a diversas doenças crônicas (59). Segundo dados da Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO), estima-se que até 2025, 2,3 bilhões de adultos no mundo estarão acima do peso. De acordo com o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) no ano de 2020 houve um aumento na taxa de obesidade no Brasil que passou de 11,8% para 21,5%, entre 2006 e 2020, além disso, 57,5% se encontravam com excesso de peso. Para fins de comparação das consequências da obesidade, no Brasil, a prevalência de diabetes em adultos com peso normal/baixo peso é de 5,4%, e na população com obesidade é mais que o dobro (14,0%) (60).

Vale ressaltar que a obesidade também é responsável por uma sobrecarga nos sistemas de saúde. Estima-se que a doença seja responsável por 0,7 a 2,8% dos custos totais de saúde de um país e que os obesos tenham custos médicos 30% mais altos do que os indivíduos que não possuem obesidade. Caso não ocorram ações que busquem reduzir estes números, os custos associados ao tratamento da doença também tendem a aumentar (61).

A obesidade apresenta relação com saúde bucal sendo muitas vezes marcada por uma dieta desequilibrada e rica em açúcares, que estimulam a proliferação de bactérias cariogênicas o que pode corresponder ao surgimento de algumas doenças orais, como a cárie dentária e doenças periodontais. Além disso, os impactos gerados por estas doenças podem causar incapacidade mastigatória, levando a mudanças como a troca de alimentos (62,63).

De acordo com Duarte (64) em um estudo realizado em 2022 com objetivo de analisar o atendimento odontológico a pacientes com obesidade na atenção primária à saúde, segundo dados do sistema de informação em saúde para a

atenção básica, no ano de 2019, dentre as regiões que compuseram o estudo, a região Nordeste que não era a região que concentrava o maior número de indivíduos obesos, apresentou maior prevalência de atendimento odontológico (56% dos municípios apresentaram um percentual maior ou igual a 19% das pessoas obesas com atendimento odontológico). Já as regiões Norte e Centro-Oeste, que possuíam a maior porcentagem de obesos do país, não apresentaram prevalência de maior percentual de atendimento odontológico (44,3% e 48,9% respectivamente, com percentual maior ou igual a 19% das pessoas), reforçando a necessidade de investimento em políticas de intervenção multiprofissional voltadas para o público obeso dentro da atenção primária visando um maior acesso aos serviços de saúde bucal nas regiões que mais necessitam de cuidado integral do obeso (64).

De acordo com a OMS, o diagnóstico da obesidade é dado pelo Índice de Massa Corporal (IMC), que é uma medida simples de ser realizada, conhecida em todo o mundo e de fácil aplicabilidade em estudos epidemiológicos. Esta é obtida pela relação entre peso corpóreo (Kg) e estatura (m^2) dos indivíduos, onde se considera como obesidade o IMC maior ou igual a 30 kg/m^2 . A classificação da obesidade é feita da seguinte forma: Grau I: IMC entre 30 e 34,9; Grau II: IMC entre 35 e 39,9 e Grau III: (obesidade mórbida): IMC acima de 40 (65).

A obesidade é uma doença heterogênea que envolve a interação de múltiplos fatores como: ambientais, biológicos e comportamentais. Porém as variações da prevalência da obesidade são influenciadas principalmente por meio dos fatores ambientais e comportamentais, aumento da ingestão de calorias e redução na prática de atividade física (66). Controlando este consumo de calorias e gasto energético existem dois sistemas no corpo humano. O primeiro é o homeostático que envolve os mecanismos biológicos que regulam os níveis de nutrientes no corpo, como a glicose, para manter um equilíbrio dinâmico. Já o segundo é o sistema hedônico, este envolve as motivações e prazeres associados à alimentação, influenciando as escolhas alimentares com base no sabor e na recompensa sensorial (67).

2.6 Fisiopatologia e comorbidades associadas à obesidade

Na obesidade, o indivíduo apresenta um estado crônico de inflamação sistêmica, uma vez que o aumento de adipócitos devido à deposição de gordura nestes indivíduos acarreta a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), interleucina-6 (IL-6), e também de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) e glicoproteína ácido alfa-1 (AGP), sendo também responsável por uma disfunção endotelial (68).

No indivíduo com obesidade, ocorre a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, seguido por uma mudança de seu fenótipo de anti-inflamatório M2 para pró-inflamatório M1 que então secretam citocinas inflamatórias e que podem induzir resistência à insulina e inflamação (69). Logo, a obesidade pode ser associada a efeitos adversos e a danos em muitos órgãos e sistemas, afetando parâmetros endócrinos, metabólicos, neuronais, cardiovasculares, pulmonares, gastrointestinais e musculoesqueléticos (70).

O excesso de tecido adiposo corporal leva ao estado de inflamação crônica e também ao estresse oxidativo que gera dano celular (8,71). As duas situações estão relacionadas ao desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade, dentre elas podemos citar: resistência à insulina, dislipidemia (72), esteatose hepática (73), problemas no intestino (8), doenças renais (74), hipertensão arterial, surgimento de diversos tipos de câncer, como o colorretal (9,59,75).

2.7 Modelos animais de indução de obesidade

Há muitas limitações éticas quanto ao desenvolvimento de estudos sobre obesidade, contudo estudos clínicos e populacionais têm sido desenvolvidos nos últimos anos (76,77). Estudos não clínicos em modelos animais podem ser uma excelente alternativa para elucidar mecanismos fisiopatológicos da doença, sobretudo no que diz respeito a pesquisas envolvendo órgãos e tecidos (78).

Alguns protocolos podem ser utilizados para indução da obesidade em ratos, em sua grande maioria baseados em dietas hipercalóricas ricas em açúcares simples, ácidos graxos trans e saturados, sódio e pobres em fibras,

semelhantes as dietas ocidentais (79). Existe também a dieta de cafeteria, em que os animais se alimentam de ração e de porções de alimentos ultraprocessados altamente palatáveis, como refrigerantes, doces, embutidos, etc. (78,80) e as hiperlipídicas (81) onde os animais recebem ração acrescidos de diversos ingredientes como bacon, leite condensado, creme de leite, biscoitos, colesterol sintético e sódio (82).

Existem variabilidades em relação à reprodutibilidade e viabilidade na aplicação destes protocolos, como mudanças nos horários e ingredientes da dieta, o que pode dificultar o processo de padronização e conseqüentemente, a reprodutibilidade experimental, principalmente quanto à eficácia dos protocolos utilizados para indução da obesidade e suas comorbidades (83).

Diversas comorbidades estão relacionadas ao excesso de peso, assim, a redução dos níveis de gordura corporal pode ser uma estratégia para a diminuição dos agravos à saúde. Vale ressaltar a importância de se fomentar discussões e pesquisas sobre estas comorbidades e sua relação direta com a obesidade para minimizar possíveis danos futuros para a população (65).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a influência da obesidade no desenvolvimento experimental da osteonecrose por bifosfonato, em modelo murino.

3.2 Objetivos Específicos

- Implantar o modelo conjunto de indução da obesidade e osteonecrose em ratos Wistar;
- Investigar os efeitos conjuntos da obesidade e osteonecrose em parâmetros murinométricos;
- Avaliar as alterações anatomopatológicas no modelo conjunto de osteonecrose e obesidade;
- Avaliar as alterações histológicas hepáticas e no tecido adiposo.
- Investigar a participação de citocinas pró e anti-inflamatórias na patogênese da osteonecrose e da obesidade conjuntas.

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

O experimento foi composto por 24 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade e peso aproximados de 30 dias e 180g. Estes foram divididos em 4 grupos de maneira simples e aleatória: saudável (1), osteonecrose (2), obeso (3) e obeso com osteonecrose (4) (n = 6 por grupo). Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de pesquisa em fármacos e medicamentos (IPeFarM) e Laboratório de nutrição experimental (LANEX) da Universidade Federal da Paraíba. O estudo está protocolado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o nº 8738120220 (ID 000661) (Anexos 01 e 02) e está de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 e do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Com base nos dados descritos na literatura (14,29,84–86), se esperava uma variabilidade da população (desvio padrão) de cerca de 30% e uma diferença entre os grupos experimentais de 50% (média) para o parâmetro experimental principal. Utilizando o teste de ANOVA (*one way*) seguido do pós-teste de Tukey para comparação de grupos com valores alfa (erro tipo I - 5%) e beta (erro tipo II - 80%), foram necessários 5 animais por grupo (n=5). Considerando uma taxa de mortalidade de 15% ou problemas procedimentais, um animal foi adicionado por grupo, totalizando 6 animais. Como o estudo consistia em quatro grupos, justificase o tamanho total da amostra de 24 animais.

4.2 INDUÇÃO DA OSTEONECROSE

4.2.1 Indução da osteonecrose para obtenção dos grupos 1 e 2

A indução da osteonecrose aconteceu por meio da administração do ácido zoledrônico, adaptando a metodologia de Bigueti et al., (2019) associada à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Os animais pertencentes ao grupo

saudável (1) receberam apenas soro fisiológico por via intraperitoneal. Já os animais do grupo osteonecrose (2) receberam ácido zoledrônico em solução injetável de 4mg/5mL (Blau Farmacêutica) via intraperitoneal, para cada 250 µg/Kg, uma vez por semana, durante oito semanas, conforme figura 06 (87).

No período entre a administração da quarta e quinta dose do medicamento, todos os animais foram submetidos à extração do primeiro molar inferior esquerdo (1ºMIE). Para que o procedimento fosse realizado, os animais foram sedados com uma associação de cetamina e xilazina por via intraperitoneal garantindo imobilização e anestesia entre trinta e quarenta e cinco minutos (88). Utilizou-se sonda exploradora número cinco para realização da luxação do dente e depois o mesmo foi removido delicadamente com o auxílio de uma pinça clínica.

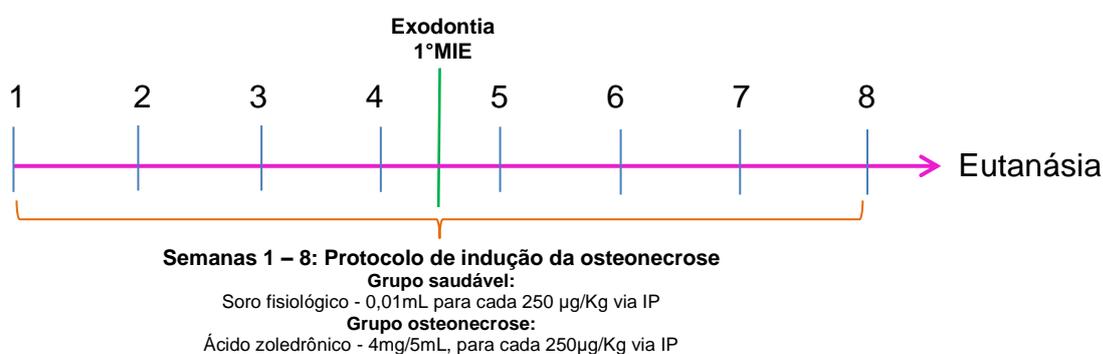


Figura 06 - Protocolo de indução da osteonecrose para obtenção dos grupos 1 e 2.

4.2.2 Indução da osteonecrose para obtenção dos grupos 3 e 4

A indução da osteonecrose nestes grupos aconteceu de forma semelhante a indução nos grupos 1 e 2 (através da administração do ácido zoledrônico, adaptando a metodologia de Bigueti et al. (2019) associada à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo) porém em período diferente pois os animais precisaram passar paralelamente pelo protocolo de indução de obesidade (apresentado no item 4.3) com duração de 16 semanas. A organização de como os protocolos foram realizados está apresentada na figura 07 (87).

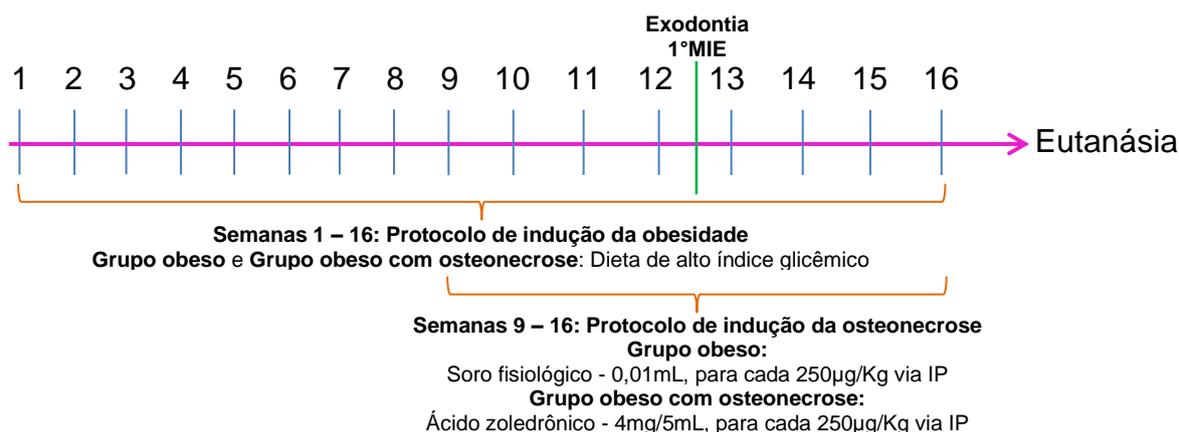


Figura 07 – Protocolo de indução da osteonecrose para obtenção dos grupos 3 e 4.

4.3 INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

4.3.1 Dieta

Os animais dos grupos 3 e 4 (obeso e obeso com osteonecrose) receberam uma dieta à base de ração tipo *pellets* (Nuvilab®), composta por: ração tipo *pellets* (Nuvilab®), açúcar refinado (Alegre®) e leite condensado integral (Camponesa®). Esta dieta foi caracterizada como sendo de alto índice glicêmico apresentando um valor de 77,6 e alta carga glicêmica com valores de 38,8 (89).

Para o preparo de 100 g da dieta de alto índice glicêmico, 45,2 g da ração foi triturada e misturada (Figura 08 - A) a 9,6 g de açúcar (Figura 08 - B) e adicionado 45,2 mL de leite condensado (Figura 08 - C e D). Esta mistura era homogeneizada, moldada e em seguida seca em estufa (55 °C) por 24 h (Figura 08 - E). Após esse período a ração produzida era armazenada sob refrigeração. Ficaram disponíveis para os animais 800g por semana na forma de *pellets* (Figura 08 - F) durante 16 semanas (Adaptado de LUZ et al., 2018) (90) .

4.3.2 Evolução ponderal

A massa corporal (g) dos ratos foi verificada uma vez por semana e o ganho de massa foi calculado pela diferença entre massa corpórea final e a inicial.

4.3.3 Ingestão alimentar

O consumo alimentar foi verificado uma vez por semana, sempre no mesmo dia e foi representado pela diferença entre o alimento oferecido e o residual (consumo (g) = quota oferecida (g) – rejeito limpo (g)). O rejeito limpo equivale ao alimento que não foi ingerido e permaneceu na caixa (91).



Figura 08 - Preparo da ração para indução da obesidade. A – Ração triturada e peneirada; B – Açúcar refinado e peneirado; C – Leite condensado utilizado para o preparo da ração; D – Informações nutricionais do leite condensado; E – Ração moldada na estufa para realização da etapa de secagem; F – Ração após secagem pronta para consumo.

4.3.4 Comprimento nasoanal, índice de Lee e índice de massa corporal

No dia da eutanásia, os animais foram pesados e medidos quanto ao comprimento nasoanal (cm) (Figura 09) que foi utilizado para o cálculo do índice

de Lee, que compreende a razão entre a raiz cúbica da massa corporal e o comprimento nasoanal do animal (92) e o índice de massa corporal (IMC) caracterizado pela razão entre o peso e o comprimento nasoanal do animal elevado ao quadrado (93).

4.3.5 Circunferências abdominal e torácica

No dia da eutanásia, a circunferência abdominal (Figura 10 – A), localizada na parte anterior a pata traseira do animal, e a circunferência torácica (Figura 10 – B), localizada na porção posterior a pata dianteira, foram aferidas utilizando uma fita corporal antropométrica (93).



Figura 09 – Protocolo da medição do comprimento nasoanal.



Figura 10 – Protocolo de medição das circunferências abdominal (A) e torácica (B).

4.3.6 Massa dos depósitos de tecido adiposo

O tecido adiposo das regiões: inguinal, retroperitoneal e epididimal foram pesados, os quais são considerados os principais componentes de adiposidade central em ratos (94). A gordura epididimal (Figura 11 – A) compreende o depósito localizado na porção inferior do abdome conectado ao epidídimo. A gordura inguinal (Figura 11 – B) se localiza entre a porção inferior da caixa

torácica e a porção medial da coxa. Já a gordura conectada à parede abdominal posterior, representa a gordura retroperitoneal (Figura 11 – C) (95,96).

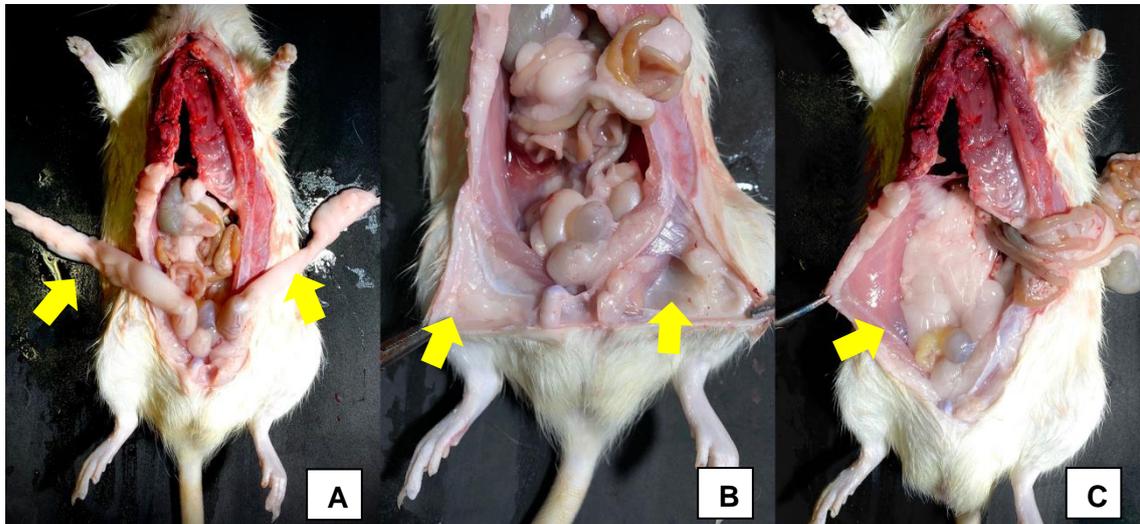


Figura 11 – Regiões de retirada de tecido adiposo. A – Tecido adiposo epididimal; B – Tecido adiposo inguinal; C – Tecido adiposo retroperitoneal.

4.3.7 Índice de adiposidade

O índice de adiposidade foi calculado a partir da soma das massas individuais das camadas adiposas epididimal, inguinal e retroperitoneal, multiplicada por cem e dividida pelo peso corporal final (97,98). Entretanto, a retroperitoneal foi utilizada como representativa. Resultados de estudos mostram que com oito semanas de dieta rica em carboidratos refinados, os ratos já apresentaram um tecido adiposo retroperitoneal hipertrófico (99).

4.3.8 Peso do fígado

Após a eutanásia o fígado foi dissecado e pesado para visualização de possíveis alterações macroscópicas e para posterior análise microscópica (100,101).

4.4 EXAME FÍSICO DA CAVIDADE ORAL

O exame físico foi realizado em sala com iluminação apropriada, por meio de observação direta. Os tecidos moles foram afastados com o auxílio de pinça e

foi feito o registro fotográfico. Cada animal foi avaliado quanto à presença ou não de exposição óssea, fístula intra e/ou extraoral.

4.5 EUTANÁSIA

Ao término dos protocolos os animais foram eutanasiados segundo as orientações que constam na Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Para isso, foi utilizado o mesmo protocolo anestésico da exodontia seguindo a eutanásia por meio do método do deslocamento cervical. Em seguida, o exame clínico (físico) e registro fotográfico de cada animal foram realizados por um único operador, feitos um animal por vez.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a eutanásia e exame físico, cada espécime – nesse momento composta pela mandíbula, tecido adiposo e fígado foi fixado em formol (10%). Após as 48 horas de fixação, as mandíbulas foram descalcificadas em solução de ácido nítrico 5%. Após a desmineralização o material passou por clivagem, junto com os demais espécimes (órgãos e gorduras) e seguiram para a etapa de processamento, passando por desidratação em banhos de soluções com concentrações ascendentes de álcool etílico, clarificadas em xilol, impregnadas em banhos de parafina a uma temperatura máxima de 60°C e incluídas em parafina em moldes para inclusão. Após a etapa de inclusão o material passou pela etapa da microtomia. Foram realizados cortes de espessura 4 µm (micrômetros). As amostras foram coradas com HE – hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson e foi realizada a imuno-histoquímica para colágeno I, TGF-β e TNF-alfa.

4.7 ANÁLISES HISTOLÓGICAS EM MICROSCOPIA DE LUZ E HISTOMORFOMÉTRICA

As mandíbulas coradas em HE – hematoxilina-eosina foram observadas e analisadas em microscópio de luz, avaliadas e fotografadas com o software microscópio Nikon – Modelo Eclipse Ci-L (Tóquio, Japão). Foram avaliadas qualitativamente quanto à presença ou não de necrose óssea, infecção, e

adiposidade da medula óssea. Histologicamente, a osteonecrose é definida pela presença de 5 ou mais osteoclastos vazios adjacentes (84,102) ou como 10 ou mais osteoclastos vazios (85,103).

Para o cálculo da área de necrose óssea, os cortes histológicos foram analisados com objetiva de 40X e quantificados com software Image-Pro Plus de forma interativa. Todo o interstício foi excluído da análise utilizando ferramentas do programa e criado uma imagem binária com cálculo da área em μm^2 . O tecido adiposo (corado em hematoxilina-eosina) foi analisado em relação ao tamanho dos adipócitos e presença de vascularização. A medição do tamanho dos adipócitos foi feita de forma interativa a partir de ferramentas de medição de área do software Image-Pro Plus, semelhante ao processo de obtenção das áreas de necrose. Além disso, também foi feita a análise do parênquima hepático (corado em hematoxilina-eosina) quanto a sua preservação e presença de esteatose.

4.8 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICA E HISTOMORFOMÉTRICA

As amostras submetidas à reação imuno-histoquímica foram reativadas com solução Recovery (citrato – pH6,0) em panela pressurizada. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por um período de 30 minutos. Após esta etapa, foi realizado o bloqueio de proteínas específicas e os cortes histológicos foram preenchidos com os anticorpos primários: Anti - TNF-alfa (Cloud-Clone Corp/PAA133Hu01/Polyclonal Antibody; 1:100), Anti - TGF- β (Cloud-Clone Corp/PAA124Ra01/Polyclonal Antibody; 1:100) e Anti - Colágeno I (Boster/PA2140-2; 1:100). Em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100 (DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675). A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% e contra-corada em hematoxilina de Harris. Para o cálculo da área de deposição da matriz extracelular além das áreas de positividade para todas as reações imuno-histoquímicas foram selecionados todos os pixels com tons de azul (trícromico de Masson) ou marrom (marcação imuno-histoquímica positiva) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μm^2 , analisados com a objetiva de 40X e quantificados com software Image-Pro Plus de forma

interativa. Para a análise, vinte campos foram selecionados aleatoriamente ao longo de cada amostra representativa por grupo.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados inicialmente utilizando-se da estatística descritiva dos dados, sendo calculados os valores máximos e mínimos, amplitude, média e desvio padrão. Foi realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk e em seguida foram analisados estatisticamente empregando-se análise de variância (ANOVA) “*one-way*” seguido do pós-teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.04.

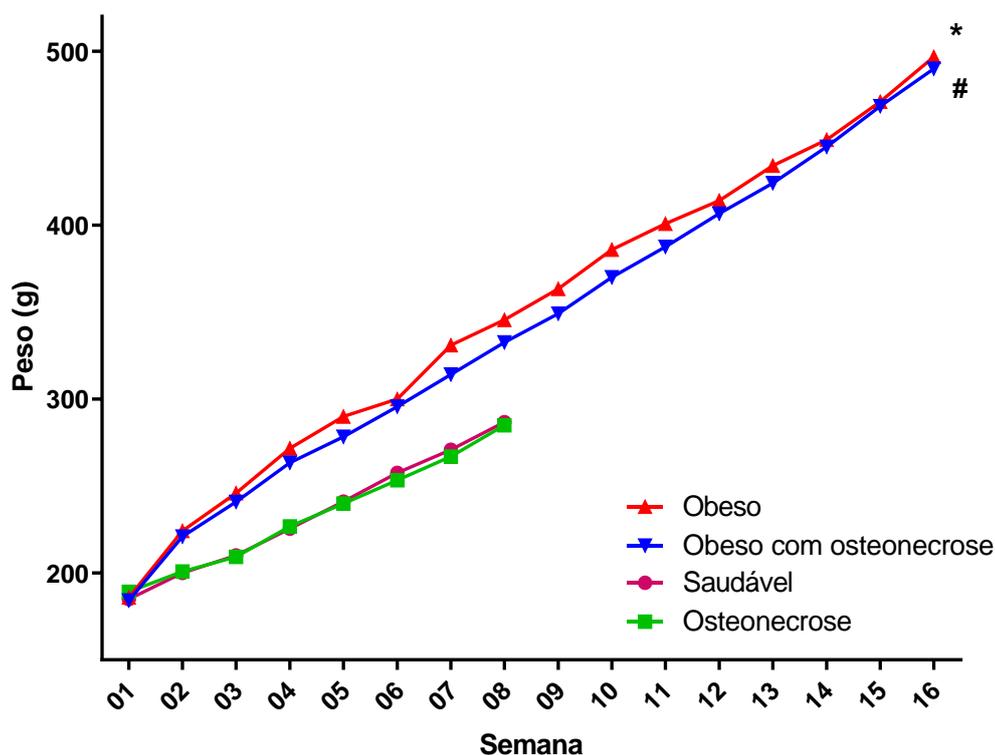
5. RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

5.1.1 Evolução ponderal

A evolução ponderal foi maior nos grupos obesos após 16 semanas de consumo da dieta de alto índice glicêmico (Gráfico 01), sendo observado o aumento do peso desde a primeira pesagem após o início da dieta. O grupo obeso apresentou média e desvio padrão de 350.6 ± 92.19 g, o grupo obeso com osteonecrose 341.9 ± 91.43 g. Já o grupo saudável obteve média e desvio padrão de 234.6 ± 35.73 g e o grupo com osteonecrose obteve 233.9 ± 35.55 g.

Gráfico 01 – Massa corporal média semanal dos animais de cada grupo do estudo.



Os símbolos e as linhas verticais representam a média (n=6). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs.

osteonecrose), # $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável e obeso com osteonecrose vs. osteonecrose).

5.1.2 Comprimento nasoanal, índice de Lee e índice de massa corporal

Podemos observar que os animais do grupo obeso apresentaram um maior comprimento nasoanal (27.17 ± 1.16 cm), quando comparados aos demais grupos que obtiveram medidas semelhantes, sendo os grupos saudável e osteonecrose com medias de medidas iguais (25.33 ± 0.51 cm) (Figura 12).

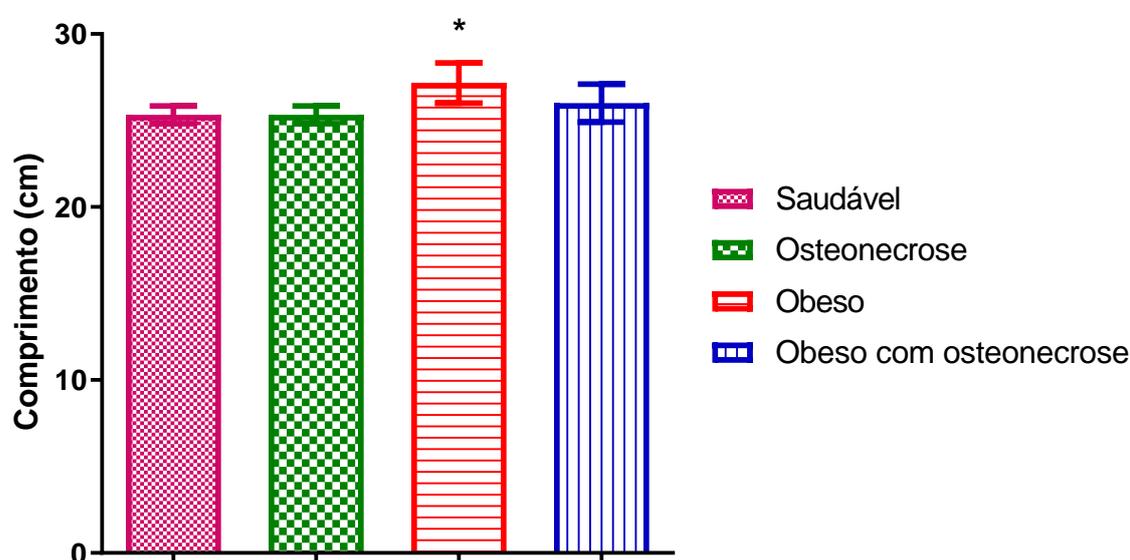


Figura 12 - Comprimento nasoanal dos animais em cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 6). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose).

Houve alteração no índice de Lee, quando feita a comparação entre os grupos saudável (0.26 ± 0.01 g/cm) e osteonecrose (0.25 ± 0.00 g/cm), com os grupos obeso e obeso com osteonecrose (0.31 ± 0.00 g/cm), sendo esses últimos com índice de maior valor (Figura 13).

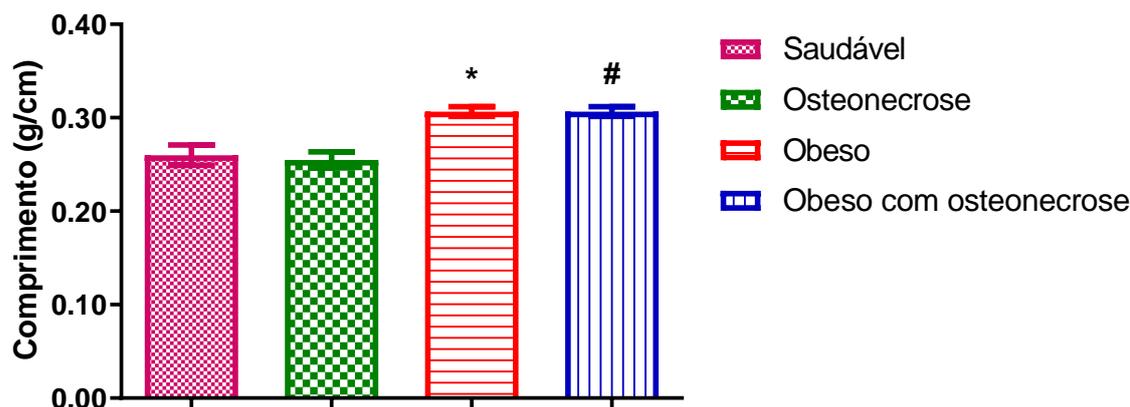


Figura 13 – Médias do índice de Lee dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 6). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose), # $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável e obeso com osteonecrose vs. osteonecrose).

No que se refere ao índice de massa corpórea as médias dos grupos obeso ($0.68 \pm 0.04 \text{ g/cm}^2$) e obeso com osteonecrose ($0,69 \pm 0.04 \text{ g/cm}^2$) foram maiores que a média dos grupos saudável e osteonecrose ($0,44 \pm 0.01 \text{ g/cm}^2$) (Figura 14).

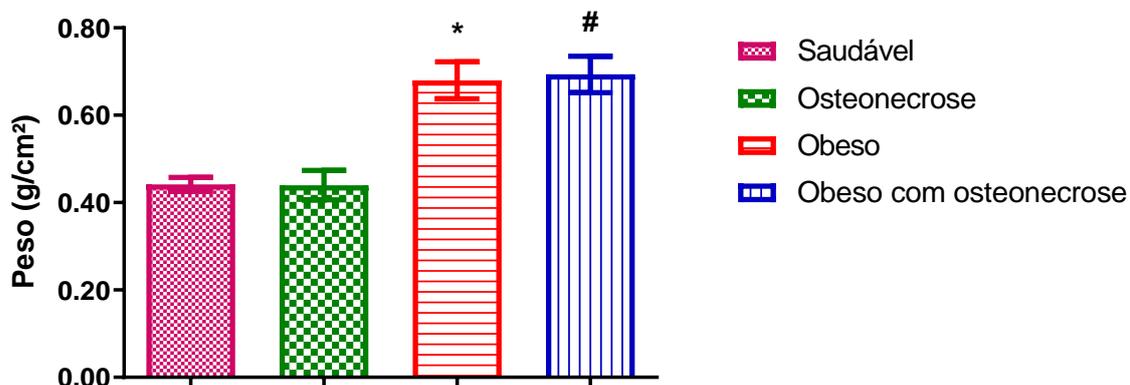


Figura 14 – Médias dos índices de massa corpórea dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 6). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose), # $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável e obeso com osteonecrose vs. osteonecrose).

5.1.3 Circunferências abdominal e torácica

Os animais que apresentaram maior aumento na circunferência abdominal foram do grupo obeso (20.5 ± 0.21 cm), seguido do grupo obeso com osteonecrose (19.1 ± 0.14 cm), osteonecrose (18.4 ± 0.44 cm) e saudável (18.5 ± 0.38 cm) (Figura 15). Com relação a circunferência torácica, o grupo obeso também obteve uma média maior em relação aos demais (18.0 ± 1.28 cm), sendo seguido pelos grupos saudável (16.6 ± 0.51 cm), osteonecrose (16.5 ± 0.54 cm) e obeso com osteonecrose (15.9 ± 0.86 cm) (Figura 16).

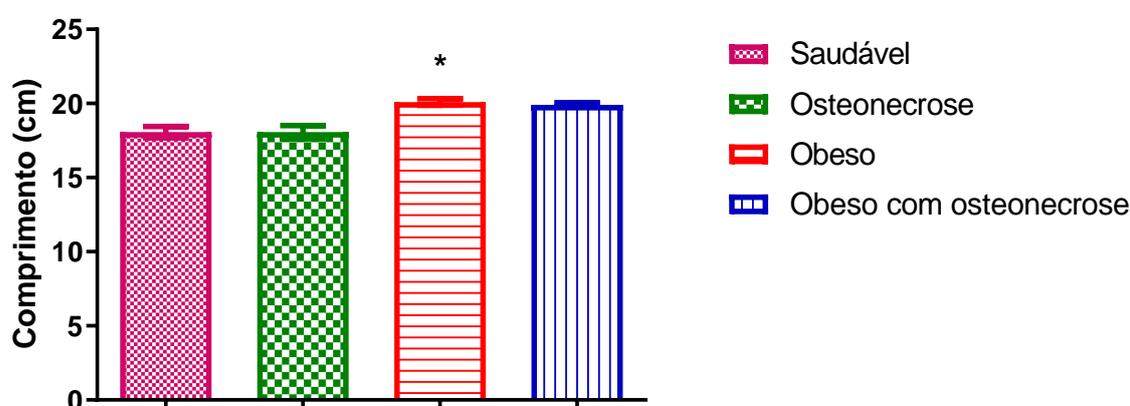


Figura 15 – Médias das circunferências abdominal dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média ($n = 6$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose).

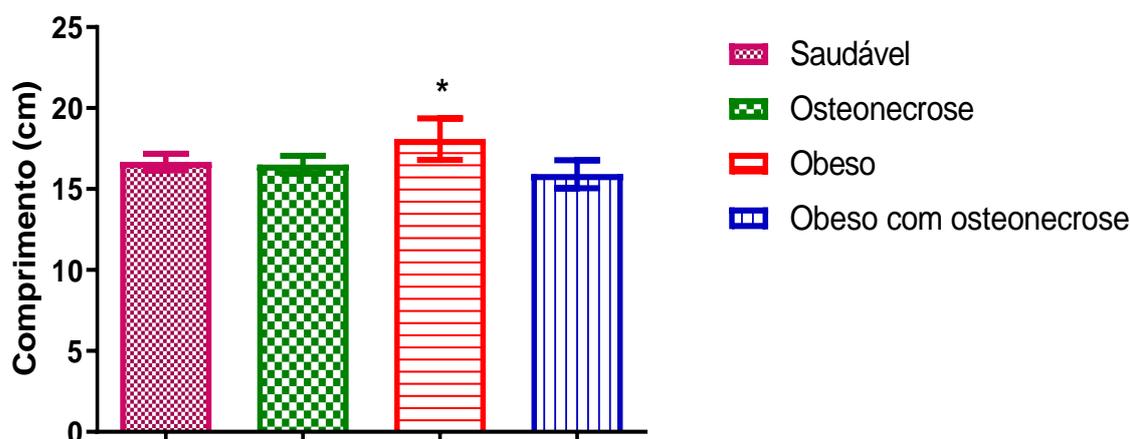


Figura 16 – Médias das circunferências torácicas dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média ($n = 6$). ANOVA

one-way seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose).

5.1.4 Índice de adiposidade

O índice de adiposidade dos animais que receberam a dieta de alto índice glicêmico, tanto do grupo obeso (10.0 ± 1.03 g) quanto do grupo obeso com osteonecrose (10.4 ± 0.86 g) apresentou-se maior quando comparado ao índice dos grupos saudável (6.4 ± 1.00 g) e osteonecrose (5.8 ± 0.68 g) (Figura 17).

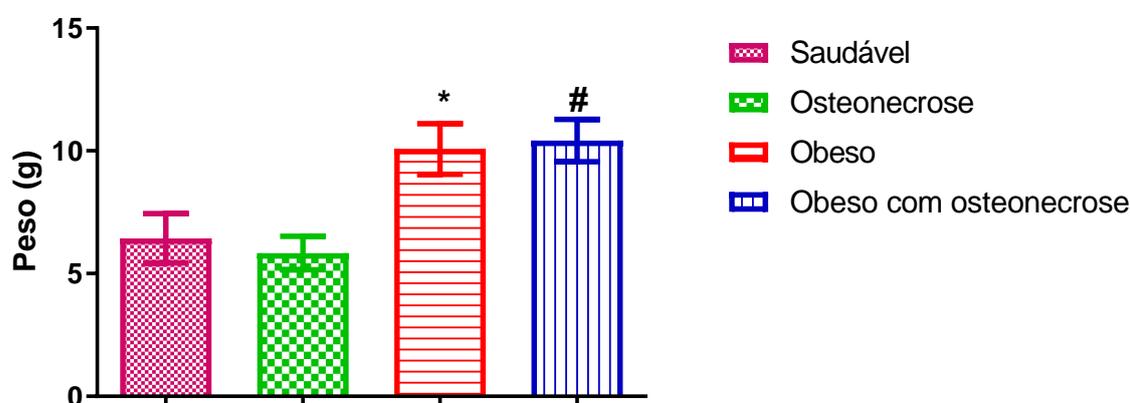


Figura 17 – Médias dos índices de adiposidade dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média ($n = 6$). ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose), # $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável e obeso com osteonecrose vs. osteonecrose).

5.1.5 Peso do fígado

O fígado dos animais que receberam a dieta de alto índice glicêmico, tanto do grupo obeso (12.9 ± 1.04 g) quanto do grupo obeso com osteonecrose (12.5 ± 1.38 g) apresentou maior média de peso quando comparado às médias obtidas nos grupos saudável (10.6 ± 0.44 g) e osteonecrose (10.6 ± 0.81 g) (Figura 18).

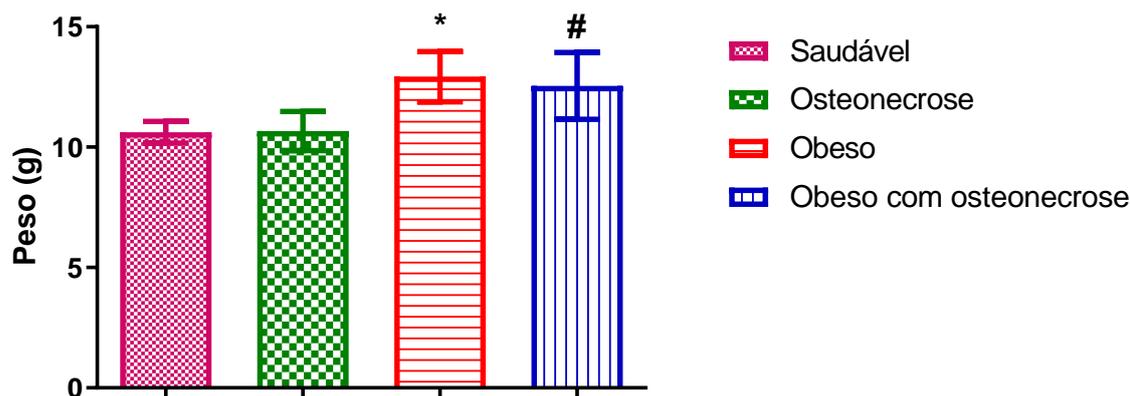


Figura 18 – Médias do peso dos fígados dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 6). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose), # $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável e obeso com osteonecrose vs. osteonecrose).

5.2 ANÁLISE ANATOMO-PATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Na análise macroscópica da mandíbula (Figura 19), observou-se que os animais do grupo controle saudável (A), apresentaram, após exodontia a presença de tecido claro, liso e homogêneo sobre a superfície da região de exodontia, compatível com gengiva saudável (revestimento epitelial) (seta amarela). No entanto, os animais do grupo osteonecrose (B), obeso (C) e obeso com osteonecrose (D) apresentaram ausência de revestimento epitelial na região de extração dentária, evidenciada com uma área macroscopicamente amarelada compatível com osso exposto (seta azul).

Microscopicamente, observa-se (Figura 19) no grupo saudável (E), presença de tecido ósseo com osteócitos nucleados sem alterações morfológicas, compatíveis com a normalidade. No entanto, no grupo osteonecrose (F), observa-se osteócitos anucleados dispostos em grupos de cinco ou mais, compatível com osteonecrose (cabeça de seta preta). Nos animais dos grupos obeso (G) ou obeso com osteonecrose (H), além dos osteócitos anucleados dispostos em grupos de cinco ou mais (cabeça de seta preta), observa-se a presença de sequestro ósseo (*).

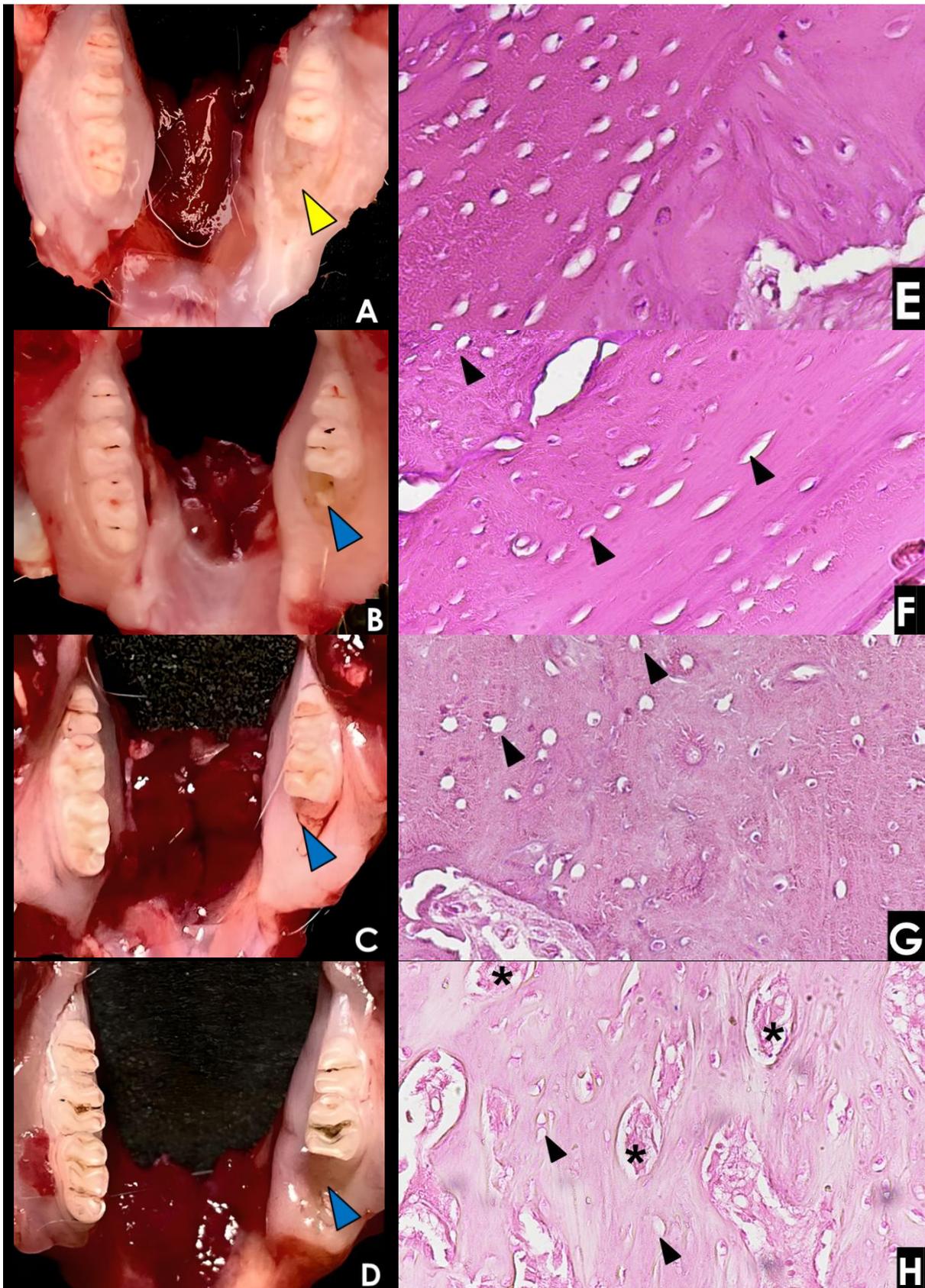


FIGURA 19 - Macroscopia e microscopia representativa das mandíbulas dissecadas dos animais por grupo. A, E. Saudável. B, F. Osteonecrose. C, G.

Obeso. D, H. Obeso com osteonecrose. Seta amarela, região com tecido gengival revestindo a região alveolar. Seta azul, região de osso exposto. Cabeça da seta preta, osteonecrose. * sequestro ósseo. Magnificação: 400x.

Com base nos resultados obtidos através da análise morfométrica da área de necrose, esta foi maior nos grupos obeso com osteonecrose ($290.33 \pm 15.77 \mu\text{m}^2$), osteonecrose ($172.83 \pm 18.19 \mu\text{m}^2$) e obesos ($97.00 \pm 2.12 \mu\text{m}^2$), quando comparadas a área de necrose dos animais do grupo saudável ($5.00 \pm 3.21 \mu\text{m}^2$) (Figura 20).

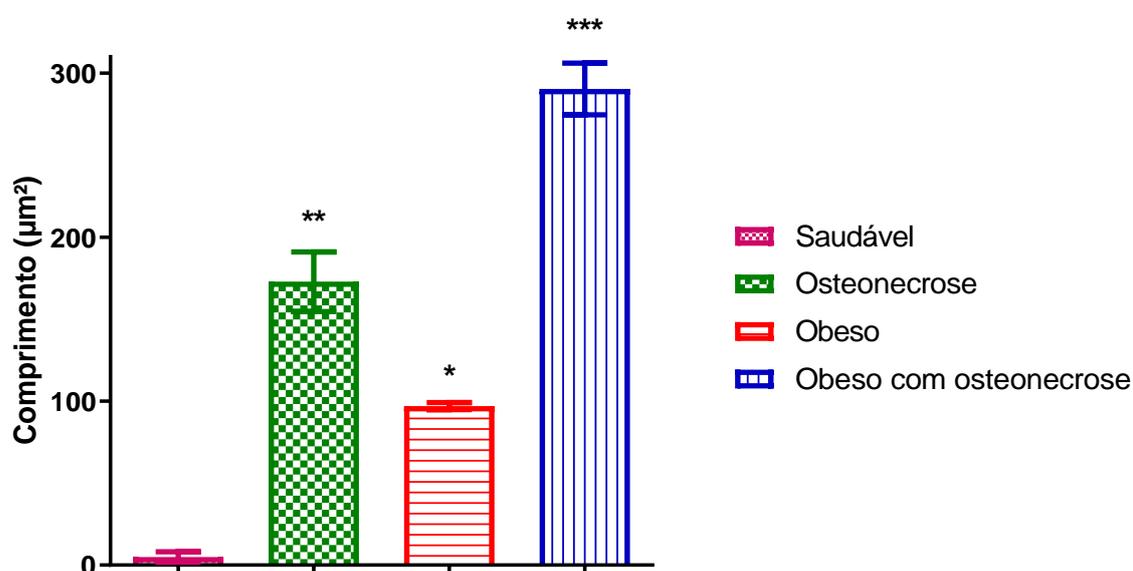


Figura 20 – Médias das áreas de necrose dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 6). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável), ** $p < 0,05$ (osteonecrose vs. saudável) e * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável).

A avaliação microscópica do tecido adiposo (Figura 21) evidenciou que nos animais dos grupos saudável (A) e osteonecrose (B) os adipócitos encontravam-se com ausência de processos inflamatórios. Já nos animais dos grupos obeso (C) e obeso com osteonecrose (D), observou-se adipócitos amplos e exclusivamente no grupo obeso com osteonecrose a presença de grandes vasos dilatados, caracterizando estase sanguínea no tecido adiposo indicado pelo (*).

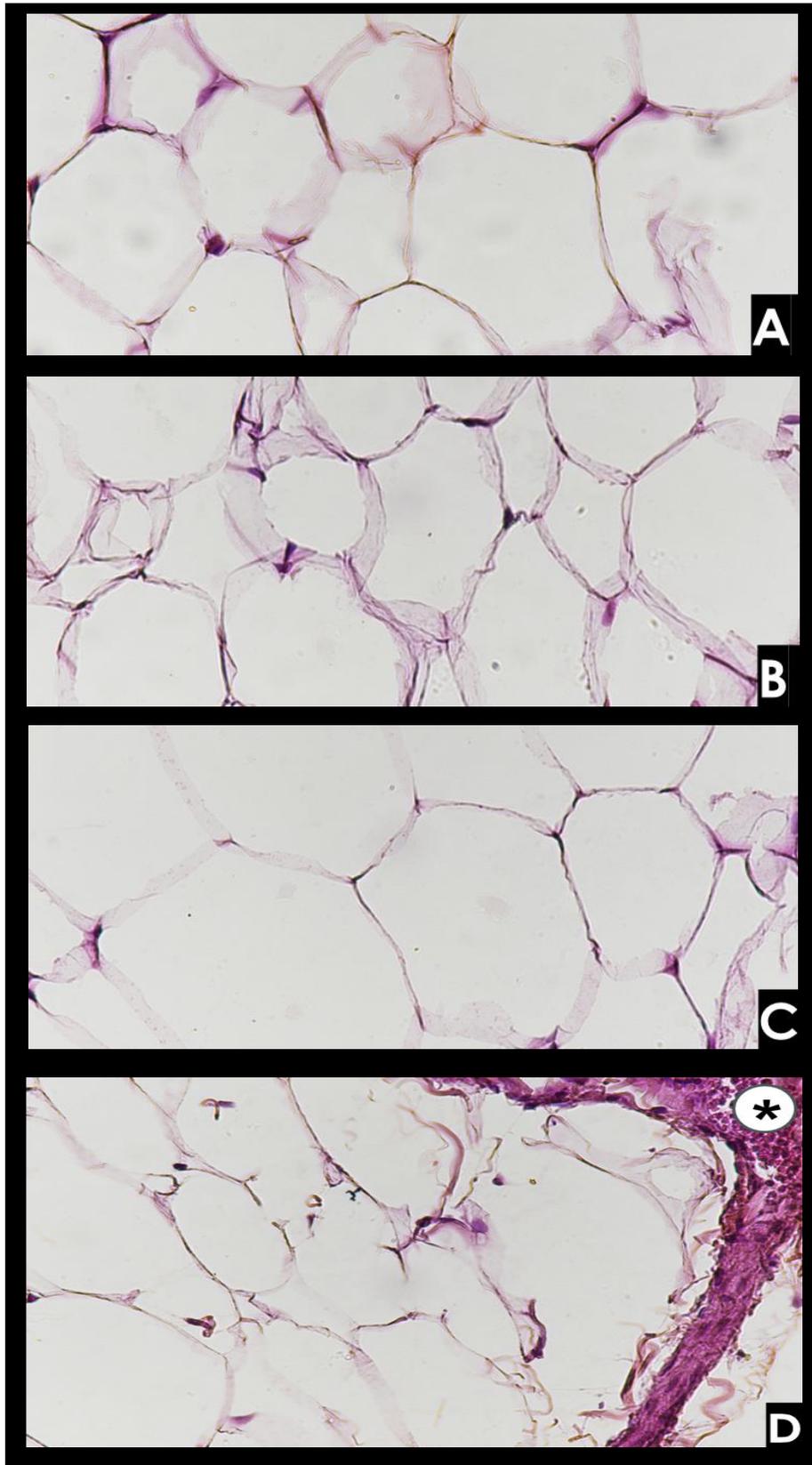


Figura 21 - Microscopia representativa do tecido adiposo dos animais nas diversas condições experimentais. A. Saudável, B. Osteonecrose, C. Obeso, D. Obeso com osteonecrose. *estase sanguínea. Magnificação: 400x.

Em relação à avaliação microscópica do fígado (Figura 22) foi evidenciado nos animais dos grupos saudável (A) e osteonecrose (B) preservação total do seu parênquima. Já nos animais dos grupos obeso (C) e obeso com osteonecrose (D), observou-se o parênquima hepático desses grupos com áreas de esteatose (cabeça da seta).

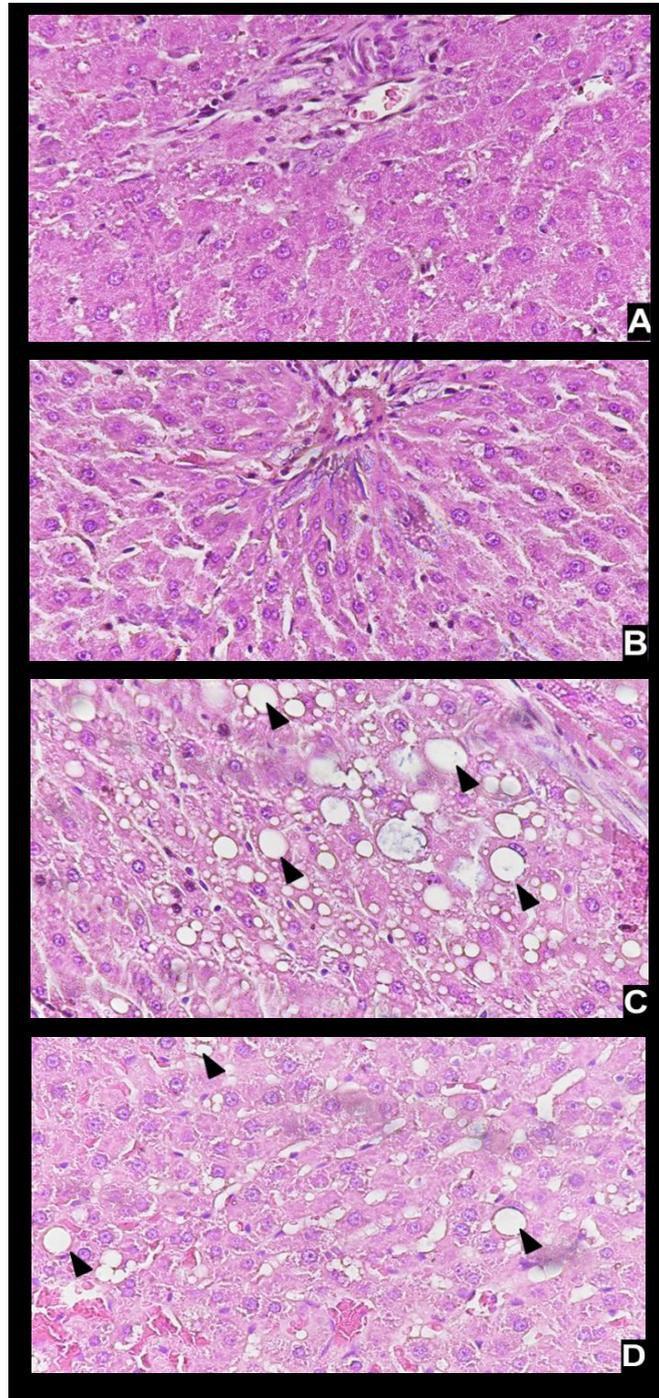


Figura 22 - Microscopia representativa do parênquima hepático dos animais nas diversas condições experimentais. A. Saudável, B. Osteonecrose, C. Obeso, D.

Obeso com osteonecrose. Cabeça da seta preta, esteatose hepática. Magnificação: 400x.

Na análise morfométrica do tecido adiposo, a média do tamanho dos adipócitos foi maior nos grupos obeso com osteonecrose ($98.41 \pm 1.56 \mu\text{m}^2$) e obeso ($97.75 \pm 1.91 \mu\text{m}^2$), quando comparada a média do tamanho dos adipócitos dos grupos saudável ($28.91 \pm 5.60 \mu\text{m}^2$) e osteonecrose ($28.75 \pm 4.09 \mu\text{m}^2$) (Figura 23).

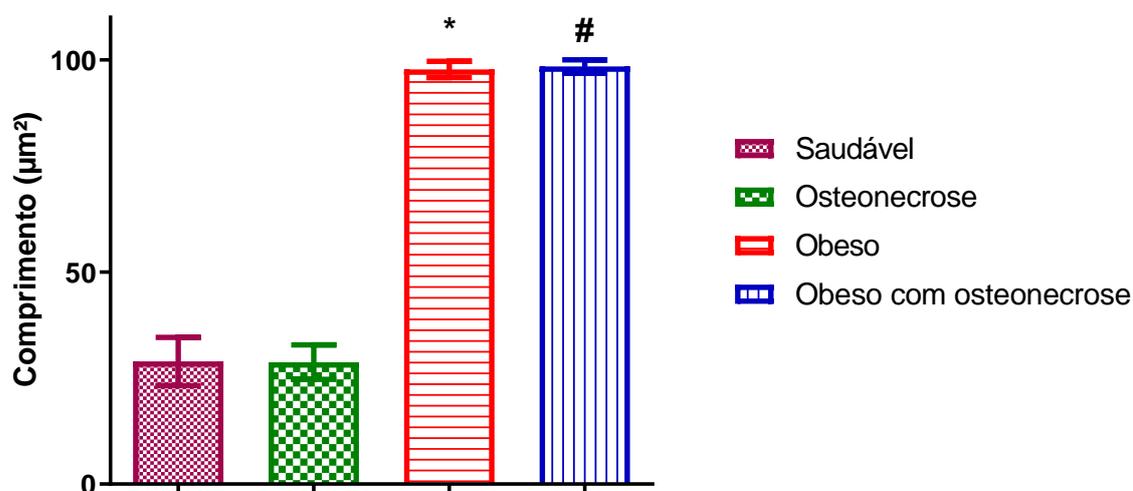


Figura 23 – Médias do tamanho dos adipócitos dos animais de cada grupo do estudo. Os símbolos e as barras verticais representam a média ($n = 6$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose), # $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável e obeso com osteonecrose vs. osteonecrose).

Na figura 24 identificamos corte histológico de mandíbula corado em Tricrômico de Masson, representativos das condições experimentais avaliadas. Nos animais do grupo saudável (A) ou obesos (C), é observado intensa deposição de matriz extracelular além da formação de novos vasos sanguíneos (seta) no local da extração dentária, caracterizando a formação do tecido de granulação (*). No entanto, nas demais condições experimentais, osteonecrose (B) e obeso com osteonecrose (D) observa-se redução da formação deste tecido de granulação. Esses resultados são confirmados através da análise morfométrica, onde a média

das áreas marcadas com o Tricrômico de Masson foi maior nos animais do grupo saudável ($54.66 \pm 16.31 \mu\text{m}^2$) e do grupo obeso ($50.93 \pm 14.19 \mu\text{m}^2$) seguida dos grupos obeso com osteonecrose ($5.81 \pm 2.40 \mu\text{m}^2$) e obeso ($4.12 \pm 2.43 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,0001$) (Figura 25).

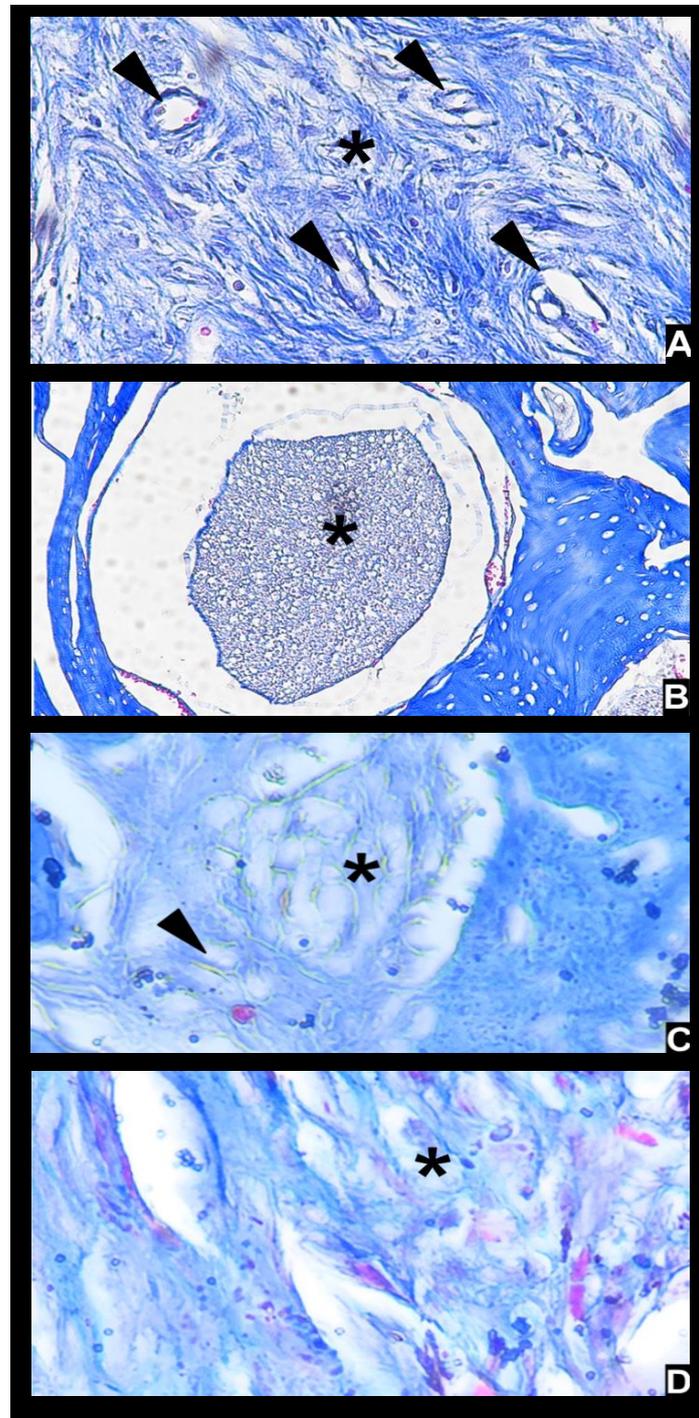


Figura 24 - Corte histológico de mandíbula corada em Tricrômico de Masson, a cor azul indica presença de tecido de granulação. (A) saudável, (B) osteonecrose,

(C) obeso e (D) obeso com osteonecrose. Magnificação: 400x; seta (tecido de granulação). * (osteonecrose).

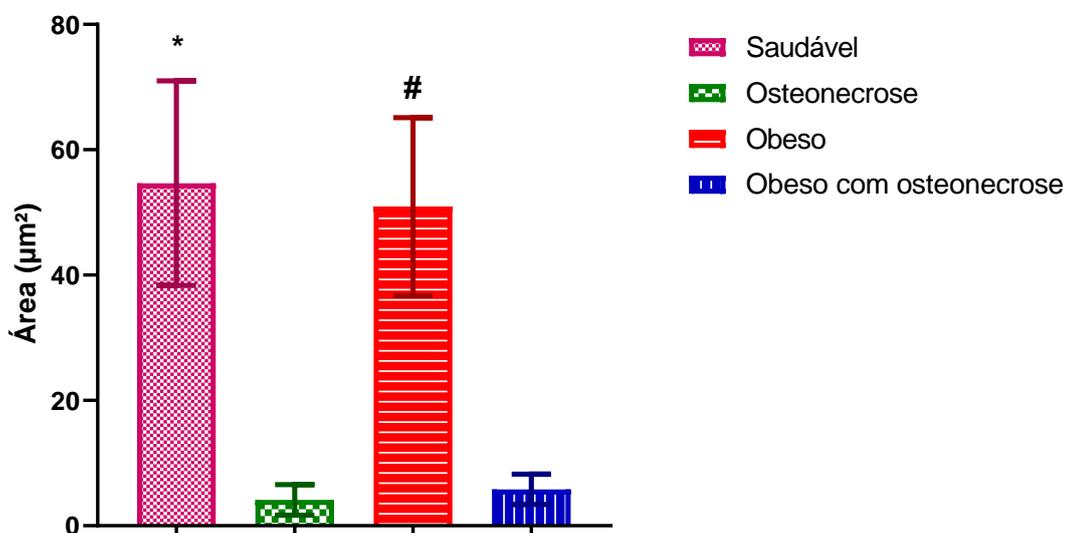


Figura 25 - Médias das áreas da matriz extracelular marcada com Tricrômico de Masson. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 20). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (saudável vs. osteonecrose e saudável vs. obeso com osteonecrose), # $p < 0,05$ (obeso vs. obeso com osteonecrose).

5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA

5.3.1 Avaliação Imuno-histoquímica e histomorfométrica da presença do TNF-alfa

Na figura 26 identificamos um corte histológico de mandíbula em reação imuno-histoquímica contra o TNF-alfa, contracolorados com hematoxilina, representativo das condições experimentais avaliadas. Nos animais do grupo saudável (A), é observado marcação discreta e focal nos osteócitos (seta). No entanto, nas demais condições experimentais, osteonecrose (B), obeso (C) e obeso com osteonecrose (D) observa-se marcação intensa e multifocal (seta) nos osteócitos que se encontram alargados e de aspecto morfológico irregular, além da matriz mineral que também se encontra marcada. Esses resultados são confirmados por meio da análise morfométrica (Figura 27), onde a média das

áreas marcadas em marrom (positividade da reação) foi maior nos animais do grupo obeso com osteonecrose ($27.59 \pm 7.65 \mu\text{m}^2$) e do grupo obeso ($25.52 \pm 8.31 \mu\text{m}^2$) seguida dos grupos osteonecrose ($17.38 \pm 5.69 \mu\text{m}^2$) e saudável ($4.34 \pm 2.51 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,0001$).

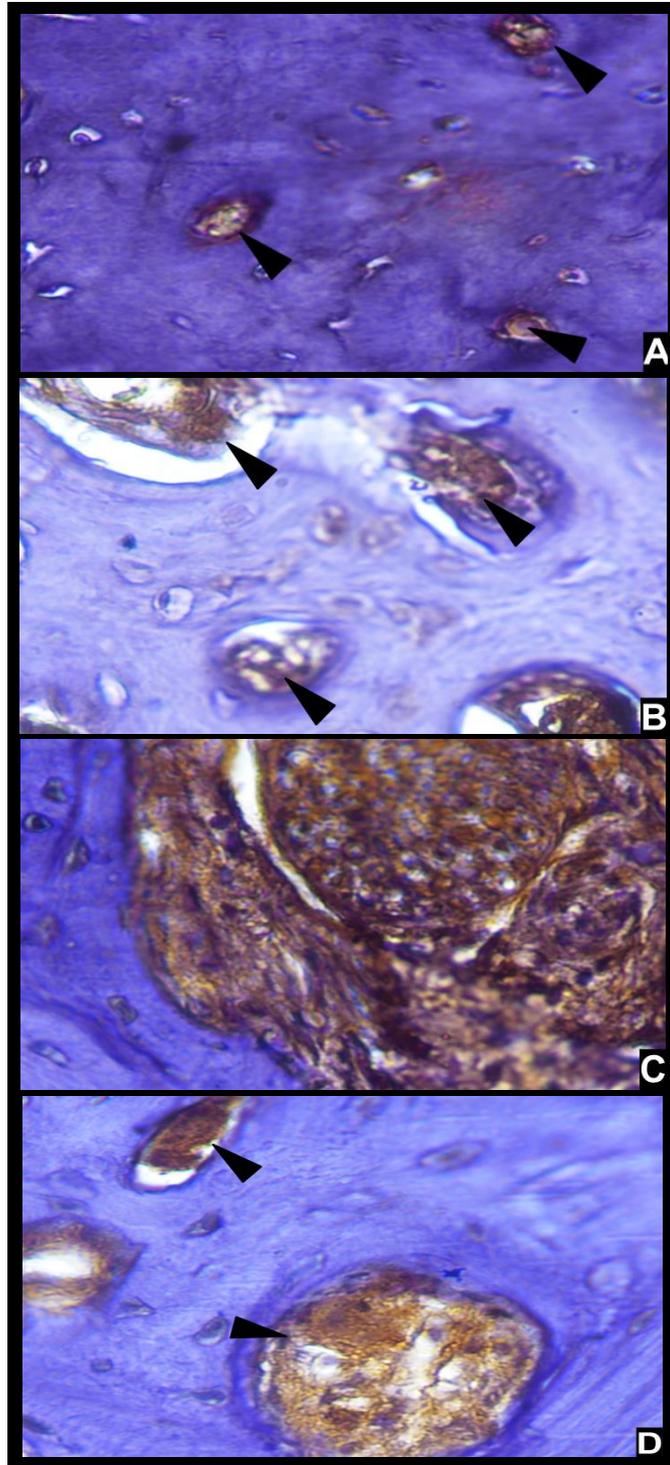


Figura 26 - Corte histológico de mandíbula em reação imuno-histoquímica contra TNF-alfa. (A) Saudável, (B) Osteonecrose, (C) Obeso e (D) Obeso com

osteonecrose. Magnificação: 400x; seta (positividade da reação imuno-histoquímica).

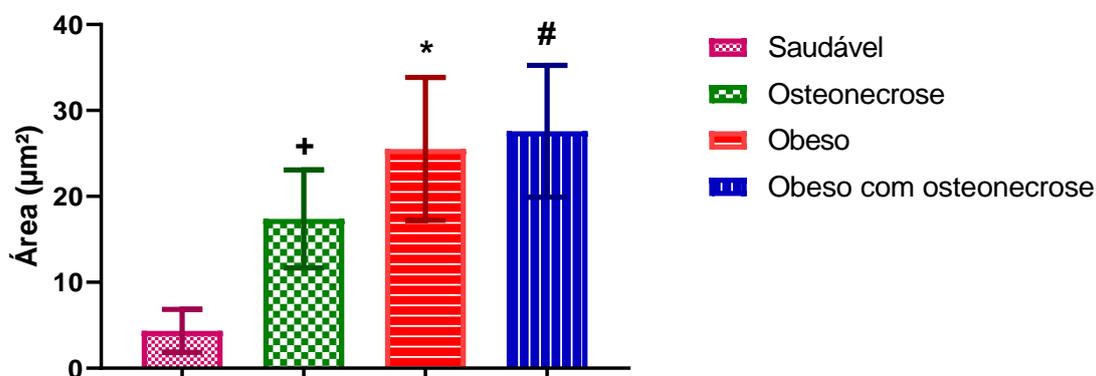


Figura 27 - Médias das áreas para TNF-alfa. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 20). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. #p<0,05 (obeso com osteonecrose vs. osteonecrose e obeso com osteonecrose vs. saudável), *p<0,05 (obeso vs. saudável e obeso vs. osteonecrose), +p<0,05 (osteonecrose vs. saudável).

5.3.2 Avaliação Imuno-histoquímica e histomorfométrica da presença do TGF-β

Na figura 28 identificamos um corte histológico de mandíbula em reação imuno-histoquímica contra o TGF-β, contrainformados com hematoxilina, representativo das condições experimentais avaliadas. Nos animais do grupo saudável (A) e osteonecrose (B) é observado marcação discreta e focal nos osteócitos (seta). No entanto, nas demais condições experimentais, obeso (C), e obeso com osteonecrose (D) observa-se marcação intensa e multifocal (seta). Em especial no grupo D, observa-se ainda osteócitos alargados e de aspecto morfológico irregular. Esses resultados são confirmados através da análise morfométrica (Figura 29), onde a média das áreas marcadas em marrom (positividade da reação) foi maior nos animais do grupo obeso com osteonecrose ($44.98 \pm 3.93 \mu\text{m}^2$) e do grupo osteonecrose ($25.09 \pm 4.65 \mu\text{m}^2$) seguida dos grupos obeso ($19.57 \pm 4.37 \mu\text{m}^2$) e saudável ($4.27 \pm 0.64 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,0001$).

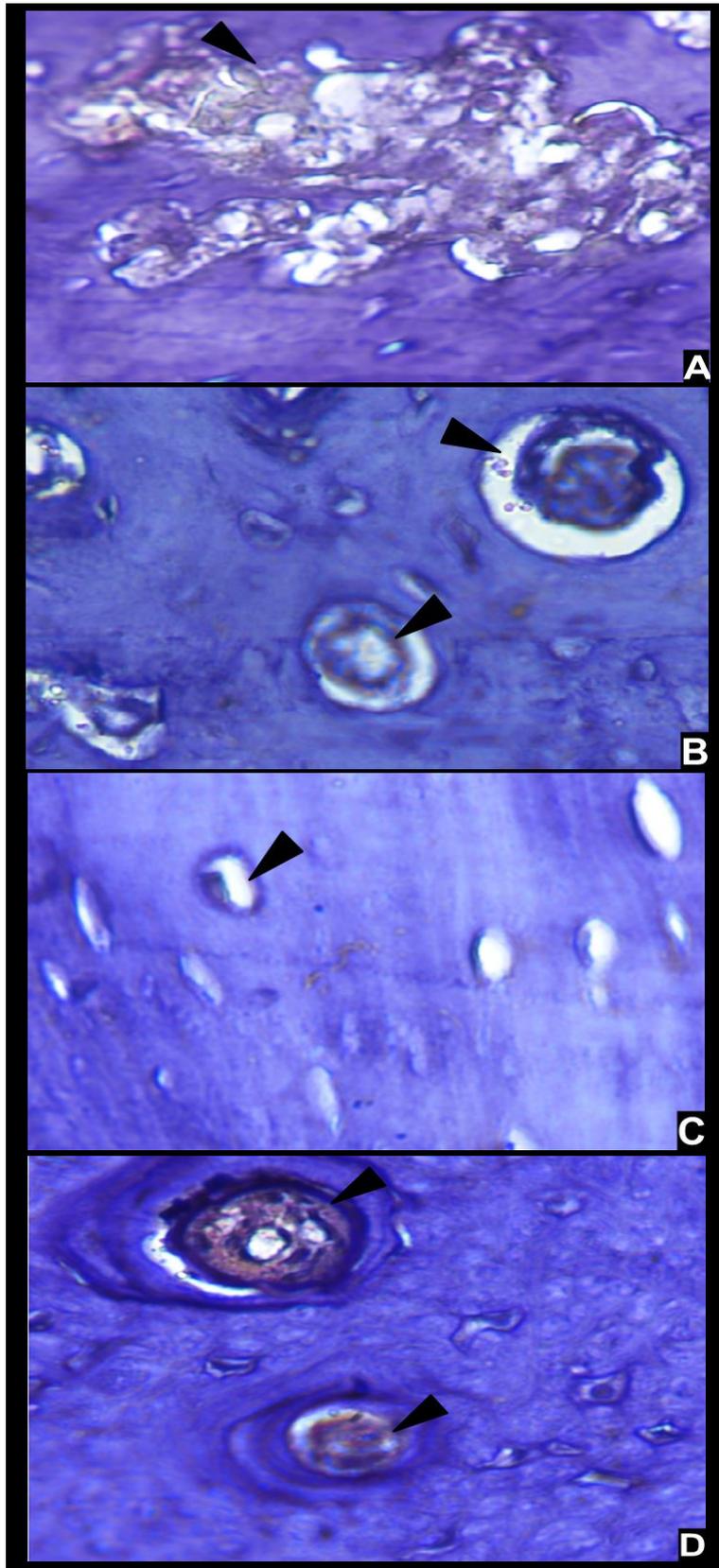


Figura 28 - Corte histológico de mandíbula em reação imuno-histoquímica contra TGF- β . (A) saudável, (B) osteonecrose, (C) obeso e (D) obeso com osteonecrose. Magnificação: 400x; seta (marcação positiva contra o TGF- β).

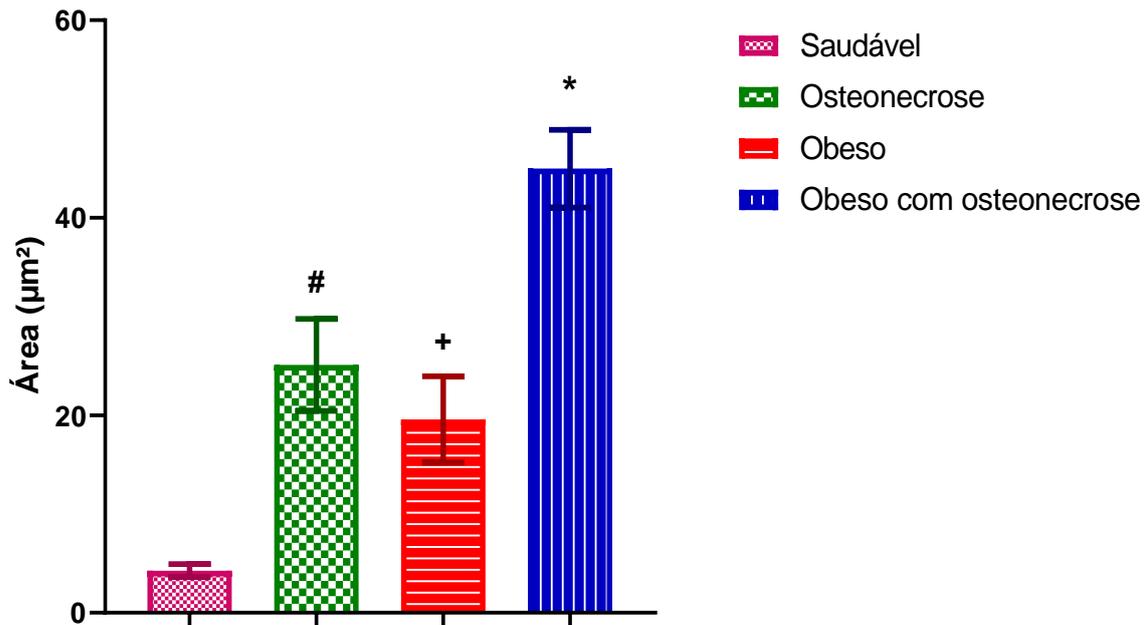


Figura 29 - Médias das áreas para TGF- β . Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 20). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (obeso com osteonecrose vs. saudável, obeso com osteonecrose vs. osteonecrose e obeso com osteonecrose vs. obeso), # $p < 0,05$ (osteonecrose vs. saudável e osteonecrose vs. obeso), + $p < 0,05$ (obeso vs. saudável).

5.3.3 Avaliação Imuno-histoquímica e histomorfométrica da presença do Colágeno I

Na figura 30 identificamos um corte histológico de mandíbula em reação imuno-histoquímica contra o Colágeno I, contraincolorados com hematoxilina, representativo das condições experimentais avaliadas. Nos animais do grupo saudável (A) é observado marcação intensa e multifocal de colágeno I nos osteócitos e matriz (seta). No entanto, nas demais condições experimentais, osteonecrose (B), obeso (C), e obeso com osteonecrose (D) observa-se marcação discreta e focal nos osteócitos (seta). Esses resultados são confirmados através da análise morfométrica (Figura 31), onde a média das áreas marcadas em marrom (positividade da reação) foi maior nos animais do grupo saudável ($26.73 \pm 8.29 \mu\text{m}^2$) seguida dos grupos obeso ($4.05 \pm 2.37 \mu\text{m}^2$), osteonecrose ($2.94 \pm 2.11 \mu\text{m}^2$) e obeso com osteonecrose ($1.56 \pm 0.61 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,0001$).

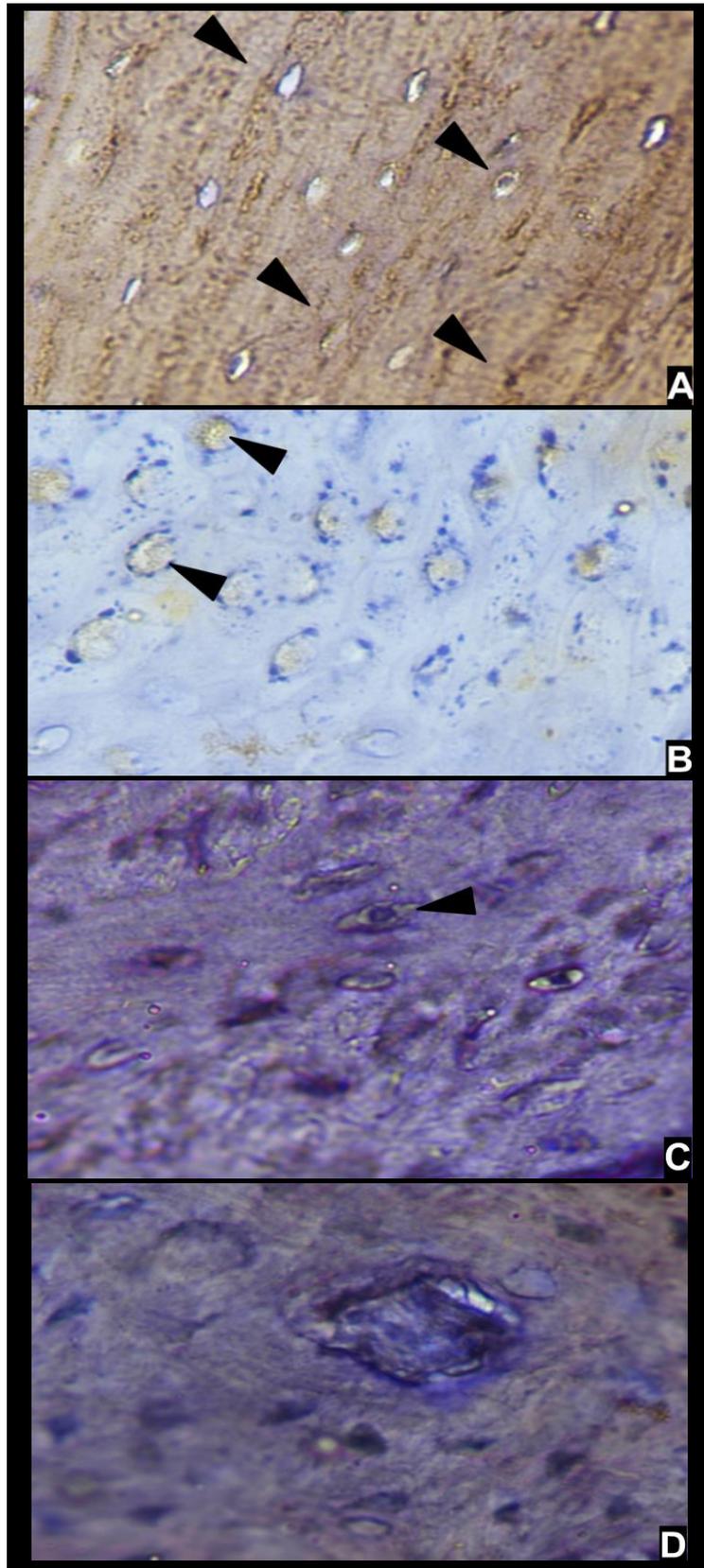


Figura 30 - Corte histológico de mandíbula em reação imuno-histoquímica contra Colágeno I. (A) saudável, (B) osteonecrose, (C) obeso e (D) obeso com osteonecrose. Magnificação: 400x; seta (marcação positiva contra o Colágeno I).

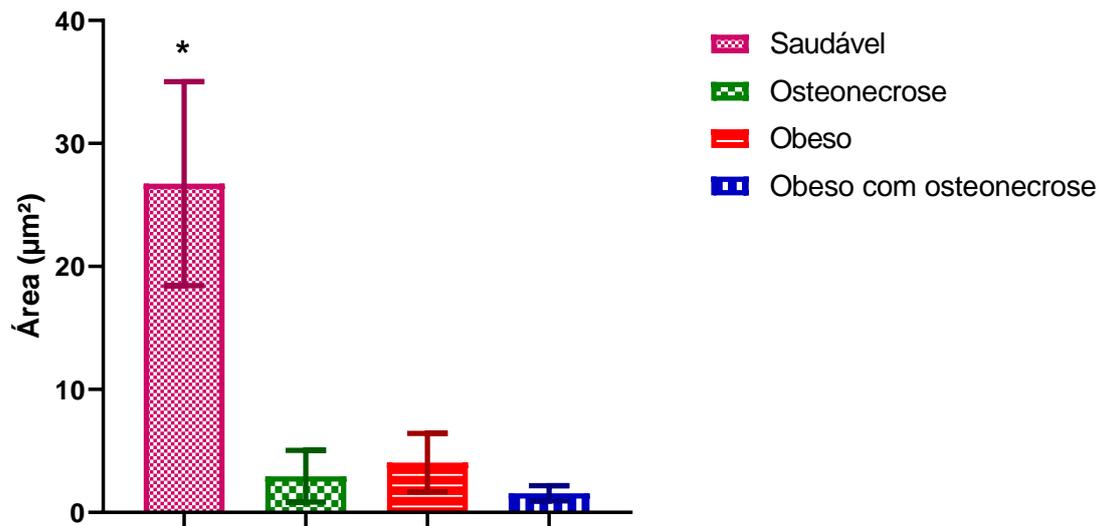


Figura 31 - Médias das áreas para Colágeno I. Os símbolos e as barras verticais representam a média (n = 20). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (saudável vs. osteonecrose, saudável vs. obeso e saudável vs. obeso com osteonecrose).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho implantou de maneira isolada e associada os modelos de obesidade induzida por dieta de alto índice glicêmico (DAIG) e de osteonecrose induzida por bifosfonatos em ratos Wistar. Alterações que incluem o aumento do peso final dos animais, tamanho dos adipócitos, aumentos nos comprimentos nasoanal, circunferências torácica e abdominal, índice de Lee, caracterizaram o modelo de obesidade. Enquanto, alterações microscópicas como a presença de osteoclastos vazios, sequestro ósseo e aumento do infiltrado de células inflamatórias na região do estudo, caracterizaram a implantação da osteonecrose. Possivelmente os dois quadros associados foram responsáveis pela exacerbação de alguns destes parâmetros observados nos seus respectivos grupos isolados.

No Brasil, as estimativas de prevalência de obesidade, segundo o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), aumentaram de 15 para 18% de 2010 a 2014, em ambos os sexos. Na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), a prevalência de obesidade entre os homens aumentou de 9,3% (POF 2002-2003) para 12,7% (POF 2008-2009). Em mulheres, a prevalência de obesidade passou de 14,0 para 17,5%, nas respectivas pesquisas. Por esses motivos destaca-se a importância de estudos sobre esta doença, bem como suas possíveis associações com outros fatores (104).

Este estudo analisou a influência da obesidade no desenvolvimento da osteonecrose por bifosfonatos por meio de modelos animais capazes de correlacionar estas doenças. A criação de modelos animais de obesidade surgiu principalmente pela limitação ética em estudar a suscetibilidade dos humanos às disfunções patológicas acarretadas (105,106). Além disso, trata-se de uma doença multifatorial e se objetiva mimetizar as alterações ocasionadas pela obesidade humana nos roedores o que pode dificultar a sua compreensão (107).

O uso de modelos animais com ratos para estudo da osteonecrose apresenta algumas limitações no que diz respeito ao procedimento cirúrgico, pois pelo porte pequeno, este se torna mais complexo. Porém, existem vantagens

considerando: baixo custo, excelente reprodutibilidade e processo de reparo ósseo mais rápido do que em outros modelos (como humano) (53).

Atualmente existem diversos modelos propostos para a indução da obesidade e uma das principais formas é por meio da alteração dietética, processo este que se assemelha ao que ocorre na obesidade humana (108). Vale ressaltar que a escolha do tipo de dieta é uma decisão imprescindível para o objetivo final do estudo (107).

A dieta escolhida para o estudo em questão, de alto índice glicêmico (DAIG), apresenta como um de seus principais componentes o leite condensado, e foi ofertada aos animais durante 16 semanas. Masi et al. (2017) em um estudo comparando duas dietas em camundongos: uma rica em açúcar e outra rica em gordura, relataram que ocorreu um aumento do ganho de peso corporal cursando com outras alterações como intolerância à glicose, fibrogênese hepática e aumento da inflamação nos animais alimentados com a dieta rica em leite condensado, demonstrando que esse ingrediente é mais inflamatório que a gordura (109).

Ferreira et al. (2022) desenvolveram um estudo que relacionou asma e obesidade, para isto foi feito uso de dieta de alto índice glicêmico, semelhante a utilizada em nosso estudo e foi possível identificar que após o consumo, houve aumento do peso corporal, glicemia em jejum, circunferência abdominal, índice de massa corporal e índice de adiposidade, além da exacerbação da asma em função da obesidade, semelhante à logística do presente estudo onde buscamos identificar correlação da obesidade com outra doença (110).

Mesmo sendo um problema de saúde pública mundial, apresentando alta prevalência entre a população, ainda não existem estudos suficientes que caracterizem efetivamente a obesidade em ratos. O que se observa é o aumento significativo no peso ou no conteúdo energético destes animais quando comparados com um grupo controle (111).

No estudo, os animais que receberam a DAIG apresentaram uma maior evolução ponderal quando comparados aos grupos que receberam a dieta comum (apenas com ração), sendo este fator importante para a caracterização da indução da obesidade, além disto foi observado que existem diferenças significativas entre as médias do grupo obesos (sem e com osteonecrose) em

relação aos animais dos grupos não obesos (saudável e com osteonecrose). Dados semelhantes foram observados por Luz et al. (2018) e por Ferreira et al. (2022) onde os animais dos grupos experimentais também tiveram um aumento no peso em dezesseis semanas de ingestão de DAIG (90).

Além da dieta de alto índice glicêmico, existe também a dieta de cafeteria que pode ser utilizada para indução da obesidade em roedores, esta também induz um aumento do peso dos animais e contém ingredientes com altas taxas calóricas que são ofertados para os animais o que acaba ocasionando aumento no peso corporal e nas reservas de adipócitos dos mesmos. Porém ainda existem poucas informações sobre o índice glicêmico ou a carga glicêmica destes que são critérios importantes para a escolha da dieta (112).

Além do aumento do peso, também podemos levar em consideração aumento de outras medidas não invasivas para avaliar a evolução e indução da obesidade, como o comprimento nasoanal e os índices de massa corporal e de Lee. Nos animais do estudo, observamos um aumento significativo comparando as médias dos grupos em todas as medidas citadas.

Ferreira et al. (2022) (110) realizaram um estudo com dieta para indução da obesidade semelhante à abordada que mostrou um aumento no comprimento nasoanal, corroborando com os dados encontrados no presente estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Novelli et al. (2007) (113), em que animais submetidos a dieta rica em carboidrato, apresentaram também um aumento do mesmo comprimento.

Segundo Bernardis e Patterson (1968), o índice de Lee pode ser utilizado como eficaz de determinação da obesidade em animais. Existe uma relação entre este parâmetro e a massa gorda do animal, quanto maior o índice de Lee, maior a chance do animal se tornar obeso, aliado ao dado que resultados abaixo de 0,30 g/cm são considerados normais (113) (114). No presente estudo os animais dos grupos obesos obtiveram índice de Lee acima de 0,30 g/cm, corroborando com os dados existentes na literatura.

Uma das principais medidas utilizadas para avaliar obesidade e as associações com outras doenças é o IMC, porém esta medida não mostra a composição corporal do indivíduo, caracterizando o percentual de massa (magra ou gorda) (115). Fazendo um comparativo entre os grupos, observamos

diferenças, sendo as médias dos grupos obeso e obeso com osteonecrose maiores que a média dos grupos saudável e osteonecrose. Semelhante a relatos que existem na literatura sobre dietas que alteram o índice em questão (113,116).

No estudo também foram avaliados outros parâmetros antropométricos, como os depósitos de tecido adiposo através das circunferências nas regiões abdominal e torácica. Observamos um aumento em ambas às medidas comparando os grupos não obesos e obesos. A literatura mostra, em estudos semelhantes, que o acúmulo de gorduras na região torácica pode ser responsável por sua correlação com diabetes (117,118). Enquanto o aumento da circunferência abdominal, pode ser um fator preditivo para complicações cardiovasculares (119,120) e associação ao risco de diabetes tipo 2, sendo inclusive mais fortemente associada que o IMC (121).

Diante da complexidade que é o processo de indução da obesidade, também foi feita a retirada e pesagem dos principais depósitos de gordura (inguinal, epididimal e retroperitoneal), bem como o cálculo do índice de adiposidade, sendo dados importantes para implementação da obesidade. Segundo Ferreira et al. (2022) este método se faz muito importante para corroborar com os demais dados que são utilizados no processo de indução da obesidade (110).

No presente estudo, observou-se que os animais dos grupos obesos (com e sem osteonecrose), apresentaram um aumento dos três depósitos de gordura, quando comparados aos animais dos grupos saudável e com osteonecrose e consequentemente um aumento também no índice de adiposidade. Bortolin et al. (2018) realizaram um estudo comparando algumas dietas de indução da obesidade em modelo animal e demonstrou que apenas a dieta do tipo ocidentalizada ocasionou um aumento do índice de adiposidade destes animais, indicando que a escolha da dieta é determinante para a utilização do parâmetro (122).

Não existem na literatura estudos que relacionem de maneira direta o aumento do índice de adiposidade especificamente em animais obesos e com osteonecrose, conforme demonstrou nosso estudo, diante disto são necessários mais estudos sobre este tema. Nascimento et al. (2011) demonstraram por meio da realização de uma pesquisa utilizando dieta rica em gordura (49%) por 15

semanas em ratos Wistar que estes apresentaram um aumento no índice de adiposidade em aproximadamente 4% (86).

São inúmeras as comorbidades que surgem paralelas à obesidade, incluindo alterações hepáticas, como por exemplo, a esteatose que está presente em cerca de 80 a 90% dos indivíduos adultos obesos (123). A doença é caracterizada principalmente pelo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos. De acordo com Abdelmalek et al. (2010) o aumento do consumo de frutose em seres humanos está associado a um agravamento da fibrose e a redução da esteatose. Um dos principais componentes da dieta utilizada no estudo foi o leite condensado, que corresponde a um dissacarídeo que contém glicose e frutose (124).

No estudo observou-se um aumento no peso do fígado dos animais dos grupos obesos (com e sem osteonecrose) quando comparados aos animais dos grupos não obesos, além disso, observou-se um aumento no tamanho dos adipócitos no grupo obeso com osteonecrose, presença de vasos grandes e dilatados (estase hepática) bem como o parênquima hepático destes grupos apresentou presença de esteatose (evidenciada pela presença de hepatócitos com núcleo deslocado para a periferia e vacualizados), indicando que a dieta utilizada pode ter relação com estes achados.

Diante dos principais parâmetros avaliados e listados até o momento, ditos como importantes para comprovação da obesidade, todos eles foram avaliados e em sua maioria apresentaram aumentos significativos após o consumo da DAIG em um período de 16 semanas, comprovando que ocorreu a implantação da doença e validação do modelo.

O processo normal de cicatrização do alvéolo após o procedimento de exodontia, bem como as alterações no mecanismo de reparo causadas pelo uso de bifosfonatos vem sendo estudado em ratos e os resultados se assemelham aos encontrados no nosso estudo (53). Paralela à indução da obesidade, também foi realizada a indução da osteonecrose com a utilização de bifosfonatos. Macroscopicamente, foi observado nos animais do grupo saudável na superfície alveolar após a exodontia a presença de tecido claro, liso e homogêneo, compatível com gengiva saudável, já nos animais dos grupos osteonecrose,

obeso e obeso com osteonecrose foi identificado ausência de revestimento epitelial na região de extração dentária compatível com osso exposto.

A análise histológica revelou no grupo saudável, há presença de tecido ósseo com osteócitos nucleados sem alterações morfológicas, compatíveis com a normalidade. No entanto, no grupo osteonecrose, observa-se muitos osteócitos anucleados, compatível com osteonecrose, semelhante a resultados publicados (17,53,125). Na pesquisa em questão, especificamente nos animais dos grupos obeso e obeso com osteonecrose, além da presença de osteócitos anucleados, identificou-se sequestro ósseo, sugerindo que a obesidade está associada a um dano tecidual mais severo. O sequestro ósseo foi demonstrado em animais não obesos por meio de estudos que realizaram indução da osteonecrose (17,45), porém, este é o primeiro relato de sequestro ósseo em mandíbula de animais obesos com osteonecrose.

Conforme abordado anteriormente, os bifosfonatos atuam na diminuição e reabsorção óssea porque induzem apoptose osteoclástica e com isso acabam inibindo os osteoclastos maduros. O metabolismo ósseo possui duas atividades: deposição e reabsorção. Na deposição, osteoblastos sintetizam uma matriz que sofre mineralização primária e um longo processo de mineralização secundária, que vem logo em seguida. Já a reabsorção óssea é realizada pelos osteoclastos e consiste na dissolução mineral óssea e no catabolismo dos componentes da matriz óssea (126).

Em nosso estudo foi possível evidenciar que a obesidade é uma condição que quando associada à osteonecrose induz um aumento na área de necrose óssea, tornando a doença ainda mais grave. Esta comprovação foi feita através das morfometrias das áreas de necrose de cada grupo. Observamos diferenças significativas entre o grupo saudável e os demais (osteonecrose, obeso e obeso com osteonecrose), sendo a área de necrose maior em área nos grupos obeso com osteonecrose e osteonecrose, que foram os grupos que passaram pela indução da osteonecrose, mostrando assim que o protocolo de indução da osteonecrose além de eficiente gerou uma área de necrose ainda maior quando associada à obesidade.

Esta correlação pode ter ocorrido por alguns fatores, como por exemplo, a inflamação característica das duas doenças. Estudos de Zandi et al. (2016) (17) e

Vilarinho et al. (2017) apontam presença de infiltrado inflamatório na área das lesões induzidas pela manifestação da osteonecrose em mandíbulas de ratos (45). A necrose óssea pode levar à perda da integridade do tecido mole. Além disso, a própria exodontia também ocasiona ruptura direta dos tecidos moles o que torna a doença ainda mais severa, favorecendo o prolongamento da inflamação em um ciclo de *feedback* positivo, aumentando a gravidade ou extensão da doença (84).

Além da inflamação se manifestar na área das lesões na mandíbula, em nosso estudo foi possível observar também a presença de inflamação no tecido adiposo de alguns grupos. Através da avaliação microscópica deste, nos animais dos grupos saudável e osteonecrose os adipócitos encontravam-se com ausência de processos inflamatórios. Já nos animais dos grupos obeso e obeso com osteonecrose, os adipócitos apresentavam-se amplos e exclusivamente no grupo obeso com osteonecrose foi possível ainda a identificação da presença de grandes vasos dilatados (estase sanguínea) no tecido adiposo.

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo, independentemente da idade, sexo, altura e está diretamente relacionada à inflamação e diversas doenças crônicas não transmissíveis, influenciando assim a organização corporal (127). Luz et al. (2018) realizaram um estudo com ratos Wistar utilizando DAIG e observaram um aumento no processo inflamatório (90).

A relação entre a obesidade e a inflamação é sustentada principalmente pelo fato de que o nível circulante de muitas citocinas e proteínas de fase aguda associadas à inflamação apresenta-se alto em pacientes obesos. Os adipócitos secretam várias citocinas e proteínas de fase aguda que, direta ou indiretamente, elevam a produção e circulação de fatores relacionados com o processo inflamatório (128). Logo, a compreensão sobre a origem dos marcadores inflamatórios na obesidade se faz necessária para melhor compreensão desta correlação.

De acordo com Yudkin et al. (1999) e Trayhurn e Wood (2004) existem três possibilidades para a origem dos marcadores inflamatórios: a primeira é que elas são produzidas por órgãos diferentes do tecido adiposo, como por exemplo o fígado, além das células imunes. A segunda hipótese é que o tecido adiposo branco secreta fatores que estimulam a produção de marcadores inflamatórios

pelo fígado e outros órgãos. A terceira possibilidade sugere que os marcadores inflamatórios têm origem através dos próprios adipócitos (129). Além destas, existe ainda a possibilidade da origem dos mesmos ser através da combinação de mais de um fator dos elencados acima (130). Assim, são necessários mais estudos para que este mecanismo fisiopatológico seja melhor compreendido.

O presente estudo também analisou as condições experimentais a fim de compreender o mecanismo de reparo e evidenciar a influência do TGF- β , TNF- α e colágeno tipo I no tecido ósseo associado as doenças estudadas (osteonecrose e obesidade) de maneira isolada e associada.

De acordo com Alsalih et al., (2021) o uso de ácido zoledrônico está associado a redução da migração e proliferação de células epiteliais, endoteliais e fibroblastos. Além disso, compromete a expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), acarretando a diminuição da vascularização (131). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo como a redução do tecido de granulação nos grupos osteonecrose e obeso com osteonecrose, demonstrando assim que o processo de homeostase dos tecidos lesionados foi comprometida e o reparo foi prejudicado favorecendo o desenvolvimento da doença. Já nos grupos saudável e obeso foi possível identificar uma intensa deposição na matriz extracelular e angiogênese.

A obesidade também tem sido relacionada a mudanças na homeostase do tecido ósseo, por meio de uma série de mecanismos. Podemos citar: alterações hormonais nos reguladores do metabolismo ósseo, aumento do estresse oxidativo e inflamação (132). O tecido adiposo produz várias citocinas pró-inflamatórias (como o TNF- α) e adipocinas que podem influenciar negativamente a saúde do tecido ósseo e reparo.

A deposição de matriz extracelular é um mecanismo fundamental para o processo de formação e manutenção da estrutura do tecido ósseo. Porém, em indivíduos obesos com as mudanças decorrentes do tecido adiposo citadas anteriormente, podem ocorrer interações complexas entre estas células e os osteoblastos e osteoclastos acarretando danos ao tecido.

O TNF- α apresenta grande diversidade de atividades biológicas, como por exemplo: respostas imunológicas, reações inflamatórias e neovascularização (133). Também pode promover o processo de apoptose celular (134). Além disso,

no tecido ósseo ele promove a erosão óssea, interferindo no processo de diferenciação e maturação dos osteoclastos ou realizando a exposição da matriz óssea (135). Para que este processo ocorra, na área da lesão óssea (onde o processo inflamatório está presente), a interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (136) e o ligante para ativação de receptores de NF-kB (RANKL) também estão presentes e atrelados ao TNF-alfa promovem um aumento no processo de recrutamento, diferenciação e ativação dos osteoclastos (137).

Cheung et al., (2011) realizaram um estudo que evidenciou que a administração crônica de ácido zoledrônico tem sido associada ao aumento de TNF-alfa (138). Este marcador é expresso na polpa dental podendo ativar os domínios de morte celular, estimulando a infiltração e ativação de macrófagos (139). Cviki et al., (2011) desenvolveram um estudo *in vitro* sobre as taxas de apoptose de células da polpa incubadas com ácido zoledrônico. Este estudo revelou que houve uma redução na sobrevivência das células devido à ação tóxica direta do ácido zoledrônico (140).

Em um estudo clínico com o uso de inibidores de TNF-alfa em doenças sistêmicas foi evidenciada a eficácia no processo de inibição da reabsorção óssea (141). Na periodontite o TNF-alfa é um dos principais fatores para o agravamento da doença (142). A injeção de solução contendo um antagonista do TNF-alfa pode atuar inibindo a formação de osteoclasto, diminuindo o recrutamento de células inflamatórias e reduzindo a perda óssea em 60% (143). Também foi demonstrada a diminuição de danos ósseos na artrite reumatoide com uso de antagonistas do TNF-alfa (144). Logo esta pode ser uma alternativa para a redução de danos teciduais.

No presente estudo foi observado no grupo saudável marcação para o TNF-alfa discreta e focal nos osteócitos e uma menor média da área marcada, já nos grupos osteonecrose, obeso e obeso com osteonecrose a marcação foi intensa e multifocal e os osteócitos apresentaram aspecto irregular e alargados e maiores médias das áreas marcadas. Sendo o TNF-alfa importante para a reabsorção e por gerar danos ao tecido ósseo em doenças relacionadas a processo inflamatório (136,137), possivelmente este resultante da osteonecrose, influenciou para tais achados nos grupos acometidos com a doença. Além disso, o tecido adiposo produz uma quantidade relativamente grande de TNF-alfa (145),

fato que corrobora com os resultados desta marcação acentuada nos grupos acometidos com a obesidade.

Relações entre TNF-alfa circulante e índices de obesidade têm sido estudados. Jellema et al., (2004) realizaram um estudo que identificou que a redução de massa corporal diminui a concentração circulante dessa adipocina (146). Yudkin et al., (2005) sugeriram que a produção de TNF-alfa pela gordura ao redor da origem arteriolar inibe o estímulo da insulina para a síntese de óxido nítrico, resultando em vasoconstrição (147). Efeitos como a inibição da via de sinalização do receptor de insulina tem sido descritos, incluindo alguns estudos que envolvem ratos obesos (148,149).

Alguns estudos tem buscado compreender a associação entre os níveis de adiponectina e de marcadores inflamatórios (como o TNF-alfa) em diferentes populações e tem demonstrado que a resposta anti-inflamatória da adiponectina pode ser mediada pelas concentrações desta citocina (150,151). A adiponectina é um fator produzido pelo tecido adiposo e está relacionado com resposta inflamatória e regulação do balanço energético (133). Além disso, também existem estudos que relacionam a ação desta adipocina com o tecido ósseo apresentando um papel significativo na regulação do processo de remodelação óssea (152,153). Logo, a análise desta adipocina pode ser um importante preditor para melhor compreensão entre a relação do TNF-alfa, tecido ósseo e obesidade.

Outra citocina importante para o processo de remodelação óssea é o TGF- β , que está envolvida em diversos processos biológicos e fisiológicos, além de atuar no controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose, síntese de componentes de matriz extracelular bem como respostas imunológicas. A desregulação desta citocina está associada ao surgimento de doenças, como câncer (mama, próstata, pulmão, fígado) e fibrose (154).

A produção de colágeno por meio de fibroblastos pode ocorrer através de via de sinalização intracelular ativada pelo TGF- β . Este é um homodímero proteico estabilizado por interações hidrofóbicas, cuja forma ativa é sintetizada por meio da molécula TGF- β latente que é composta do dímero TGF- β associado a um complexo não covalente com um peptídeo associado à latência (LAP). Após o processo de síntese esta citocina é excretada no meio extracelular (6). Ligantes da família TGF- β exercem sua função formando um complexo de sinalização

hexamérica com dois receptores da família TGF- β tipo I e dois tipos II, sendo a formação desse complexo responsável pelo processo de ativação das vias de sinalização SMAD (155).

O processo de sinalização começa com os receptores tipo II adicionando grupos fosfato a uma região nos receptores tipo I, chamada "domínio GS" (este domínio é rico em glicina/serina). Em seguida ocorre a ligação do "domínio GS" a proteína inibidora chamada FKBP12 aumentando assim a afinidade de proteínas R-SMADs para o complexo. Posteriormente a esta ligação, as proteínas R-SMADs passam por um processo de fosforilação levando assim a separação do complexo receptor e associação ao SMAD4 se deslocando para o núcleo da célula onde desempenha a função de controle da expressão gênica, exercendo assim influência em várias funções celulares (156,157).

No presente estudo foi possível identificar uma marcação para o TGF- β discreta e focal nos osteócitos dos grupos saudável e osteonecrose, já nos grupos obeso e obeso com osteonecrose esta marcação foi intensa e multifocal. Sendo o TGF- β uma citocina importante para o processo de cicatrização (formação do tecido de granulação), acredita-se que esta citocina pode ter sido ativada para produção de colágeno no tecido ósseo (demonstrando assim processo de cicatrização).

O TGF- β é uma citocina anti-inflamatória que tem papel importante na manutenção da homeostase tecidual, facilitando assim a resolução e induzindo o processo de reparo. Esta atua regulando negativamente o recrutamento e ativação de leucócitos e em contrapartida recruta fibroblastos estimulando assim a síntese dos componentes da matriz extracelular (158). Esta propriedade anti-inflamatória pode ter contribuído para obtenção de tais achados nos grupos obesos (visto que o indivíduo obeso apresenta acentuado processo inflamatório) onde a marcação para o TGF- β foi mais intensa. Vale ressaltar que a marcação para o TNF-alfa nestes grupos também foi intensa e multifocal corroborando com esta hipótese da influência do processo inflamatório.

Concomitantemente identificou-se a marcação para o colágeno I no grupo saudável de forma intensa e multifocal nos osteócitos e na matriz indicando a ocorrência de possível processo de cicatrização, diferentemente dos grupos osteonecrose, obeso e obeso com osteonecrose onde esta marcação foi discreta

e focal indicando o oposto em relação ao processo de cicatrização, possivelmente o processo inflamatório também tenha exercido influência sobre estes achados uma vez que o mesmo está presente em ambas as condições.

Existem estudos que demonstram que o ácido zoledrônico interfere no processo síntese de colágeno em culturas celulares de fibroblastos periodontais e uma das causas para tais achados é o fato deste fármaco atuar aumentando a taxa de apoptose (159–161). Um dos potenciais causadores para este efeito tóxico é o estresse oxidativo que é gerado na área alvo do medicamento. De acordo com Colli et al., (2015) com a interação do ácido zoledrônico, fibroblastos presentes no ligamento periodontal passam por um processo de aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio por uma via dependente da síntese de óxido-nítrico constitutiva acarretando assim um estresse inflamatório (161), além disso sabe-se que os osteócitos são células sensíveis a esse estresse inflamatório (162).

No presente estudo para indução da osteonecrose foi associada uma exodontia (trauma) entre a quarta e quinta semana da administração do ácido zoledrônico. Este fármaco se adere à hidroxiapatita do tecido ósseo de forma irreversível (163), logo quando ocorre o trauma os tecidos já se apresentavam em processo inflamatório e este evento possivelmente estimulou um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estudos em modelos experimentais e clínicos sugerem a associação entre o processo inflamatório e a osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bifosfonatos (164–166). Logo um dos fatores chave para uma melhor compreensão de tais fatores é o estudo do perfil imunológico desta doença.

A depender da concentração o ácido zoledrônico pode gerar implicações distintas. Quando altas, a síntese de fosfatase alcalina e a morfologia dos odontoblastos pode ser prejudicada, em contrapartida, quando as concentrações são baixas o fármaco pode aumentar a expressão de colágeno I (167). No presente estudo foi possível observar uma marcação para colágeno I menor nos grupos osteonecrose e obeso com osteonecrose (grupos que receberam ácido zoledrônico), achados que corroboram com os achados de Basso et al. (2013). Além disso de acordo com Scheper et al., (2009) e Naidu et al., (2008) respectivamente, este fármaco é tóxico para vários grupos celulares como

fibroblastos e osteoblastos, esperando-se assim uma redução na síntese de colágeno I (160,168).

Como abordado anteriormente, a obesidade é uma doença que afeta negativamente o metabolismo ósseo, principalmente através de alterações no processo inflamatório (132). Sendo os bifosfonatos responsáveis por aumentar a produção de mediadores inflamatórios agudos e modificarem o perfil imunológico e celular de pacientes (169–172), acredita-se que a associação das duas condições atrelada as alterações geradas principalmente no processo inflamatório possam ter contribuído para a baixa deposição de colágeno I nos grupos osteonecrose, obeso e obeso com osteonecrose.

Atrelado à redução na deposição de colágeno tipo I nos grupos acima citados, encontrou-se um aumento na marcação para o TGF- β nos mesmos grupos. Tal achado pode demonstrar que possivelmente no grupo saudável o TGF- β foi sintetizado e utilizado para ativar células do tecido ósseo a produzirem colágeno e assim realizar o processo de cicatrização, diferente dos demais grupos onde possivelmente este mecanismo não foi realizado e o processo de cicatrização em comparação ao grupo saudável não foi o mesmo.

O fato acima citado indica possivelmente que a osteonecrose modula deposição de Colágeno I em ratos obesos via TGF- β . Outro fator importante é o processo inflamatório já citado nas duas doenças (osteonecrose e obesidade) onde acredita-se que exerça influência negativa na modulação da deposição do colágeno I. A escassez de trabalhos que associam a obesidade e osteonecrose e os parâmetros aqui elencados dificultam o entendimento de maneira clara e assertiva o desfecho final do trabalho. Diante disto, a relação entre o uso do ácido zoledrônico e a expressão de marcadores inflamatórios na osteonecrose associada a obesidade precisa ser melhor compreendida para confirmação de tais hipóteses e isto será possível através da realização de mais estudos que envolvam estas condições.

7. CONCLUSÃO

Foi possível analisar a influência da obesidade no desenvolvimento da osteonecrose por bifosfonato através do uso de modelos animais, com a implantação do modelo de indução da obesidade e osteonecrose em ratos Wistar, e percebeu-se a influência desses fatores sobre a evolução ponderal e nos parâmetros murinométricos.

Também foi possível identificar as alterações anatomopatológicas no modelo de osteonecrose, bem como as alterações histológicas no fígado e no tecido adiposo, confirmando assim a implantação dos modelos de indução da osteonecrose e obesidade, além da possível associação entre essas doenças.

O estudo identificou através da microscopia e morfometria que TGF- β , TNF-alfa e Colágeno I exercem um importante papel no tecido ósseo frente ao acometimento com as doenças em questão (osteonecrose e obesidade), onde a osteonecrose modula deposição de Colágeno I em ratos obesos via TGF- β .

REFERÊNCIAS*

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;72:1938–1956. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031.
2. Corral-Gudino L, Tan AJ, del Pino-Montes J, Ralston SH. Bisphosphonates for Paget’s disease of bone in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017; doi: 10.1002/14651858.CD004956.pub3.
3. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone*. 2008;42:848–860. doi: 10.1016/j.bone.2007.12.225.
4. Crane JL, Xian L, Cao X. Role of TGF- β Signaling in Coupling Bone Remodeling. 2016. p. 287–300.
5. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2007;20:51–58. doi: 10.1590/S0102-67202007000100010.
6. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA. Latent TGF- β structure and activation. *Nature*. 2011;474:343–349. doi: 10.1038/nature10152.
7. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, et al. TGF- β 1–induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 2009;15:757–765. doi: 10.1038/nm.1979.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.

8. Gil-Cardoso K, Ginés I, Pinent M, Ardévol A, Terra X, Blay M. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *British Journal of Nutrition*. 2017;117:218–229. doi: 10.1017/S0007114516004608.
9. Barroso ML, Moura AMWA, Pinto NV. Correlação entre obesidade geral e abdominal em mulheres ativas diabéticas e/ou hipertensas. *Research, Society and Development*. 2020;9:e179973679. doi: 10.33448/rsd-v9i7.3679.
10. Vargas-Franco JW, Castaneda B, Rédiní F, Gómez DF, Heymann D, Lézot F. Paradoxical side effects of bisphosphonates on the skeleton: What do we know and what can we do? *J Cell Physiol*. 2018;233:5696–5715. doi: 10.1002/jcp.26465.
11. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;72:1938–1956. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031.
12. George EL, Lin Y-L, Saunders MM. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a mechanobiology perspective. *Bone Rep*. 2018;8:104–109. doi: 10.1016/j.bonr.2018.03.003.
13. O’Carrigan B, Wong MH, Willson ML, Stockler MR, Pavlakis N, Goodwin A. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;2018. doi: 10.1002/14651858.CD003474.pub4.
14. Farrell KB, Karpeisky A, Thamm DH, Zinnen S. Bisphosphonate conjugation for bone specific drug targeting. *Bone Rep*. 2018;9:47–60. doi: 10.1016/j.bonr.2018.06.007.
15. Enes CC, Silva JR. Associação entre excesso de peso e alterações lipídicas em adolescentes. *Cien Saude Colet*. 2018;23:4055–4063. doi: 10.1590/1413-812320182312.27882016.

16. Borgo MV, Pimentel EB, Baldo MP, Souza JB de, Malta DC, Mill JG. Prevalência de fatores de risco cardiovascular na população de Vitória segundo dados do VIGITEL e da Pesquisa Nacional de Saúde de 2013. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2019;22. doi: 10.1590/1980-549720190015.
17. Zandi M, Dehghan A, Malekzadeh H, Janbaz P, Ghadermazi K, Amini P. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2016;44:271–278. doi: 10.1016/j.jcms.2015.12.010.
18. Rasmusson L, Abtahi J. Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the Jaw: An Update on Pathophysiology, Risk Factors, and Treatment. *Int J Dent*. 2014;2014:1–9. doi: 10.1155/2014/471035.
19. Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Quim Nova*. 2005;28:274–280. doi: 10.1590/S0100-40422005000200019.
20. Santos PSFL, Sobrinho ALP de C. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bifosfonatos. *Journal of Dentistry & Public Health*. 2020;11:25–32. doi: 10.17267/2596-3368dentistry.v11i1.2601.
21. Edwards BJ, Hellstein JW, Jacobsen PL, Kaltman S, Mariotti A, Migliorati CA. Updated recommendations for managing the care of patients receiving oral bisphosphonate therapy. *The Journal of the American Dental Association*. 2008;139:1674–1677. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0110.
22. Tardast A, Sjöman R, Løes S, Abtahi J. Bisphosphonate associated osteomyelitis of the jaw in patients with bony exposure: prevention, a new way of thinking. *Journal of Applied Oral Science*. 2015;23:310–314. doi: 10.1590/1678-775720140506.
23. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors,

- Recognition, Prevention, and Treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2005;63:1567–1575. doi: 10.1016/j.joms.2005.07.010.
24. Torregrosa José-Vicente RAM. Uso de bifosfonatos en la enfermedad renal crónica. *Nefrología (Madr)* . 2010;3:288–296.
 25. Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis International*. 2008;19:733–759. doi: 10.1007/s00198-007-0540-8.
 26. Green JR. Zoledronic acid: pharmacologic profile of a potent bisphosphonate. *J Organomet Chem*. 2005;690:2439–2448. doi: 10.1016/j.jorganchem.2004.09.069.
 27. Fvasconcellos. File: Zoledronic acid svg. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zoledronic_acid.svg. 2007.
 28. Gong X, Yu W, Zhao H, Su J, Sheng Q. Skeletal Site-specific Effects of Zoledronate on in vivo Bone Remodeling and in vitro BMSCs Osteogenic Activity. *Sci Rep*. 2017;7:36129. doi: 10.1038/srep36129.
 29. Kim J-W, Landayan MEA, Lee J-Y, Tatad JCI, Kim S-J, Kim M-R, Cha I-H. Role of microcracks in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Clin Oral Investig*. 2016;20:2251–2258. doi: 10.1007/s00784-016-1718-2.
 30. Santos PS da S, Oliveira MA, Felix VB. Osteonecrose maxilofacial induzida por bisfosfonatos em indivíduos com osteoporose. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*. 2011;46:495–499. doi: 10.1590/S0102-36162011000500003.
 31. Andrade VM de. Osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bifosfonatos: relato de casos. [Rio de Janeiro]: Universidade Federal do Rio de Janeiro ; 2015.
 32. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica - texto e atlas*. 13th ed. Rio de Janeiro ; 2017.

33. Van Schepdael A, Vander Sloten J, Geris L. A mechanobiological model of orthodontic tooth movement. *Biomech Model Mechanobiol.* 2013;12:249–265. doi: 10.1007/s10237-012-0396-5.
34. HP Rang, MM Dale, JM Ritter, RJ Flower. *Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores.* 6th ed. Rio de Janeiro; 2007.
35. Marx RE. Bone and Bone Graft Healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19:455–466. doi: 10.1016/j.coms.2007.07.008.
37. Baloul SS. Osteoclastogenesis and Osteogenesis during Tooth Movement. 2016. p. 75–79.
38. LIU W, ZHANG X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Mol Med Rep.* 2015;11:3212–3218. doi: 10.3892/mmr.2015.3152.
39. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12:17–25. doi: 10.1016/j.molmed.2005.11.007.
40. Zhao N, Lin J, Kanzaki H, Ni J, Chen Z, Liang W, Liu Y. Local osteoprotegerin gene transfer inhibits relapse of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2012;141:30–40. doi: 10.1016/j.ajodo.2011.06.035.
41. Gotcher JE, Jee WSS. The progress of the periodontal syndrome in the rice rat. *J Periodontal Res.* 1981;16:441–455. doi: 10.1111/j.1600-0765.1981.tb00995.x.
42. Allen MR, Burr DB. Mandible Matrix Necrosis in Beagle Dogs After 3 Years of Daily Oral Bisphosphonate Treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2008;66:987–994. doi: 10.1016/j.joms.2008.01.038.
43. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer

- patients. *Oral Oncol.* 2009;45:164–172. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.04.013.
44. Soares MQS, van Dessel J, Jacobs R, da Silva Santos PS, Cestari TM, Garlet GP, Duarte MAH, Imada TSN, Lambrechts I, Rubira-Bullen IRF. Zoledronic Acid Induces Site-Specific Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2018;76:1893–1901. doi: 10.1016/j.joms.2018.03.007.
 45. Vilarinho JLP, Ferrare N, Moreira AMR, Moura HF, Acevedo AC, Chaves SB, Melo NS, Leite AF, Macedo SB, de Souza MP, et al. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. *Arch Oral Biol.* 2017;82:79–85. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.002.
 46. Otto S, Pautke C, Martin Jurado O, Nehrbass D, Stoddart MJ, Ehrenfeld M, Zeiter S. Further development of the MRONJ minipig large animal model. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2017;45:1503–1514. doi: 10.1016/j.jcms.2017.07.002.
 47. Córdova LA, Guilbaud F, Amiaud J, Battaglia S, Charrier C, Lezot F, Piot B, Redini F, Heymann D. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2016;44:1387–1394. doi: 10.1016/j.jcms.2016.07.015.
 48. Matsumoto MA, de Abreu Furquim EM, Gonçalves A, Santiago-Júnior JF, Saraiva PP, Cardoso CL, Munerato MS, Okamoto R. Aged rats under zoledronic acid therapy and oral surgery. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2017;45:781–787. doi: 10.1016/j.jcms.2017.02.002.
 49. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR de, Esteves JC, Marcantonio Jr E. Experimental osteonecrosis: development of a model in rodents administered alendronate. *Braz Oral Res.* 2016;30. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0099.

50. Vidal-Gutierrez X, Gomez-Clavel J, Gaitan-Cepeda L. Dental extraction following zoledronate, induces osteonecrosis in rat's jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;0–0. doi: 10.4317/medoral.21609.
51. Berti-Couto SA, Vasconcelos ACU, Iglesias JE, Figueiredo MAZ, Salum FG, Cherubini K. Diabetes mellitus and corticotherapy as risk factors for alendronate-related osteonecrosis of the jaws: A study in Wistar rats. *Head Neck*. 2014;36:84–93. doi: 10.1002/hed.23260.
52. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab*. 2010;28:165–175. doi: 10.1007/s00774-009-0128-9.
53. Mergoni G, Vescovi P, Sala R, Merigo E, Passerini P, Maestri R, Corradi D, Govoni P, Nammour S, Bianchi MG. The effect of laser therapy on the expression of osteocalcin and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone. *Supportive Care in Cancer*. 2016;24:807–813. doi: 10.1007/s00520-015-2847-x.
54. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar G, Uslu Ü, Sencift K. Preventive Effect of Phosphodiesterase Inhibitor Pentoxifylline Against Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: An Animal Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;75:2354–2368. doi: 10.1016/j.joms.2017.04.017.
55. Yanık S, Aras MH, Erkılıç S, Bozdağ Z, Demir T, Çetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Arch Oral Biol*. 2016;65:59–65. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.010.
56. World Health Organization. Global action plan on physical activity 2018-2030: more active people for a healthier world. 2019 [cited 2022 Dec 21];

57. Agência Nacional de Saúde Suplementar (BR). Manual de diretrizes para o enfrentamento da obesidade na saúde suplementar brasileira. 2017;
58. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Genebra; 2015.
59. Bahia L, Coutinho ESF, Barufaldi LA, de Azevedo Abreu G, Malhão TA, Ribeiro de Souza CP, Araujo DV. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2012;12:440. doi: 10.1186/1471-2458-12-440.
60. Iser BPM, Vigo Á, Duncan BB, Schmidt MI. Trends in the prevalence of self-reported diabetes in Brazilian capital cities and the Federal District, 2006–2014. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8:70. doi: 10.1186/s13098-016-0185-x.
61. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82–97. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.014.
62. Moreira PVL, Rosenblatt A, Severo AMR. Prevalence of dental caries in obese and normal-weight Brazilian adolescents attending state and private schools. *Community Dent Health*. 2006;23:251–253. Cited: in : PMID: 17194074.
63. Prpić J, Kuis D, Pezelj-Ribarić S. Obesity and oral health--is there an association? *Coll Antropol*. 2012;36:755–759. Cited: in : PMID: 23213928.
64. Duarte VMSP. Análise do atendimento odontológico a pacientes com obesidade na atenção primária à saúde e conhecimento de cirurgiões dentistas sobre a associação entre obesidade e doença periodontal. [João Pessoa]: Universidade Federal da Paraíba; 2022.
65. Souza CR de, Ceccato M das GB, Santos SF dos, Mol MPG, Silveira MR. Alterações no índice de massa corporal: Coorte em indivíduos em uso de dolutegravir. *Research, Society and Development*. 2021;10:e65101623189. doi: 10.33448/rsd-v10i16.23189.

66. Kadouh HC, Acosta A. Current paradigms in the etiology of obesity. *Tech Gastrointest Endosc.* 2017;19:2–11. doi: 10.1016/j.tgie.2016.12.001.
67. Oussaada SM, van Galen KA, Cooman MI, Kleinendorst L, Hazebroek EJ, van Haelst MM, ter Horst KW, Serlie MJ. The pathogenesis of obesity. *Metabolism.* 2019;92:26–36. doi: 10.1016/j.metabol.2018.12.012.
68. Singh R, Verma A, Aljabari S, Vasylyeva TL. Urinary biomarkers as indicator of chronic inflammation and endothelial dysfunction in obese adolescents. *BMC Obes.* 2017;4:11. doi: 10.1186/s40608-017-0148-2.
69. McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. *Immunity.* 2014;41:36–48. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.010.
70. Lakkis JI, Weir MR. Obesity and Kidney Disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2018;61:157–167. doi: 10.1016/j.pcad.2018.07.005.
71. Lopategi A, López-Vicario C, Alcaraz-Quiles J, García-Alonso V, Rius B, Titos E, Clària J. Role of bioactive lipid mediators in obese adipose tissue inflammation and endocrine dysfunction. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;419:44–59. doi: 10.1016/j.mce.2015.09.033.
72. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism.* 2019;92:71–81. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.005.
73. Gasparin FRS, Carreño FO, Mewes JM, Gilglioni EH, Pagadigorria CLS, Natali MRM, Utsunomiya KS, Constantin RP, Ouchida AT, Curti C, et al. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2018;1864:2495–2509. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.04.004.
74. Kovesdy CP, Furth SL, Zoccali C. Obesity and kidney disease: hidden consequences of the epidemic. *Jornal Brasileiro de Nefrologia.* 2017;39. doi: 10.5935/0101-2800.20170001.

75. Kypridemos C, O'Flaherty M, Capewell S. Fruit and vegetable consumption and non-communicable disease: time to update the '5 a day' message? *J Epidemiol Community Health* (1978). 2014;68:799–800. doi: 10.1136/jech-2014-203981.
76. Lopes LR, Ribeiro SMLT, Figueiredo VP, Leite ALJ, Nicolato RL de C, Gomes JAE, de Oliveira FLP, Talvani A. The overweight increases circulating inflammatory mediators commonly associated with obesity in young individuals. *Cytokine*. 2018;110:169–173. doi: 10.1016/j.cyto.2018.04.024.
77. Oguri M, Fujimaki T, Horibe H, Kato K, Matsui K, Takeuchi I, Yamada Y. Obesity-related changes in clinical parameters and conditions in a longitudinal population-based epidemiological study. *Obes Res Clin Pract*. 2017;11:299–314. doi: 10.1016/j.orcp.2016.08.008.
78. Leffa DD, dos Santos CEI, Daumann F, Longaretti LM, Amaral L, Dias JF, da Silva J, Andrade VM. Effects of Supplemental Acerola Juice on the Mineral Concentrations in Liver and Kidney Tissue Samples of Mice Fed with Cafeteria Diet. *Biol Trace Elem Res*. 2015;167:70–76. doi: 10.1007/s12011-015-0276-9.
79. Rosenberger DS, Falangola MF, Ledreux A, Nie X, Suhre WM, Boger HA, Granholm A-C. Memory and hippocampal architecture following short-term midazolam in western diet-treated rats. *Neurosci Lett*. 2016;621:68–74. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.021.
80. Mucellini AB, Laureano DP, Silveira PP, Sanvitto GL. Maternal and post-natal obesity alters long-term memory and hippocampal molecular signaling of male rat. *Brain Res*. 2019;1708:138–145. doi: 10.1016/j.brainres.2018.12.021.
81. Yen-Chen T, Tsung-Hai H, Meei-Ju Y, Wei-Lun H, Chi-Tang H, Min-Hsiung P. The effects of the extract of oolong tea and its metabolites from *Andraca theae* in high fat diet induced obese Wistar rat. *Food Science and Human Wellness*. 2018;7:120–124. doi: 10.1016/j.fshw.2018.05.001.

82. Ferro Cavalcante TC, Lima da Silva JM, da Marcelino da Silva AA, Muniz GS, da Luz Neto LM, Lopes de Souza S, Manhães de Castro R, Ferraz KM, do Nascimento E. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. *Lipids*. 2013;48:1157–1168. doi: 10.1007/s11745-013-3833-z.
83. Fernandes MR, Lima NV de, Rezende KS, Santos ICM, Silva IS, Guimarães R de CA. Animal models of obesity in rodents. An integrative review. *Acta Cir Bras*. 2016;31:840–844. doi: 10.1590/s0102-865020160120000010.
84. Aghaloo TL, Cheong S, Bezouglaia O, Kostenuik P, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Tetradis S. RANKL Inhibitors Induce Osteonecrosis of the Jaw in Mice With Periapical Disease. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014;29:843–854. doi: 10.1002/jbmr.2097.
85. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2014;42:744–750. doi: 10.1016/j.jcms.2013.11.005.
86. Nascimento AF, Luvizotto RAM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Seiva FR, Justulin LA, Silva MDP, Okoshi K, Wang X-D, Cicogna AC. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci*. 2011;88:1031–1038. doi: 10.1016/j.lfs.2011.03.015.
87. Bigueti CC, De Oliva AH, Healy K, Mahmoud RH, Custódio IDC, Constantino DH, Ervolino E, Duarte MAH, Fakhouri WD, Matsumoto MA. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. *PLoS One*. 2019;14:e0214173. doi: 10.1371/journal.pone.0214173.
88. Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3rd ed. 2009.

89. Aguiar AJFC, Carvalho FMC, Costa IS, Santos JPSO, Bortolin RH, Silbiger VN, Morais AHA. A high glycemic index pellet-diet induces metabolic disorders and increased adipose tissue PPAR γ expression in experimental model. *Annals of nutrition and metabolismo*. 2017;71:1229–1230.
90. Luz ABS, dos Santos Figueredo JB, Salviano BDPD, Aguiar AJFC, Pinheiro LGSD, Krause MFD, da Silva Camillo C, Ladd FVL, Bortolin RH, Silbiger VN, et al. Adipocytes and intestinal epithelium dysfunctions linking obesity to inflammation induced by high glycemic index pellet-diet in *Wistar* rats. *Biosci Rep*. 2018;38. doi: 10.1042/BSR20180304.
91. Vadivel V, Pugalenti M. Studies on the incorporation of velvet bean (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) as an alternative protein source in poultry feed and its effect on growth performance of broiler chickens. *Trop Anim Health Prod*. 2010;42:1367–1376. doi: 10.1007/s11250-010-9594-2.
92. Lee MO. DETERMINATION OF THE SURFACE AREA OF THE WHITE RAT WITH ITS APPLICATION TO THE EXPRESSION OF METABOLIC RESULTS. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1929;89:24–33. doi: 10.1152/ajplegacy.1929.89.1.24.
93. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AAH, Cicogna AC, Novelli Filho JLVB. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41:111–119. doi: 10.1258/002367707779399518.
94. Mauer MM, Harris RBS, Bartness TJ. The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001;25:15–28. doi: 10.1016/S0149-7634(00)00047-6.
95. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and mice. *Metabolism*. 1995;44:645–651. doi: 10.1016/0026-0495(95)90123-X.

96. Santos CF dos. Agonistas PPAR (Rosiglitazona, Bezafibrato e Fenofibrato) e alterações bioquímicas e estruturais em órgãos-alvo de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica rica em sacarose / PPAR agonists (Rosiglitazone, Bezafibrate and Fenofibrate) and biochemical and structural alterations in organs target of C57BL/6 mice fed high-fat high sucrose chow. [Rio de Janeiro]: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2010.
97. Stunkard AJ, Wadden TA. Obesity: theory and therapy . 2nd ed. New York (USA): Raven Press; 1993.
98. Macrini DJ. Obesidade e reprodução: efeitos da privação alimentar materna na prole de ratos machos. [São Paulo]: Universidade Paulista; 2014.
99. de Queiroz KB, Coimbra RS, Ferreira AR, Carneiro CM, Paiva NCN, Costa DC, Evangelista EA, Guerra-Sá R. Molecular mechanism driving retroperitoneal adipocyte hypertrophy and hyperplasia in response to a high-sugar diet. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58:2331–2341. doi: 10.1002/mnfr.201400241.
100. Kumar S, Alagawadi KR. Anti-obesity effects of galangin, a pancreatic lipase inhibitor in cafeteria diet fed female rats. *Pharm Biol*. 2013;51:607–613. doi: 10.3109/13880209.2012.757327.
101. Zhu L, Chen X, Chong L, Kong L, Wen S, Zhang H, Zhang W, Li C. Adiponectin alleviates exacerbation of airway inflammation and oxidative stress in obesity-related asthma mice partly through AMPK signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2019;67:396–407. doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.030.
102. Williams DW, Lee C, Kim T, Yagita H, Wu H, Park S, Yang P, Liu H, Shi S, Shin K-H, et al. Impaired Bone Resorption and Woven Bone Formation Are Associated with Development of Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions by Bisphosphonate and Anti-Receptor Activator of NF-κB Ligand Antibody in Mice. *Am J Pathol*. 2014;184:3084–3093. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.010.

103. Martelli SJR, Damian MF, Gomes APN, Schinestsck AR, Silva AER, Vasconcelos ACU. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imaginological and histomorphometrical study *in vivo*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2017;46:632–636. doi: 10.1111/jop.12546.
104. Ministério da Saúde AN de SS. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. 2017.
105. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav*. 1976;17:461–471. doi: 10.1016/0031-9384(76)90109-8.
106. Pereira LO, Francischi RP de, Lancha Jr. AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2003;47:111–127. doi: 10.1590/S0004-27302003000200003.
107. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents*. *Obesity*. 2007;15:798–808. doi: 10.1038/oby.2007.608.
108. Meguid M. A surgical rat model of human roux-en- gastric bypass*1. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2004;8:621–630. doi: 10.1016/j.gassur.2004.02.003.
109. Masi LN, Martins AR, Crisma AR, do Amaral CL, Davanso MR, Serdan TDA, da Cunha de Sá RDC, Cruz MM, Alonso-Vale MIC, Torres RP, et al. Combination of a high-fat diet with sweetened condensed milk exacerbates inflammation and insulin resistance induced by each separately in mice. *Sci Rep*. 2017;7:3937. doi: 10.1038/s41598-017-04308-1.
110. Ferreira SRD, Pessoa RF, Figueiredo IAD, Lima JPM, de Moura TMCF, Bezerra CO, de Oliveira Martins AM, de Carvalho LM, Madruga MS, Cavalcante HC, et al. Functional and morphologic dysfunctions in the

- airways of rats submitted to an experimental model of obesity-exacerbated asthma. *Sci Rep.* 2022;12:9540. doi: 10.1038/s41598-022-13551-0.
111. Rothwell NJ, Stock MJ. Regulation of energy balance. *Annu Rev Nutr.* 1981;1:235–256.
 112. Brazilian Diabetes Society. *Princípios para Orientação Nutricional no Diabetes Mellitus.* 2019.
 113. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AAH, Cicogna AC, Novelli Filho JLVB. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41:111–119. doi: 10.1258/002367707779399518.
 114. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between “lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology.* 1968;40:527–528. doi: 10.1677/joe.0.0400527.
 115. Prentice AM, Jebb SA. Beyond body mass index. *Obesity Reviews.* 2001;2:141–147. doi: 10.1046/j.1467-789x.2001.00031.x.
 116. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, Kauter K, Sernia C, Campbell F, Ward L, et al. High-carbohydrate High-fat Diet–induced Metabolic Syndrome and Cardiovascular Remodeling in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57:51–64. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181feb90a.
 117. Freedman DS, Rimm AA. The relation of body fat distribution, as assessed by six girth measurements, to diabetes mellitus in women. *Am J Public Health.* 1989;79:715–720. doi: 10.2105/AJPH.79.6.715.
 118. Pham DD, Ku B, Shin C, Cho NH, Cha S, Kim JY. Thoracic-to-hip circumference ratio as a novel marker of type 2 diabetes, independent of body mass index and waist-to-hip ratio, in Korean adults. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;104:273–280. doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.022.
 119. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, et al. Obesity and the risk of

- myocardial infarction in 27 000 participants from 52 countries: a case-control study. *The Lancet*. 2005;366:1640–1649. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67663-5.
120. Gadde KM, Martin CK, Berthoud H-R, Heymsfield SB. Obesity: Pathophysiology and Management. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:69–84. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.011.
 121. Lee DH, Keum N, Hu FB, Orav EJ, Rimm EB, Willett WC, Giovannucci EL. Comparison of the association of predicted fat mass, body mass index, and other obesity indicators with type 2 diabetes risk: two large prospective studies in US men and women. *Eur J Epidemiol*. 2018;33:1113–1123. doi: 10.1007/s10654-018-0433-5.
 122. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, Silveira AK, Rabelo TK, Gelain DP, Moreira JCF. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes*. 2018;42:525–534. doi: 10.1038/ijo.2017.225.
 123. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases*. 2010;28:155–161. doi: 10.1159/000282080.
 124. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51:1961–1971. doi: 10.1002/hep.23535.
 125. Buchignani VC, Germano EJ, dos Santos LM, Gulinelli JL, Ishikiriama BLC, Orcini WA, Rivera LML, Santos PL. Effect of low-level laser therapy and zoledronic acid on bone repair process. *Lasers Med Sci*. 2019;34:1081–1088. doi: 10.1007/s10103-019-02810-8.

126. Oliveira MA de, Martins FM e, Asahi DA, Santos PS da S, Gallottini MHC. Osteonecrose induzida por bisfosfonatos: relato de caso clínico e protocolo de atendimento. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa São Paulo*. 2014;
127. Augustin LSA, Kendall CWC, Jenkins DJA, Willett WC, Astrup A, Barclay AW, Björck I, Brand-Miller JC, Brighenti F, Buyken AE, et al. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2015;25:795–815. doi: 10.1016/j.numecd.2015.05.005.
128. Bulló M, García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Systemic Inflammation, Adipose Tissue Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression. *Obes Res*. 2003;11:525–531. doi: 10.1038/oby.2003.74.
129. Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW. C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:972–978. doi: 10.1161/01.ATV.19.4.972.
130. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*. 2004;92:347–355. doi: 10.1079/BJN20041213.
131. Alsalih A, Dam A, Lindberg P, Truedsson A. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws Initiated by Zoledronic Acid and Potential Pathophysiology. *Dent J (Basel)*. 2021;9:85. doi: 10.3390/dj9080085.
132. Shapses SA, Pop LC, Wang Y. Obesity is a concern for bone health with aging. *Nutrition Research*. 2017;39:1–13. doi: 10.1016/j.nutres.2016.12.010.
133. Prado WL do, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2009;15:378–383. doi: 10.1590/S1517-86922009000600012.

134. Lee ECY, Zhan P, Schallhom R, Packman K, Tenniswood M. Antiandrogen-induced cell death in LNCaP human prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 2003;10:761–771. doi: 10.1038/sj.cdd.4401228.
135. Yellon RF, Leonard G, Marucha PT, Craven R, Carpenter RJ, Lehmann WB, Burleson JA, Kreutzer DL. Characterization of Cytokines Present in Middle Ear Effusions. *Laryngoscope.* 1991;101:165–169. doi: 10.1288/00005537-199102000-00011.
136. Goldring SR. Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? *J Rheumatol Suppl.* 2002;65:44–48. Cited: in: : PMID: 12236623.
137. Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl.* 2002;65:3–9. Cited: in: : PMID: 12236620.
138. Cheung W-Y, Liu C, Tonelli-Zasarsky RML, Simmons CA, You L. Osteocyte apoptosis is mechanically regulated and induces angiogenesis in vitro. *Journal of Orthopaedic Research.* 2011;29:523–530. doi: 10.1002/jor.21283.
139. Paula-Silva FWG, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. TNF- α Promotes an Odontoblastic Phenotype in Dental Pulp Cells. *J Dent Res.* 2009;88:339–344. doi: 10.1177/0022034509334070.
140. Cviki B, Agis H, Stögerer K, Moritz A, Watzek G, Gruber R. The response of dental pulp-derived cells to zoledronate depends on the experimental model. *Int Endod J.* 2011;44:33–40. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01792.x.
141. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl JA, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *The Lancet.* 1994;344:1105–1110. doi: 10.1016/S0140-6736(94)90628-9.
142. Lappin DF, Macleod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue.

Clin Exp Immunol. 2001;123:294–300. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01448.x.

143. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 1998;160:403–409. Cited: in: : PMID: 9551997.
144. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl JA, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *The Lancet.* 1994;344:1105–1110. doi: 10.1016/S0140-6736(94)90628-9.
145. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;112:1796–1808. doi: 10.1172/JCI19246.
146. Jellema A, Plat J, Mensink RP. Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:766–773. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01414.x.
147. Yudkin JS, Eringa E, Stehouwer C DA. “Vasocrine” signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *The Lancet.* 2005;365:1817–1820. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66585-3.
148. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science (1979).* 1993;259:87–91. doi: 10.1126/science.7678183.
149. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2001;60:349–356. doi: 10.1079/PNS2001110.
150. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:561–566. doi: 10.1097/00041433-200312000-00003.

151. Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Wehrwein G, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Wrede C, Buechler C. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2006;79:803–808. doi: 10.1189/jlb.0905521.
152. Karsenty G, Oury F. The Central Regulation of Bone Mass, The First Link between Bone Remodeling and Energy Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:4795–4801. doi: 10.1210/jc.2010-1030.
153. de Paula FJA, Horowitz MC, Rosen CJ. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26:622–630. doi: 10.1002/dmrr.1135.
154. Zhao B, Chen Y-G. Regulation of TGF- β Signal Transduction. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:874065. doi: 10.1155/2014/874065. Cited: in: : PMID: 25332839.
155. Yadin D, Knaus P, Mueller TD. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;27:13–34. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.005.
156. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature.* 1994;370:341–347. doi: 10.1038/370341a0.
157. Chaikuad A, Bullock AN. Structural Basis of Intracellular TGF- β Signaling: Receptors and Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8:a022111. doi: 10.1101/cshperspect.a022111.
158. Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med.* 1994;180:1587–1590. doi: 10.1084/jem.180.5.1587. Cited: in: : PMID: 7964446.
159. Komatsu Y, Ibi M, Chosa N, Kyakumoto S, Kamo M, Shibata T, Sugiyama Y, Ishisaki A. Zoledronic acid suppresses transforming growth factor- β -induced fibrogenesis by human gingival fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2016;38:139–147. doi: 10.3892/ijmm.2016.2582. Cited: in: : PMID: 27176567.

160. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009;144:667–676. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07504.x. Cited: in : PMID: 19036117.
161. De Colli M, Zara S, di Giacomo V, Patruno A, Marconi GD, Gallorini M, Zizzari VL, Tetè G, Cataldi A. Nitric oxide-mediated cytotoxic effect induced by zoledronic acid treatment on human gingival fibroblasts. *Clin Oral Investig.* 2015;19:1269–1277. doi: 10.1007/s00784-014-1344-9. Cited: in : PMID: 25352469.
162. Wimalawansa SJ. Nitric oxide and bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:391–403. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05230.x. Cited: in : PMID: 20392265.
163. Endele R, Loew H, Bauss F. Analytical methods for the quantification of ibandronate in body fluids and bone. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39:246–256. doi: 10.1016/j.jpba.2005.03.020.
164. Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, Korhan-Oral C. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16:e879-83. doi: 10.4317/medoral.17150. Cited: in : PMID: 21743422.
165. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck.* 2011;33:199–207. doi: 10.1002/hed.21422. Cited: in : PMID: 20848442.
166. Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, Elsalanty M, Stevens MR, Borke JL. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol.* 2012;38 Spec No:511–518. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-11-00057. Cited: in : PMID: 21905888.

167. Basso FG, Silveira Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Zoledronic Acid Inhibits Human Osteoblast Activities. *Gerontology*. 2013;59:534–541. doi: 10.1159/000351194.
168. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106:5–13. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.03.036. Cited: in : PMID: 18504149.
169. Muratsu D, Yoshiga D, Taketomi T, Onimura T, Seki Y, Matsumoto A, Nakamura S. Zoledronic Acid Enhances Lipopolysaccharide-Stimulated Proinflammatory Reactions through Controlled Expression of SOCS1 in Macrophages. *PLoS One*. 2013;8:e67906. doi: 10.1371/journal.pone.0067906.
170. Norton JT, Hayashi T, Crain B, Cho JS, Miller LS, Corr M, Carson DA. Cutting edge: nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. *J Immunol*. 2012;188:2977–2980. doi: 10.4049/jimmunol.1100830. Cited: in : PMID: 22387558.
171. Rossini M, Adami S, Viapiana O, Fracassi E, Ortolani R, Vella A, Zanotti R, Tripi G, Idolazzi L, Gatti D. Long-term effects of amino-bisphosphonates on circulating $\gamma\delta$ T cells. *Calcif Tissue Int*. 2012;91:395–399. doi: 10.1007/s00223-012-9647-9. Cited: in : PMID: 23052225.
172. Welton JL, Morgan MP, Martí S, Stone MD, Moser B, Sewell AK, Turton J, Eberl M. Monocytes and $\gamma\delta$ T cells control the acute-phase response to intravenous zoledronate: Insights from a phase IV safety trial. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013;28:464–471. doi: 10.1002/jbmr.1797.

ANEXOS

Anexo 01 – Certidão de aprovação do CEUA.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE POR BIFOSFONATOS", protocolada sob o CEUA nº 8738120220 (ID 000991), sob a responsabilidade de **Ricardo Dias de Castro e equipe; Wilson José de Miranda Lima; Adriano Francisco Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 24/04/2020.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF OBESITY ON DEVELOPMENT OF BIOPHOSPHONATE OSTEONECROSIS", utilizing 32 Heterogenics rats (32 females), protocol number CEUA 8738120220 (ID 000991), under the responsibility of **Ricardo Dias de Castro and team; Wilson José de Miranda Lima; Adriano Francisco Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 04/24/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2020 a 06/2022**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Área: **Morfologia**

sexo: **Fêmeas**

idade: **30 a 40 dias N:32**

Peso: **180 a 200 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) e no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC).

João Pessoa, 09 de março de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivía Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 02 – Aprovação pela CEUA de retificação realizada no projeto.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



João Pessoa, 09 de março de 2022
CEUA N 8738120220

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Ricardo Dias De Castro

Área: Morfologia

Título da proposta: "INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE POR BIFOSFONATOS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFPB (ID 000661)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Notificação (versão de 13/dezembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto trata-se do desenvolvimento de osteonecrose em RATAS, no entanto, a unidade de produção animal IPEFARM passa por algumas dificuldades com as instalações e infra-estrutura. Inicialmente o projeto foi aprovado com o uso de ratas, no entanto, existem ratos disponíveis para o uso em tempo mais hábil que a obtenção das ratas. Pelo fato de não ter mudanças metodológicas quanto a mudança de sexo dos animais, solicito a mudança de sexo de ratas para ratos.".

Comentário da CEUA: "Sou de parecer favorável a mudança do sexo dos animais no projeto, uma vez que isso não implica em alterações metodológicas ou éticas. A Comissão".

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 03 – Comprovante de aceite do primeiro artigo

Journal of Applied Oral Science

Preview

From: wang.linda@uol.com.br

limawjm@hotmail.com, jannersoncesar@hotmail.com, ludmila.figueiredo@hotmail.com,
To: rubens.araujo@luf.ufrpb.br, maria.paiva@academico.ufrpb.br, rcastro@ccs.ufrpb.br, aquinojailane@gmail.com,
adrianofalves@gmail.com

CC:

Subject: Journal of Applied Oral Science - Decision on Manuscript ID JAOS-2023-0133.R2

Body: 14-Aug-2023

Dear Dr. ALVES,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "OBESITY INFLUENCES THE DEVELOPMENT OF BISPHOSPHONATE-INDUCED OSTEONECROSIS IN WISTAR RATS" in its current form for publication in the Journal of Applied Oral Science. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Applied Oral Science, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Linda Wang
Editor-in-Chief, Journal of Applied Oral Science
wang.linda@uol.com.br

Facebook: <http://www.facebook.com/JournalJAOS>
Instagram: <http://www.instagram.com/journaljaos>
Twitter: <http://www.twitter.com/JournalJAOS>

Associate Editor
Comments to the Author:

Authors,
The study has relevance for clinical practice. The review process was handled carefully by the team.

Entire Scoresheet:

Date Sent: 14-Aug-2023

Anexo 04 – Comprovante de submissão do segundo artigo

[SP] Agradecimento pela submissão

Carlos Alexandre Borges Garcia via Revista SCIENTIA PLENA <pen-bounces@emnuvens.com.br>

Ter, 01/08/2023 23:02

Para: Wilson Lima <limawjm@hotmail.com>

Prezado(a) Wilson Lima,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos" para a revista Scientia Plena. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso da avaliação do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema disponível em:

URL do Manuscrito: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/authorDashboard/submission/7412>

Login: limawjm

Em caso de dúvidas, entre em contato através da página de submissão na revista ("Discussão da pré avaliação" ou "Discussão da avaliação"). Pedimos a atenção em acompanhar a comunicação entre editor-autor via email, checando regularmente o *spam*. Informamos que a submissão será analisada previamente no atendimento ao foco e escopo da revista, pelo sistema antiplágio CrossCheck e na adequação às normas disponibilizadas em www.scientiaplena.org.br/sp/about/submissions#onlineSubmissions, podendo ser arquivada em caso de inadequação/não atendimento.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Scientia Plena

Scientia Plena <http://www.scientiaplena.org.br/ojs/index.php/sp>

[unsubscribe](#)

Anexo 05 – Comprovante de submissão do terceiro artigo

14/08/2023, 15:57

ScholarOne Manuscripts

 **Brazilian Dental Journal**

 [Home](#)

 [Author](#)

Submission Confirmation

 [Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Brazilian Dental Journal

Manuscript ID

BDJ-2023-5685

Title

OSTEONECROSIS MODULATES TYPE I COLLAGEN DEPOSITION IN OBESE RATS VIA TGF-BETA

Authors

Lima, Wilson José

Pontes, Jannerson

Araújo, Rubens

dos Santos, Ana Betriz

Sousa, Maria Carolina

Alves, Adriano

Date Submitted

14-Aug-2023

© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2023. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

 [@Clarivate for Academia & Government](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#) | [Definições de cookies](#) 