

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

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM *Lactiplantibacillus plantarum*
6.2 NO DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL EM
RATOS**

RAYNE TAVEIRA ROCHA DO NASCIMENTO

SAPIENTIA AEDIFICAT

RAYNE TAVEIRA ROCHA DO NASCIMENTO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM *Lactiplantibacillus plantarum*
6.2 NO DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL EM
RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Francisco Alves
Co-orientador: Prof. Dr. Wallace Felipe Blohem
Pessoa

João Pessoa

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244i Nascimento, Rayne Taveira Rocha do.
Influência da suplementação oral com
lactiplantibacillus plantarum 6.2 no desenvolvimento da
osteonecrose experimental em ratos / Rayne Taveira
Rocha do Nascimento. - João Pessoa, 2024.
83 f. : il.

Orientação: Adriano Francisco Alves.
Coorientação: Wallace Felipe Blohen Pessoa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Osteonecrose. 2. Bifosfonatos. 3. Lactobacillus
plantarum. 4. Probióticos. 5. Patologia bucal. I.
Alves, Adriano Francisco. II. Pessoa, Wallace Felipe
Blohen. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314(043)



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



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
(DOCUMENTO ANEXO – 2)

João Pessoa, 29 de julho de 2024.

CANDIDATO: RAYNE TAVEIRA ROCHA DO NASCIMENTO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 NO DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL EM RATOS

1º EXAMINADOR: Prof. Dr. PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

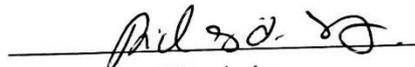
Parecer: Aprovado () Insuficiente () Reprovado



1º Examinador

2º EXAMINADOR: Prof. Dr. RICARDO DIAS DE CASTRO

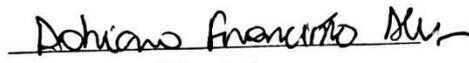
Parecer: Aprovado () Insuficiente () Reprovado



2º Examinador

3º EXAMINADOR: Prof. Dr. ADRIANO FRANCISCO ALVES

Parecer: Aprovado () Insuficiente () Reprovado



3º Examinador

RAYNE TAVEIRA ROCHA DO NASCIMENTO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM *Lactiplantibacillus plantarum*
6.2 NO DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL EM
RATOS**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Adriano Francisco Alves
(presidente – PPGO/UFPB)

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
(examinador – PPGO/UFPB)

Prof. Dr. Pedro Paulo de Andrade Santos
(examinador – PPGCO/UFRN)

Aos amores que me deram a vida: Zezinho e Railda
e ao amor que a vida me deu: João

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, por nunca ter me abandonado nos dias mais difíceis e, mesmo sem entender, no fim tudo é perfeito conforme a Tua vontade e misericórdia.

À professora Railda, por ser minha maior fonte de inspiração pessoal e profissional. Mainha, a senhora é a razão de tudo isso!

Ao meu Painho, meu malvado favorito, por ser um exemplo de pai e, mesmo com tanto cuidado, por ter me deixado alçar voos em busca dos meus sonhos sem faltar amor.

Ao meu orgulhinho, João, por acreditar em mim mesmo nos momentos em que duvidei. Meu melhor amigo e confidente, tenho muita sorte de ser sua irmã.

Ao meu companheiro, Lucas, que me protegeu nessa caminhada e se tornou minha família. Tudo foi muito mais leve com você.

À minha cunhada, Lara, por todas as nossas conversas de admiração uma pela outra, que nos fazem lembrar quem realmente somos.

Ao meu professor de graduação Luan Everton Galdino Barnabé, por ter me dado a orientação e a coragem para enfrentar esse novo desafio na minha vida.

Aos amigos que fiz em João Pessoa: Karol, Thacylla, Gicele, Kiko, Caio e tio Roni por todo o incentivo e pela paciência nos meus momentos de ausência.

Aos meus amigos do LABIPEX: Rubens, Jannerson, Marlon, Giovanna, Bia, Letícia, Caio, João, Mayara e todos os outros que de alguma forma, física ou emocional, participaram do desenvolvimento desse trabalho e do meu crescimento profissional, pessoal e espiritual. Obrigada por me receberem nesse novo mundo!

Ao professor Adriano Francisco Alves, por ter sido um orientador excepcional e por ter me acolhido com tanto carinho no momento em que mais precisei. Serei eternamente grata.

Ao professor Wallace Felipe Blohem, que exerceu a coorientação desse trabalho com tanto cuidado e me fez despertar para o mundo da Microbiologia.

À professora Luciene Simões de Assis Tafuri, que se tornou, para mim, uma figura materna pelo seu jeito doce e admirável de amar a educação.

Aos professores Ricardo Castro, Márcia Piuvezam, Carlúcia Ithamar e Pedro Paulo, por terem aceitado participar das minhas bancas de qualificação e defesa desse trabalho, dividindo comigo uma discussão essencial para o meu crescimento profissional.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e funcionários que me acolheram durante todo o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), na pessoa do meu coordenador Yuri Wanderley Cavalcante, por proporcionar para todos nós pós-graduandos uma formação de excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que acreditou e subsidiou este trabalho.

“Suas palavras são divinas, Sua vida é divina e foi dito com razão, que existem equações morais assim como existem equações matemáticas.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

A Osteonecrose (ONE) é uma doença caracterizada pela morte das células de um segmento ósseo associada à perda de suprimento sanguíneo. Dentre os tipos de necroses ósseas, a de maior interesse para a prática clínica do Cirurgião-Dentista é a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos (OMRM), considerando sua localização nos ossos gnáticos e sua relação com infecções orais. Com a pretensão de avaliar a influência da suplementação oral com *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 (LP 6.2) em modelo murino de OMRM, foram utilizados 20 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com 8 a 10 semanas de idade, pesando aproximadamente 250g. Os animais foram distribuídos em grupos: BASAL (N=4) representando controle negativo; LAC (N=4) representando um grupo suplementado com LP 6.2; ONE, controle positivo (N=6) e ONE+LAC representando um grupo com indução da osteonecrose e suplementação do LP 6.2 (N=6). Durante 8 semanas a ONE foi induzida com 250µg/kg de Ácido Zoledrônico via intraperitoneal, sendo injetada solução salina 0,9% nos grupos BASAL e LAC. O fator desencadeante da ONE foi a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo realizada na quarta semana em todos os animais. Para suplementação com o LP 6.2, foi feito um ajuste de concentração das bactérias e posterior gavagem nos grupos LAC e ONE+LAC, sendo os grupos não suplementados submetidos igualmente ao mesmo estresse com solução salina. Os animais foram eutanasiados e tiveram suas mandíbulas dissecadas para observação macroscópica quanto à presença/ausência de osso exposto e reparo epitelial. Microscopicamente, para avaliação quantitativa, foram utilizados métodos histo-morfométricos exibindo resultados em área/µm² ou pixel/ µm². As análises histológicas em mandíbula foram quantificadas quanto à área de exposição óssea, viabilidade do tecido (área de osteócitos anucleados) e deposição de matriz extracelular (MEC). As análises imuno-histoquímicas para marcações em mandíbula foram quantificadas para NF-kB e TGF-β. Para intestino, foi realizada análise imuno-histoquímica para zônula de oclusão. Os dados da macroscopia e histomorfometria foram expressos por meio da análise de variância “one way” e pós-teste de Tukey, com nível de significância estatística de 5% (p<0.05) para estabelecer as diferenças encontradas entre os grupos. Nos grupos BASAL, LAC

e ONE +LAC constatou-se reparo parcial ou total da mucosa, menor área de exposição óssea e osteócitos preservados. A deposição de MEC foi mais evidente nos grupos suplementados com LP 6.2. A imunomarcação contra NF- κ B foi mais visualizada no grupo ONE com diferença estatística entre os demais; TGF- β esteve mais presente no grupo LAC, sendo o grupo ONE com menor marcação para tal. Em síntese: A suplementação com LP 6.2 no tratamento da ONMRM se mostrou eficaz para o reparo ósseo e epitelial e foi efetivo na redução da inflamação mediada pelo NF- κ B e no aumento de TGF- β nas lesões de osteonecrose mandibular.

Palavras-chave: Osteonecrose; Bifosfonatos; *Lactobacillus plantarum*; Probióticos; Patologia bucal.

ABSTRACT

Osteonecrosis (ON) is a disease characterized by the death of bone cells in a segment of bone associated with loss of blood supply. Among the types of bone necrosis, the most relevant for clinical practice of Dentists is Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ), given its location in the jawbones and its relation to oral infections. In order to evaluate the influence of oral supplementation with *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 (LP 6.2) in a murine model of MRONJ, 20 male rats of the species *Rattus norvegicus*, Wistar lineage, aged 8 to 10 weeks and weighing approximately 250g, were used. The animals were divided into groups: BASAL (N=4) representing negative control; LAC (N=4) representing a group supplemented with LP 6.2; ONE, positive control (N=6); and ONE+LAC representing a group with induction of osteonecrosis and supplementation with LP 6.2 (N=6). Over 8 weeks, osteonecrosis was induced with 250µg/kg of Zoledronic Acid via intraperitoneal injection, with 0.9% saline solution injected in the BASAL and LAC groups. Extraction of the left lower first molar in the fourth week was the trigger for osteonecrosis in all animals. For LP 6.2 supplementation, bacterial concentration was adjusted and administered via gavage to the LAC and ONE+LAC groups, while non-supplemented groups underwent the same stress with saline solution. The animals were euthanized, and their mandibles dissected for macroscopic examination of bone exposure and epithelial repair. Microscopically, histomorphometric methods were used for quantitative evaluation of photomicrographs, presenting results in area/µm² or pixel/µm². Histological analyses of the mandibles quantified bone exposure area, tissue viability (area of anucleated osteocytes), and extracellular matrix (ECM) deposition. Immunohistochemical analyses for NF-kB and TGF-β markers in the mandibles were quantified, and intestinal analysis included immunohistochemistry for tight junctions. Macroscopic and histomorphometric data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post-test, with statistical significance set at 5% (p<0.05) to determine differences between groups. The BASAL, LAC, and ONE+LAC groups showed partial or total mucosal repair, smaller areas of bone exposure, and preserved osteocytes. ECM deposition was more evident in the LP 6.2 supplemented groups. NF-kB immunostaining was more pronounced in the ONE group compared to others, with statistical significance, while TGF-β was more present in the LAC group, with the

ONE group showing the least staining. In summary, supplementation with LP 6.2 in the treatment of MRONJ proves effective for bone and epithelial repair, and was effective in reducing NF- κ B-mediated inflammation and increasing TGF- β in mandibular osteonecrosis lesions.

Keywords: Osteonecrosis; Biphosphonates; lactobacillus plantarum; Probiotics; Pathology, Oral.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAOMS - *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*
- AZ – Ácido Zoledrônico
- BAL – Bactérias Ácido-Láticas
- BF – Bifosfonatos
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos
- FPS – Farnesil Pirofosfato Sintetase
- HE – Hematoxilina e Eosina
- LP – *Lactiplantibacillus plantarum*
- LP 6.2 – *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2
- M-CSF – Fator Ativador de Colônia de macrófagos
- MEC – Matriz Extracelular
- NF-kB – Fator Nuclear Kappa B
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- ONE – Osteonecrose
- ONMB – Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Bifosfonato
- OMRM – Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos
- OPG – Osteoprotegerina
- PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato
- TGF- β – Fator de Crescimento Transformador Beta
- TO – Tecido Ósseo
- UFPB – Universidade Federal da Paraíba
- ZO – Zônula de Oclusão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Características estruturais macroscópicas do tecido ósseo	12
Figura 2.	Mecanismo de ação dos receptores transmembranares RANK e RANK-L para diferenciação dos osteoclastos	13
Figura 3.	Células que compõe o Tecido Ósseo	15
Figura 4.	Estrutura química do Pirofosfato e Bifosfonato	18
Figura 5.	Representação sumária do mecanismo de ação do Bifosfonato no osteoclasto	19
Figura 6.	Linha do tempo esquemática do experimento	25
Figura 7.	Primeiro Molar Inferior Esquerdo de um Rato Wistar sendo medido em régua milimetrada apresentando aproximadamente 5 milímetros totais incluindo coroa e raízes	26
Figura 8.	Esquematização do processo de transformação do <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> 6.2 em probiótico	27
Figura 9.	Esquema apresentando os procedimentos realizados no dia da eutanásia dos animais incluindo dissecação das mandíbulas, fotografia macroscópica das mandíbulas, retirada do intestino e fixação de todos os tecidos	29
Figura 10.	Esquematização da descalcificação e processamento da mandíbula	31
Figura 11.	Macroscopia representativa das mandíbulas dissecadas dos animais por grupo. Seta verde: região com tecido gengival revestindo a região alveolar. Seta vermelha: região de osso exposto. Grupos: BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC	34
Figura 12.	Análise morfométrica da área de exposição óssea em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando	35

dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey

- Figura 13.** Cortes histológicos representativos de mandíbulas coradas em hematoxilina e eosina, evidenciado o tecido conjuntivo seguido do epitélio de revestimento da mucosa da região de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Seta verde: revestimento epitelial intacto. Linha pontilhada vermelha: área microscópica de exposição óssea. Magnificação: 40x **37**
- Figura 14.** Análise histomorfométrica da área de exposição óssea em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com n de 10 marcações para cada grupo. Valor de P < 0.05 representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Dunnett’s considerando diferença significativa entre o grupo BASAL vs ONE **38**
- Figura 15.** **Figura 15.** Corte histológico de mandíbulas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), evidenciando o tecido ósseo. BASAL; LAC; ONE; ONE + LAC Seta amarela: osteócito nucleado. Seta vermelha: osteócito anucleado. Magnificação: 200x **40**
- Figura 16.** Análise histomorfométrica da área de osteonecrose nas diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com n de 5 animais para cada grupo. Valor de P < 0.05 representando dados estatisticamente significantes, para o grupo ONE em relação aos demais modelos experimentais. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey **41**
- Figura 17.** Cortes histológicos representativos de mandíbulas coradas em Tricrômico de Masson, evidenciado o tecido conjuntivo. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Seta verde: matriz extracelular com

	<p>fibras de aspecto homogêneo e distribuição difusa. Seta vermelha: matriz extracelular com fibras de aspecto heterogêneo e de distribuição focal. Magnificação: 200x</p>	43
Figura 18.	<p>Análise morfométrica da área de deposição de matriz extracelular em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 marcações para cada grupo. Valor de P < 0.05 representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey</p>	44
Figura 19.	<p>Corte histológico de mandíbulas em reação imuno-histoquímica contra NF-kB contra coradas em Hematoxilina. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC</p>	46
Figura 20.	<p>Análise histomorfométrica das áreas de marcações marrom acastanhadas positivas para NF-kb em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de P < 0.05 representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey</p>	47
Figura 21.	<p>Corte histológico de mandíbulas em reação imuno-histoquímica contra TGF- β contra coradas em Hematoxilina. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Seta amarela: marcação positiva para o TGF-beta no Tecido ósseo. Magnificação: 200x.....</p>	49
Figura 22.	<p>Análise histomorfométrica das áreas de marcações marrom acastanhadas positivas para TGF- β em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de P < 0.05 representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey</p>	50
Figura 23.	<p>Cortes histológicos do trato gastrointestinal em reação imuno-histoquímica contra Zônula de Oclusao contra coradas em Hematoxilina. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Cabeça de seta</p>	

amarela: marcação positiva para o ZO nos enterócitos do epitélio de revestimento do trato gastrointestinal. Magnificação: 200x 52

Figura 24. Análise histomorfométrica das áreas de marcações marrom acastanhadas positivas para Zônula de Oclusão em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey 53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Estratégias de tratamento de acordo com o estadiamento da ONMRM	16
Quadro 2.	Distribuição dos grupos da pesquisa	24
Quadro 3.	Corantes histoquímicos utilizados e suas principais aplicações	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. Tecido Ósseo.....	22
2.1.1. Aspectos gerais do tecido ósseo.....	22
2.1.2. Histologia e imunologia do tecido ósseo	22
2.2. Osteonecrose dos Maxilares Relacionadas a Medicamentos.....	25
2.3. Bifosfonatos	27
2.3.1. Classificações dos Bifosfonatos	28
2.3.2. Mecanismos de ação dos Bifosfonatos	29
2.4. Probióticos.....	31
2.4.1. Definição e fontes de isolamento.....	31
2.4.2. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> e atividade anti-inflamatória.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. Delineamento geral do estudo.....	34
4.2. Animais	34
4.2.1. Amostra.....	34
4.2.2. Grupos Experimentais	35
4.2.3. Indução experimental da osteonecrose.....	37
4.2.4. Suplementação	38
4.2.5. Eutanásia.....	39
4.2.6. Exame macroscópico dos animais.....	40
4.3. Dissecção.....	40
4.4. Processamento Histológico	41
4.4.1. Fixação dos tecidos.....	41
4.4.2. Descalcificação	41
4.5. Análise imuno-histoquímica.....	43
4.6. Análise histomorfométrica.....	44
4.7. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	45

5.1. Avaliação macroscópica	45
5.2. Avaliações histológica e histomorfométrica da área de exposição óssea.....	48
5.3. Avaliação histológica e histomorfométrica da viabilidade do tecido ósseo	51
5.4. Avaliações histológica e histomorfométrica da deposição de matriz extracelular	54
5.5. Avaliação imuno-histoquímica para NF-kB	56
5.6. Avaliação imuno-histoquímica para TGF-β	60
5.7. Avaliação imuno-histoquímica para Zônula de Oclusão (ZO)	63
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS	72
ANEXO 1: Certificado de aprovação CEUA.....	81
ANEXO 2: Resolução Normativa CONCEA.....	82

1. INTRODUÇÃO

A Osteonecrose (ONE) é uma doença caracterizada pela morte das células de um segmento ósseo associada à perda de suprimento sanguíneo (1). O processo fisiológico de remodelação óssea apresenta como principais células os osteoclastos e osteoblastos, responsáveis pela reabsorção e secreção da matriz óssea, respectivamente (2). Dentre as necroses ósseas, a de maior interesse para a prática clínica do Cirurgião-Dentista é a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos (ONMRM), considerando sua localização nos ossos gnáticos e sua relação com infecções orais (3, 4).

A ONMRM foi um termo estabelecido em 2007 pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (5, 6) e se trata de uma condição altamente debilitante e potencialmente grave (7). Essa doença tem despertado crescente preocupação entre profissionais de saúde e pesquisadores e se caracteriza pela morte de parte dos tecidos ósseos do complexo maxilo-mandibular, muitas vezes associada a infecções e feridas abertas que persistem na boca (dolorosas ou não) por mais de 8 semanas (8).

Considerando os problemas de saúde pública relacionados a infecções locais do sistema estomatognático que levam a intervenções cirúrgicas injuriosas como a exodontia associado as doenças ósseas sistêmicas, a ONMRM tem se tornado mais frequente e pode representar uma complicação séria em pacientes que utilizam medicamentos classificados como antirreabsortivos, principalmente os Bifosfonatos (BF) (9).

Os BF são substâncias sintéticas análogas ao Pirofosfato, molécula endógena que atua no processo de remodelamento ósseo, sendo ainda, uma classe de medicamentos amplamente utilizada no tratamento de doenças ósseas como osteoporose, doença de *Paget* e câncer metastático ósseo, porém, têm sido associados de forma significativa à Osteonecrose dos Maxilares (10). Estes agentes farmacológicos exercem efeitos inibitórios na reabsorção óssea, por apresentarem afinidade com os cristais de hidroxapatita, reduzindo a atividade dos osteoclastos e, conseqüentemente, diminuindo o processo de remodelação (11).

Os BF se dividem com base em sua estrutura química (presença de um grupo amino ligado à molécula) e potência: os não amino-bifosfonatos, como o

clodronato, por exemplo, são medicamentos de menor potência e efeito menos seletivo. Em contrapartida, os amino-bifosfonatos, entre os quais se destaca o Ácido Zoledrônico (AZ), se tratam de medicamentos de alta potência e seletividade geralmente utilizado para tratamentos de condições ósseas graves como a Hipercalemia Maligna (12).

O Ácido Zoledrônico é um potente bifosfonato de terceira geração e tem sido amplamente utilizado na prática clínica devido à sua eficácia na prevenção de fraturas ósseas. Pacientes oncológicos, os maiores consumidores de antirreabsortivos de alta potência, fazem parte de cerca de 90% dos casos de ONMRM, considerando um risco seu efeito acumulativo (13).

A potência do BF está associada à capacidade de inibir fortemente a atividade dos osteoclastos, conseqüentemente, resultando em uma significativa redução na reabsorção. O processo de inibição da ação dos osteoclastos ocorre por meio das vias de morte celular como a apoptose que é desencadeada nesse caso, pela interrupção da via mevalonato: um processo essencial para a sobrevivência e função dos osteoclastos (14).

Para realizar o bloqueio da via mevalonato, os BFs interferem na atividade da enzima farnesil pirofosfato sintetase, levando a um acúmulo de intermediários tóxicos na célula e, conseqüentemente, à apoptose. Esse mecanismo de ação contribui significativamente para a redução da reabsorção óssea e, conseqüentemente, para os efeitos até então benéficos dos BF. No entanto, o uso prolongado desses medicamentos antirreabsortivos pode desencadear o surgimento da ONMRM (15).

O mecanismo exato pelo qual o BF pode gerar uma necrose óssea ainda não é totalmente compreendido, porém, algumas teorias têm sido propostas, sendo a necrose por hipóxia a mais disseminada pois considera-se que ao inibir a atividade dos osteoclastos, é gerado um acúmulo de osso denso não remodelado comprometendo a angiogênese e, portanto, a circulação sanguínea (16, 17).

Apesar dos avanços no entendimento e no manejo da ONMRM, as opções terapêuticas para essa condição ainda são limitadas e visam reduzir a dor, infecção e progressão da ferida necrótica (18). Os tratamentos existentes podem incluir irrigações bucais com soluções antibacterianas, debridamento dos tecidos, terapias sistêmicas (como o uso de antibióticos e anti-inflamatórios) e até mesmo ressecção

cirúrgica com margem do osso em questão (19). Todavia, considera-se que a efetividade até então de algum protocolo não tem sido bem caracterizada muitas vezes desencadeando em sequelas irreduzíveis considerando os métodos paliativos e invasivos (20).

Diante disso, alguns meios de tratamento e prevenção não farmacológicos vem sendo propostos, como a utilização da Laserterapia ou da Fotobiomodulação (21, 22, 23) além da utilização de microrganismos.

Diversas bactérias com funções probióticas como o *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 (LP 6.2), os quais estudos já demonstram atividade anti-inflamatória (24) estão sendo exploradas em prol de novas estratégias terapêuticas para doenças de caráter inflamatório (25).

A extração da cepa bacteriana LP 6.2, ocorre durante a fermentação do cacau: as sementes de cacau são colocadas em caixas, onde ocorre a fermentação microbiana, fornecendo propriedades imunomoduladoras promissoras, mostrando potencial na redução da inflamação e cicatrização de feridas (26).

Dessa forma, contemplando a busca por investigar o papel do LP 6.2 no desenvolvimento da ONMRM, e a necessidade de levantar propostas terapêuticas e profiláticas minimamente invasivas, aspira-se: contribuir para o avanço do conhecimento sobre essa condição desafiadora em prol de corroborar o seu manejo e gestão clínica. A hipótese deste trabalho é que o LP 6.2 possui influência anti-inflamatória no curso da ONMRM em ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tecido Ósseo

2.1.1. Aspectos gerais do tecido ósseo

O tecido ósseo (TO) é um tecido conjuntivo de suporte que forma a maior parte do esqueleto dos vertebrados. Macroscopicamente, o TO apresenta diversas características distintas relacionadas à sua estrutura e função. Tais características variam dependendo de muitos fatores, como a idade do indivíduo, vascularização do osso e a presença de minerais (27, 28).

O osso pode ter um arranjo estrutural compacto ou esponjoso (27). O compacto, estando mais presente na mandíbula, por exemplo, se trata de um osso mais denso e rígido, com uma aparência lisa sem trabéculas em sua estrutura. Já o osso esponjoso, também conhecido como osso trabecular, como as maxilas, tem uma aparência mais porosa devido à presença de espaços interconectados preenchidos com medula óssea que possuem a função de distribuir e absorver as forças aplicadas sobre o osso e facilitar a troca de nutrientes e células entre a medula óssea e os vasos sanguíneos próximos (27, 29). Essas características podem ser visualizadas na **figura 1**.

A mandíbula e a maxila são os ossos mais importantes da face por desempenharem papéis cruciais no processo da mastigação e fala. Conseqüentemente, a remodelação desses ossos é rápida e contínua até o fim da vida humana tendo em vista a erupção dos dentes e os traumas oclusais constantes (30).

2.1.2. Histologia e imunologia do tecido ósseo

A nível celular, o tecido ósseo é formado essencialmente por quatro células que exercem importante função no seu metabolismo: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Além de células, o tecido ósseo também possui uma matriz. Essa matriz apresenta-se em 50% orgânica, contendo em quase sua totalidade colágeno do tipo I (95%), e 50% mineral, com a presença de íons fosfato e cálcio que formam os cristais de hidroxiapatita (31-32).

As células osteoprogenitoras são de origem mesenquimal encontradas no tecido conjuntivo e medula óssea. Sua principal função é dar origem aos osteoblastos: células responsáveis pela síntese e deposição da matriz óssea. Além

disso, são capazes de agir por recrutamento para locais de lesão óssea e contribuir para o processo de reparo (33).

Após a diferenciação das osteoprogenitoras em Osteoblastos, tanto fisiologicamente quanto em processos patológicos, a síntese e deposição de matriz óssea se fará presente. Os osteoblastos, secretando colágeno tipo I e outras proteínas da matriz, como osteocalcina e osteopontina são capazes de formar, finalmente, uma estrutura óssea tridimensional como visto macroscopicamente na figura 1 a seguir (33-34).

Figura 1. Características estruturais macroscópicas do tecido ósseo



Fonte: Elaboração própria.

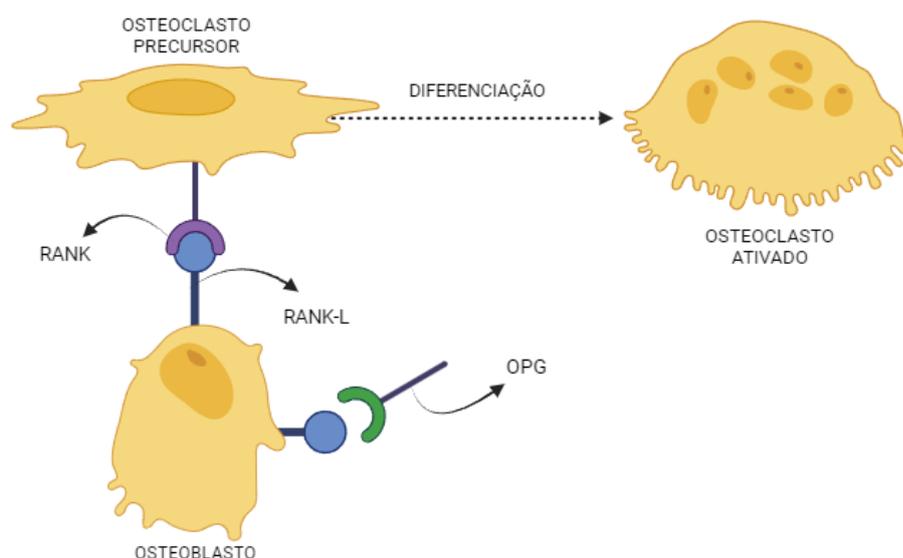
Além da sua ação na formação óssea, os osteoblastos desempenham um papel na regulação do metabolismo do cálcio e na manutenção da homeostase mineral (35). Isso acontece devido à sua função de secretar fatores de crescimento como: o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), importante no estímulo da deposição de matriz extracelular (MEC) e cicatrização; e o fator ativador de colônias de monócito/macrófago (M-CSF), capaz de induzir a diferenciação e atividade dos osteoclastos (36, 37).

Os osteoclastos, por sua vez, são células gigantes multinucleadas derivadas de precursores hematopoiéticos na medula óssea (38). Sua função fisiológica é de extrema importância para o metabolismo ósseo e visa reabsorver e

contribuir na remodelação do TO. Esse processo de reabsorção pelos osteoclastos ocorre por meio da secreção de enzimas como, por exemplo, a fosfatase ácida e a catepsina K. Tais enzimas quebram a matriz óssea produzidas pelos osteoblastos e reabsorvem os cristais de hidroxiapatita (39).

Na regulação do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, os osteoclastos maduros também respondem a sinais hormonais locais expressando o RANK, receptor ativador do fator nuclear κ -B (NF- κ B), e a osteoprotegerina (OPG) (40).

Figura 2. Mecanismo de ação dos receptores transmembranares RANK e RANK-L para diferenciação dos osteoclastos.



Fonte: Elaboração própria.

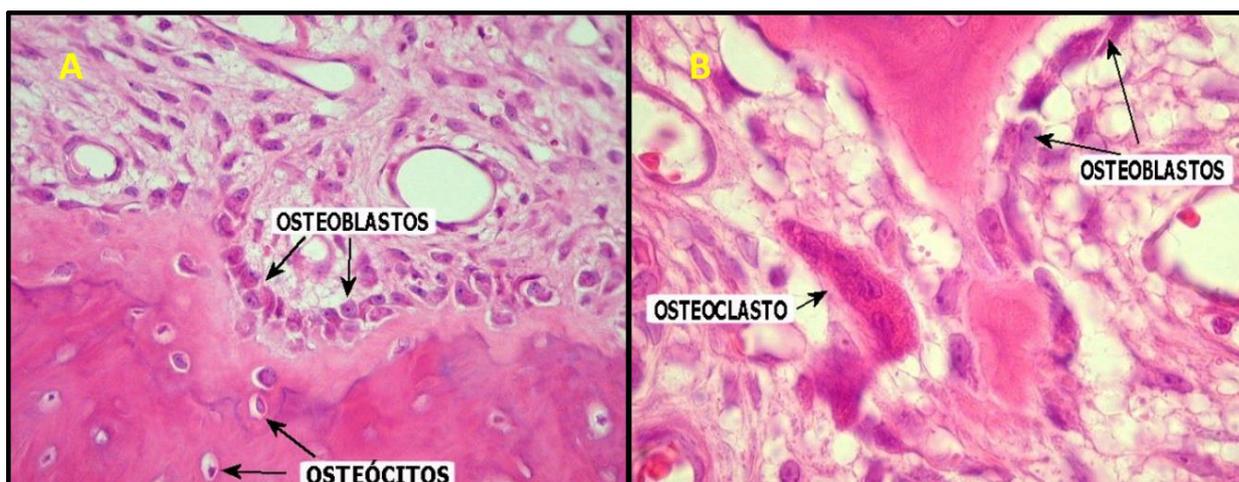
O receptor transmembranar RANK exerce a função de ligação com um receptor expresso pelos osteoblastos o RANK-L, esse ciclo tem a função de diferenciar as células precursoras de osteoclastos em novos osteoclastos gerando um tipo de comunicação necessária para substituir o osteoclasto maduro por um novo (41).

A OPG, por conseguinte, atua impedindo o processo de ligação entre o RANK e o RANK-L. Sua ação ocorre como um receptor isca, que compete com o RANK presente no osteoclasto precursor. Essa função é essencial para controlar o

processo de reabsorção em excesso atuando como um inibidor natural assim como esquematizado na **figura 2** (41, 42).

Os osteócitos, enfim, são células originadas de osteoblastos maduros aprisionados em lacunas da matriz óssea durante o processo de mineralização. Também desempenham ações importantes para homeostase, pois detectam e respondem a estímulos mecânicos e bioquímicos por meio da produção de fatores de sinalização, como o fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) (43). A **figura 3** apresenta fotomicrografias de lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) onde é possível visualizar as principais células que compõe o TO.

Figura 3. Células que compõe o TO.



Fonte: ANAPAT.UNICAMP. Acesso em: março de 2024.

2.2. Osteonecrose dos Maxilares Relacionadas a Medicamentos

A AAOMS (*American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*), atualmente, define a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos como uma condição na qual ocorre necrose óssea da mandíbula ou maxila com lesão exposta por mais de 8 semanas, em pacientes que tenham feito tratamentos com medicamentos antirreabsortivos sem histórico de radiação prévia na região (6).

Além do risco do uso sistêmico desses medicamentos, alguns fatores de risco locais potencializam o desenvolvimento da ONMRM como procedimentos

odontológicos invasivos, presença de inflamações e infecções no sistema estomatognático (44).

Os primeiros relatos de ONMRM surgiram em uma publicação descrita por Marx em 2003. Inicialmente, a condição foi observada em 36 pacientes que receberam doses elevadas de BF intravenosos para tratar cânceres ósseos metastáticos. As lesões de osteonecrose começaram a surgir tanto espontaneamente, quanto após cirurgias odontológicas de exodontia (45).

À medida que mais casos de ONMRM foram relatados considerando o aumento da indicação de uso para tratamento de outras doenças ósseas como a osteoporose, foi possível identificar fatores de risco potenciais, incluindo o uso prolongado de BF ou outros antirreabsortivos, vias de administração, procedimentos dentários invasivos como exodontia, e má higiene bucal (44, 45).

Além dos BF, medicamentos mais frequentemente associados à ONMRM, outros antirreabsortivos são capazes de aumentar o risco dessa condição dentre eles, o Desosumabe. Esse medicamento se trata de um tipo de anticorpo monoclonal que atua inibindo o RANK-L expresso pelo osteoblasto (46, 47, 48).

Com base nas evidências disponíveis, organizações médicas como a *Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology* (MASCC/ ISOO) desenvolveram diretrizes clínicas para o manejo, tratamento e prevenção da ONMRM (quadro 1). Essas incluem recomendações para avaliação de risco, monitoramento e manejo de pacientes expostos a medicamentos associados à condição (49):

Quadro 1: Estratégias de tratamento de acordo com o estadiamento da ONMRM

ESTADIAMENTO	ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO
Em risco: Pacientes tratados com antirreabsortivos orais ou intravenosos sem osso necrótico aparente	<ul style="list-style-type: none"> - Nenhum tratamento indicado - Orientação e redução de fatores de risco modificáveis
Risco aumentado: Achados clínicos inespecíficos; alterações radiográficas e sintomas sem osso necrótico aparente	<ul style="list-style-type: none"> - Orientação e redução de fatores de risco modificáveis - Tratamento sintomático com analgésicos

	<ul style="list-style-type: none"> - Acompanhamento do dentista a cada 8 semanas com comunicação com o oncologista sobre o status da lesão
Estágio 1: Osso exposto necrótico com paciente assintomático sem presença de infecção	<ul style="list-style-type: none"> - Enxaguante oral antibacteriano - Acompanhamento do dentista a cada 8 semanas com comunicação com o oncologista sobre o status da lesão - - Orientação e redução de fatores de risco modificáveis
Estágio 2: Osso exposto necrótico com dor e presença de infecção podendo existir drenagem purulenta	<ul style="list-style-type: none"> - Antibioticoterapia - Debridamento do tecido - Enxaguante oral antibacteriano - Acompanhamento do dentista a cada 8 semanas com comunicação com o oncologista sobre o status da lesão - - Orientação e redução de fatores de risco modificáveis
Estágio 3: Osso exposto e necrótico ou fístula que sonda o osso em pacientes com dor, infecção e um ou mais dos seguintes: - Osso exposto e necrótico estendendo-se além da região do osso alveolar (ou seja, borda inferior e ramo na mandíbula maxilar seio maxilar e região zigomática) resultando em fratura patológica, fístula extraoral, comunicação oro- antral ou oro-nasal ou osteólise que se estende até a borda inferior da mandíbula ou assoalho do seio maxilar	<ul style="list-style-type: none"> Antibioticoterapia - Debridamento do tecido - Ressecção cirúrgica - Enxaguante oral antibacteriano - Acompanhamento do dentista a cada 8 semanas com comunicação com o oncologista sobre o status da lesão - Orientação e redução de fatores de risco modificáveis

Fonte: Traduzido e adaptado de Yaron *et al.*, 2019

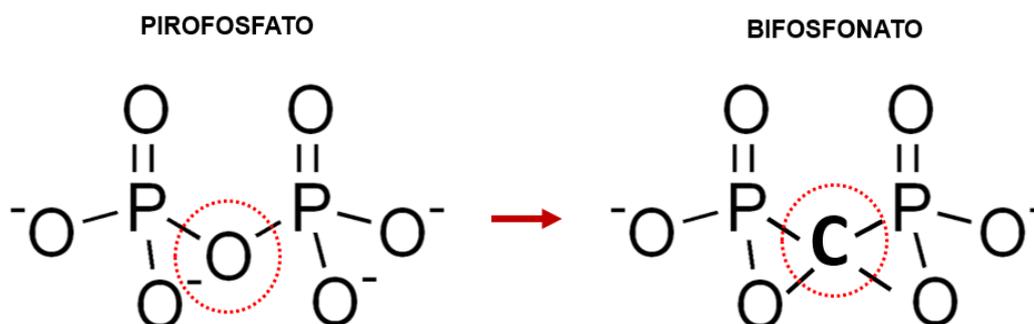
2.3. Bifosfonatos

Os Bifosfonatos são uma classe de medicamentos utilizados no tratamento de distúrbios ósseos, como osteoporose e câncer ósseo metastático. Se tratam de

compostos químicos análogos ao Pirofosfato, íon natural que atua diretamente nos processos de mineralização óssea (10) (figura 4).

Assim como o Pirofosfato, os BFs são capazes de inibir a formação dos cristais de hidroxiapatita presentes no tecido ósseo (50). Em situação de desequilíbrio, o pirofosfato sofre hidrólise por enzimas presentes, em sua maioria, na mucosa gastrointestinal dentre elas a Pirofosfatase e a Adenilato quinase (12). Nesse contexto, a ação exagerada dessas enzimas é capaz de desencadear distúrbios ósseos de difícil tratamento dessa forma, na intenção de substituir a deficiência patológica do pirofosfato, e apresentar maior resistência a degradação, os BFs são utilizados para aumentar a densidade óssea, minimizando as sequelas associadas (10-12).

Figura 4. Estrutura química do Pirofosfato e Bifosfonato



Fonte: Elaboração própria.

2.3.1. Classificações dos Bifosfonatos

A classificação dos bifosfonatos é específica e se divide em duas principais categorias com base em sua estrutura química e mecanismo de ação: nitrogenados como o ácido zoledrônico os quais possuem um grupo amino em sua estrutura, o que lhes confere uma maior potência de inibição dos osteoclastos e os não nitrogenados como etidronato e clodronato, esses têm uma potência de inibição dos osteoclastos mais fraca e não apresentam o grupo amino em sua composição (51).

Os BFs também se dividem em gerações baseadas em características individuais. As principais diferenças entre elas incluem potência de inibição dos osteoclastos, via de administração e suas indicações clínicas (52):

Primeira Geração: Incluem etidronato e clodronato, possuem baixa potência de inibição dos osteoclastos e são frequentemente utilizados no tratamento de doenças ósseas menos graves, como a doença de Paget. Via de administração oral;

Segunda Geração: incluem alendronato e risedronato. Amplamente prescritos para o tratamento da osteoporose e têm uma potência de inibição dos osteoclastos maior do que os da primeira geração. Via de administração oral.

Terceira Geração: incluem o AZ. Amplamente prescritos em tratamentos de câncer ósseo metastático e têm potência ainda maior de inibição dos osteoclastos do que qualquer outra geração. Via de administração intravenosa (52).

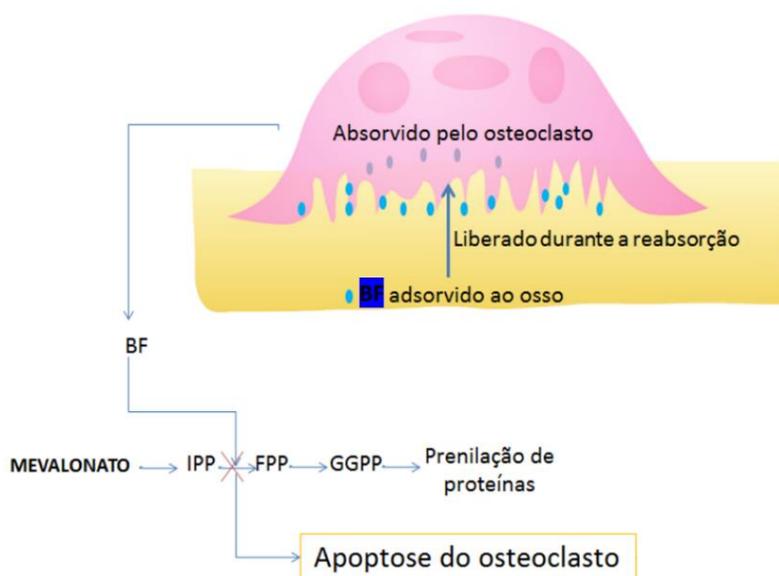
2.3.2. Mecanismos de ação dos Bifosfonatos

Existem diversos mecanismos de ação propostos dos bifosfonatos. Dentre eles, a Inibição da enzima Farnesil Pirofosfato Sintetase (FPPS) é a mais descrita. A ação dos BF ocorre por interferência na via do mevalonato ao se ligarem à enzima FPPS, que é essencial para a produção de isoprenoides como o pirofosfato (53) (**figura 5**).

Considerando que o pirofosfato exerce uma função essencial na prenilação de diversas proteínas intracelulares, incluindo proteínas de sinalização de apoptose, ao diminuir a sinalização da via do NF- κ B, a expressão de genes envolvidos na sobrevivência celular regulada por ele é prejudicada (54).

A inibição da via do mevalonato também pode afetar outras vias de sinalização, como a via do TGF- β , essencial para sobrevivência e proliferação celular. A interrupção dessa via pode levar à ativação de cascatas que culminam em apoptose (53, 55).

Figura 5. Representação sumária do mecanismo de ação do BF no osteoclasto: ao serem absorvidos pelo osteoclasto, formam análogos não hidrolisáveis do ATP. O BF interfere na via do mevalonato, causando o acúmulo de isopentenilo (IPP) por impedir a formação de farnesil pirofosfato (FPP), essencial para a formação de Geranilgeranil Difosfato (GGPP), por sua vez responsável pela prenilação de proteínas essenciais à viabilidade do osteoclasto. Este mecanismo de ação leva à apoptose do osteoclasto (56).



Fonte: adaptado de Soares, 2015

Por possuírem afinidade pelo tecido ósseo, os BFs se acumulam na superfície e também são capazes de interferir na formação de pontes de hidroxiapatita: estruturas necessárias para a adesão dos osteoclastos à matriz óssea. Ao realizar esse mecanismo de entrave, esses antirreabsortivos reduzem a capacidade dos osteoclastos de se fixarem ao osso e, conseqüentemente, reabsorvê-lo (50).

Apesar das descrições supracitadas, o mecanismo exato pelo qual o BF pode gerar uma necrose óssea ainda não é totalmente compreendido. São várias as teorias propostas, sendo a necrose por isquemia a mais disseminada. Considera-se que ao inibir a atividade dos osteoclastos, é gerado um acúmulo de

osso denso não remodelado, por conseguinte, ocorre o comprometimento da angiogênese e, portanto, a debilita a circulação sanguínea (16-17).

2.4. Probióticos

2.4.1. Definição e fontes de isolamento

A definição de probióticos como “Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, foi estabelecida em 2001 durante um *workshop* conjunto (OMS/FAO) da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) sobre probióticos realizado na Argentina e amplamente popularizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (57).

Microrganismos presentes em alimentos fermentados naturalmente ou adicionados como culturas iniciadoras, se tratam da mais eficiente forma de consumo benéfica de probióticos. Dentre os efeitos positivos, o aumento da resposta imune e a ação anticarcinogênica estão sendo cada vez mais explorados (58).

São variadas as cepas de bactérias com potencial efeito positivo na saúde dos seres vivos. Dentre elas, o grupo de Bactérias Ácido Láticas (BAL) são amplamente exploradas em modelos experimentais e clínicos sendo o gênero *Lactobacillus* o mais célebre entre eles (58).

As fontes de isolamento de probióticos exercem um papel importante no desenvolvimento de produtos para promover a saúde (59). Tais fontes variam de acordo com o local de extração como trato gastrointestinal de seres vivos, alimentos fermentados ou matérias orgânicas como solo e plantas sendo notória, a ampla diversidade de ambientes onde tais microrganismos podem ser encontrados. O tipo de isolamento está diretamente ligado à ação dessas bactérias oferecendo uma riqueza de cepas com uma gama de possibilidades para a pesquisa e promoção à saúde (60).

Embora a maioria das cepas probióticas utilizadas na indústria alimentícia provenha de alimentos fermentados à base de leite, uma tendência crescente tem sido observada na adoção de cepas probióticas isoladas de alimentos fermentados não lácteos. O isolamento e a triagem de microrganismos de fontes naturais

representam abordagens altamente promissoras para a obtenção de cepas úteis e geneticamente estáveis, para aplicações na indústria farmacêutica no desenvolvimento de suplementos e medicamentos (61, 62).

2.4.2. *Lactiplantibacillus plantarum* e atividade anti-inflamatória

Os *Lactiplantibacillus plantarum* (LP) são microrganismos com potencial conhecidos por sua atividade anti-inflamatória. Além de seus efeitos positivos sobre a saúde intestinal, pesquisas destacam um potencial papel na modulação do sistema imunológico (62). Os mecanismos pelos quais os LP exercem suas atividades anti-inflamatórias são inúmeros e incluem a regulação da resposta imune, a modulação da microbiota intestinal e a produção de metabólitos bioativos (63, 64). É respaldado que essas ações ocorrem por meio da regulação de vias de sinalização responsáveis por mediar a inflamação como na redução da resposta dada pela via do NF- κ B, fator de transcrição sabidamente pró-inflamatório (65).

Desse modo, por se tratar de uma cepa de BAL facilmente isoladas no processo de fermentação do grão do cacau, com potencial de modular o sistema imunológico trazendo benefícios não só para a saúde intestinal, mas para o indivíduo como um todo (66). O *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 se trata de um agente terapêutico promissor para o tratamento de doenças inflamatórias, como a osteonecrose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da suplementação oral com *Lactipantibacillus plantarum* 6.2 em modelo animal de osteonecrose induzida por Ácido Zoledrônico.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar macroscopicamente o grau de severidade das lesões mandibulares;
- Quantificar macro e microscopicamente o desenvolvimento da osteonecrose;
- Realizar análise Imuno-histoquímica e morfometrias de marcadores celulares relacionados ao remodelamento do tecido ósseo;
- Realizar análise Imuno-histoquímica e morfométrica relacionada à propriedade de barreira intestinal dos animais.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento geral do estudo

Tratou-se de uma pesquisa experimental *in vivo* pré-clínica com abordagem analítica quali-quantitativa das alterações no osso mandibular e no trato gastrointestinal associadas a suplementação oral com *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 em modelo animal de osteonecrose.

4.2. Animais

4.2.1. Amostra

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) sob protocolo nº 6141240423 (ID 001941) e 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) (Anexos 1 e 2).

Foram utilizados 20 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com 8 a 10 semanas de idade e pesando aproximadamente 250g, provenientes da Unidade de Produção Animal IPeFarM.

Os animais foram alojados por grupos em caixas plásticas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), forradas com cama de maravalha e com tampa de grade metálica, por onde receberam água *ad libitum* por sucção em frasco plástico com bico metálico e ração padronizada.

A temperatura do biotério se manteve padronizada em 22°C ± 2°C sob iluminação controlada (12 horas de ciclo claro/escuro) e nenhum animal apresentou manifestação de doença local ou sistêmica diferente do esperado.

4.2.2. Grupos Experimentais

O experimento foi realizado com a distribuição de quatro grupos experimentais distintos: O primeiro grupo BASAL, foi composto por quatro ratos que foram submetidos apenas ao estresse dos procedimentos de injeção e gavagem, porém, sem que fossem utilizados os AZ e o LP6.2 os mantendo em condições normais de saúde e alojamento. O segundo grupo, LAC, também com n=4, recebeu suplementação oral por gavagem da solução contendo o *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2. O terceiro grupo, ONE, com n=6 animais, foi induzida osteonecrose por meio da injeção de AZ. Por fim, o grupo ONE+LAC, também com n=6, representou uma combinação dos grupos LAC e ONE, onde os ratos foram suplementados com *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 durante a indução da osteonecrose conforme descrito no quadro 2 a seguir:

Quadro 2. Distribuição dos grupos da pesquisa

Grupo	Descrição	N
BASAL	Ratos sadios	04
LAC	Ratos unicamente suplementados com LP 6.2	04
ONE	Ratos com indução de osteonecrose experimental (ONE) por meio de injeção intraperitoneal com Ácido Zoledrônico	06
ONE+ LAC	Ratos com indução de osteonecrose experimental (ONE) por meio de injeção intraperitoneal com Ácido Zoledrônico e suplementação oral com LP 62	06
Total		20

Com base no estudo de Ervolino (67), estima-se uma variabilidade populacional (desvio padrão) de ± 2 e uma diferença mínima a ser detectada entre os grupos experimentais de 1,8 (médias) para o principal parâmetro experimental. Utilizando teste T não pareado na comparação entre os grupos e valores de alfa (erro tipo I – 5%) e beta (erro tipo II – 80%), são necessários n=05 animais por grupo. Levando em conta uma mortalidade de 30% ou perdas por problemas de procedimento, os pesquisadores solicitam um n=06 animais por grupo, totalizando

n=24 ratos Wistar. Porém, o experimento foi realizado com dois grupos contendo n=04 animais sem perdas.

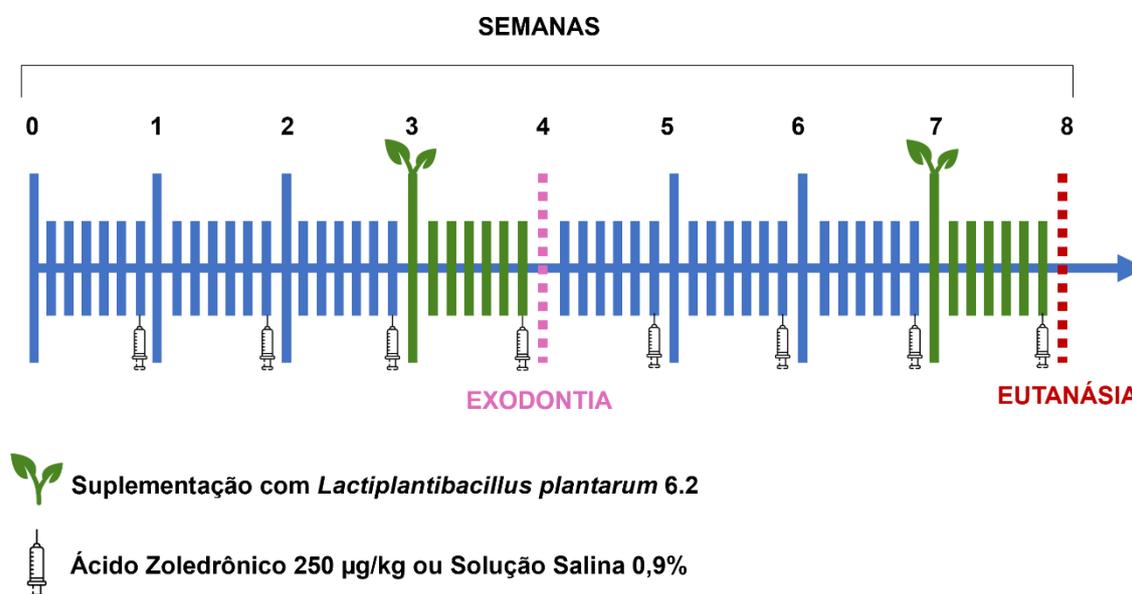
4.2.3. Indução experimental da osteonecrose

Adaptando o método de indução da osteonecrose experimental em ratos proposta por Biguetti *et al.*, (68), nos grupos ONE e ONE+LAC, foram administrados 250µg/kg de Ácido Zoledrônico (AZ) 4mg/5mL, totalizando 100µl por via intraperitoneal (IP) já nos grupos BASAL e LAC, foram administrados 100µl de solução salina estéril 0,9% IP.

Os animais receberam injeções IP de AZ e solução salina estéril 0,9% uma vez por semana, durante 4 semanas antes da extração do primeiro molar inferior esquerdo, e continuaram recebendo a mesma posologia sendo ajustada de acordo com a pesagem semanal até o final do período de indução da osteonecrose experimental de 8 semanas (figura 6).

Nenhum tipo de antibiótico ou anti-inflamatório foi administrado após a extração do molar, para evitar interferências nas vias inflamatórias (68).

Figura 6. Linha do tempo esquemática do experimento.



Fonte: Elaboração própria

Após 4 semanas de administração do medicamento, todos os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo no Laboratório de Patologia geral do DFP/CCS. Considerando a Resolução Normativa Nº 25, de 29 de setembro de 2015, no item 3.4 "Prevenção da dor e do distresse potencial" do CONCEA (69), os animais foram anestesiados com uma associação de Cetamina (75 mg/Kg – 0,75 ml) + Xilazina (10 mg/Kg – 0,5 ml) + 0,75 ml de água para anestesia IP (0,2 ml/100 g) IP, garantindo imobilização e anestesia geral durante aproximadamente 30 a 45 min (70).

Uma vez sedados e anestesiados, a luxação do elemento dentário foi realizada com instrumental odontológico sonda exploradora nº 5, sendo depois removido delicadamente com o auxílio de uma pinça clínica (figura 7). Os animais ficaram sob observação dos operadores até acordarem da sedação.

Figura 7. Primeiro Molar Inferior Esquerdo de um Rato Wistar sendo medido em régua milimetrada apresentando aproximadamente 5 milímetros totais, incluindo coroa e raízes.



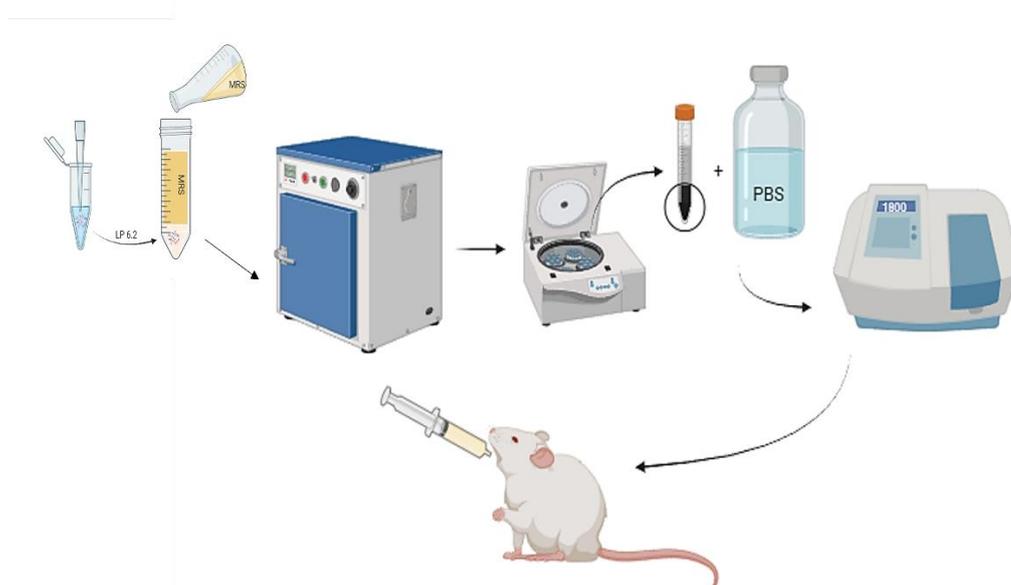
Fonte: Do autor

4.2.4. Suplementação

Os microrganismos foram cultivados e mantidos em meio descrito por Man, Rogosa e Sharpe (MRS) sob condições de microaerofilia. Esses, se mantiveram em meio MRS líquido por 24 horas em uma estufa apresentando aproximadamente 37°C de acordo com as condições supracitadas. Posteriormente, os LP 6.2 foram centrifugados com sobrenadantes desprezados.

Em seguida, foi realizado um ajuste de concentração para 10^9 bactérias por ml com diluição em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), até que o valor obtivesse absorvância no espectrofotômetro entre 1 a 1,5 considerando a calibração do aparelho apresentando comprimento de onda de 560 nanômetros (figura 8).

Figura 8: Esquema do processo de padronização do inóculo do LP 6.2 para administração oral



Fonte: Elaboração própria.

A solução foi administrada via oral por meio de uma cânula de gavagem em um total de 2 ml por animal diariamente durante 7 dias na terceira e mais 7 dias na sétima semana do desenvolvimento experimental de osteonecrose (71).

4.2.5. Eutanásia

Ao final da oitava semana, os animais foram eutanasiados segundo as orientações que constam na “Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal” (69). Para isso, foi administrada uma associação de Cetamina (180mg/Kg) e Xilazina (30mg/Kg) por via IP, caracterizando morte por sobredose de anestésico (72).

A eutanásia foi confirmada por avaliação da perda do reflexo corneal e em seguida, foi realizado o exame clínico e registro fotográfico de cada roedor, um animal por vez, por um único operador.

4.2.6. Exame macroscópico dos animais

O exame macroscópico foi realizado em sala com iluminação apropriada (foco de luz), por meio de observação direta com auxílio de pinça clínica para visualização intraoral.

As mandíbulas dos animais foram dissecadas, e os tecidos moles divulsionados com o auxílio de pinça clínica e tesoura Metzemaum. Posteriormente, os registros fotográficos oclusais das mandíbulas foram realizados descansando-as frente a um lençol de borracha de coloração azul.

Seguindo os parâmetros clínicos avaliados por Ervolino *et al.*, (67), foram registradas e comparadas as seguintes características clínicas:

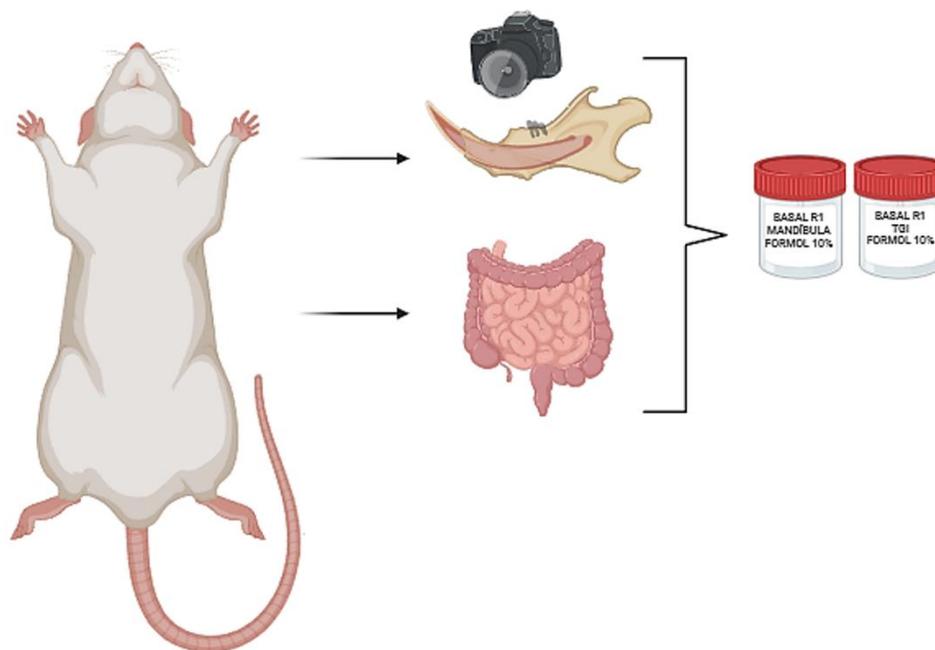
1. Ausência de osso exposto e membrana mucosa totalmente reparada;
2. Ausência de osso exposto e membrana mucosa parcialmente reparada;
3. Lesões semelhantes a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Bifosfonatos (ONMB) - local de extração com pequena área de osso exposto (menos da metade do espaço alveolar) e comprometimento do reparo da membrana mucosa;
4. Lesões semelhantes a ONMB - local de extração com grande área de osso exposto (mais da metade do espaço alveolar) e comprometimento do reparo da membrana mucosa.

4.3 Dissecação

Após a confirmação da morte dos animais, esses foram dissecados com auxílio de um cabo de bisturi e lâmina 15 em formato de laparotomia mediana para exposição dos órgãos internos com ênfase no trato gastro intestinal (figura 9).

Os intestinos de cada animal foram separados e higienizados com banho em Solução Salina estéril a 0.9% e avaliados macroscopicamente.

Figura 9. Esquema apresentando os procedimentos realizados no dia da eutanásia dos animais incluindo dissecação das mandíbulas, fotografia macroscópica das mandíbulas, retirada do intestino e fixação de todos os tecidos.



Fonte: elaboração própria.

4.4. Processamento Histológico

4.4.1. Fixação dos tecidos

Imediatamente após a eutanásia e exame macroscópico, as mandíbulas e intestinos foram separadamente acondicionados em potes plásticos com capacidade de 50mL cada e identificados pelo grupo, órgão e código do animal correspondente. As amostras se mantiveram imersas em solução fixadora – Paraformaldeído tamponado 10% (PFA 10%) com pH 7,4 e molaridade 0,1Molar (0,1M) – tampão fosfato. Os potes foram tampados e mantidos em temperatura ambiente, deixando-as em solução fixadora por 72 horas.

4.4.2. Descalcificação

As hemimandíbulas já fixadas foram imersas em solução desmineralizadora de ácido nítrico em paraformaldeído 37% e água destilada (proporções 1:1:8 – ácido nítrico 5%) trocada a cada 02 dias durante 07 dias.

A confirmação da desmineralização foi realizada após 7 dias sendo observado observado que os espécimes estavam com consistência borrachóide e pouca resistência à flexão, assim como, por meio da inserção de uma agulha que atravessou completamente a peça sem que fossem realizadas forças extremas.

Após isso, as áreas dos alvéolos dos primeiros molares inferiores esquerdos foram clivadas na mesial e distal e colocadas em cassetes histológicos. Os cassetes ficaram em um béquer para lavagem, com tampão fosfato-salino 0,01M (PBS 1x) pH 7,4 durante três dias, com troca diária da solução.

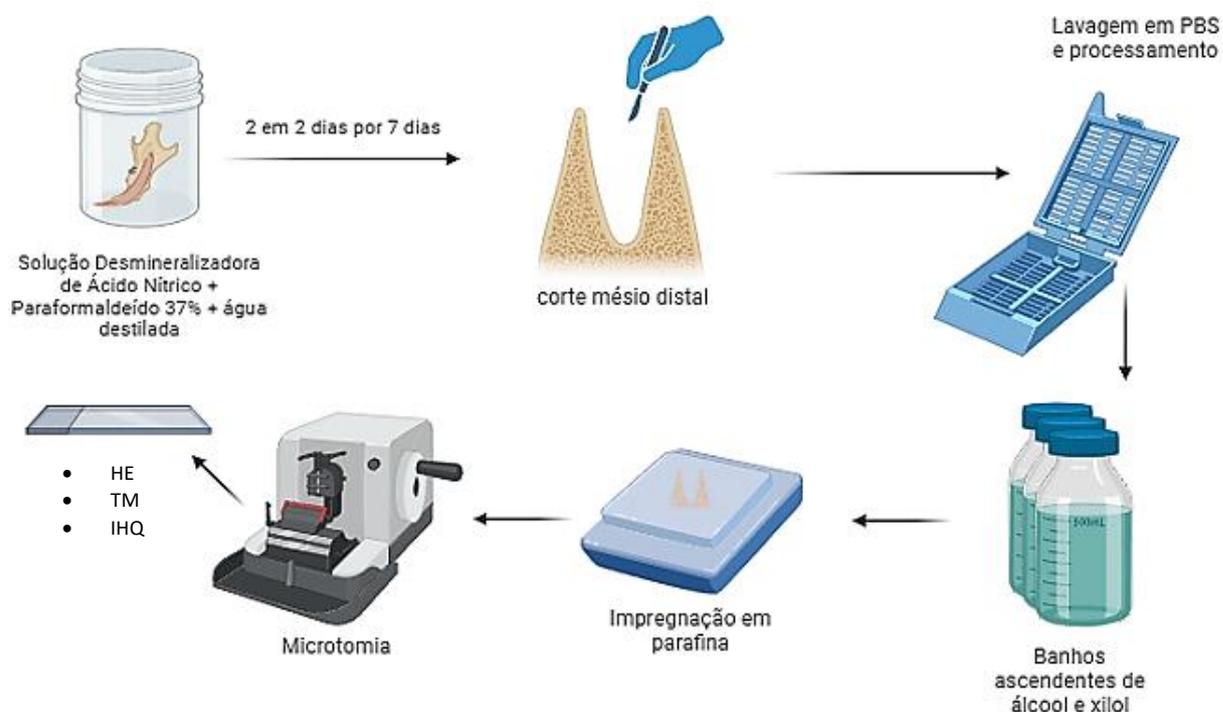
Após a lavagem, as amostras foram submetidas ao processamento histológico com desidratação em banhos de soluções com concentrações ascendentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e absoluto), clarificadas em xilol, impregnadas e incluídas em moldes para microtomia (**figura 10**).

Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo em sentido coronal com espessura 4 μ m (micrômetros). Por fim, os cortes estavam prontos para realização dos seguintes métodos histoquímicos (**Quadro 3**), além das reações imuno-histoquímicas.

Quadro 3. Corantes histoquímicos utilizados e suas principais aplicações

Corante	Objetivo
Hematoxilina-Eosina	Observar células e componentes estruturais
Tricrômico de Masson	Observar proteínas matriz extracelular

Figura 10. Esquematisação da descalcificação e processamento da mandíbula.



Fonte: elaboração própria.

4.5. Análise imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, as amostras foram reativadas com solução de citrato de recuperação pH 6,0 (EasyPath Diagnosticos) em câmara pressurizada Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca) e a peroxidase endógena foi bloqueada por 30 minutos (EasyPath Diagnosticos). Após essa etapa, foi realizado o bloqueio proteico específico e os cortes histológicos foram preenchidos com anticorpo primário anti-NFκB (Cloud-Clone Corp/ PAB82RA01/Polyclonal Antibody; 1:100), anti-TGF-β (Cloud-Clone Corp/ PAA12RA01/Polyclonal Antibody; 1:100) e anti-ZO1 (Cloud-Clone Corp/ PAA124RA01/Polyclonal Antibody; 1:100). Posteriormente, foi adicionado anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1:100, Link Sistem - HRP - Dako 4061). A reação foi visualizada utilizando solução de diaminobenzidina (DAB - HRP) 0,024% (EasyPath Diagnosticos) e contrastada com hematoxilina de Harris.

4.6. Análise histomorfométrica

Os cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (H&E), pelo tricrômico de Masson ou submetidos às reações imuno-histoquímicas foram visualizadas em objetiva de 20X e digitalizadas 20 imagens aleatórias por meio do microscópio de luz (Eclipse Ci-L, Nikon, Tóquio, Japão) e microcâmera DS-Ri2 (Nikon, Tóquio, Japão).

Para o cálculo da área de necrose óssea, um corte histológico corado pela HE de cada caso foi visualizado por meio da objetiva de 20X do microscópio para a digitalização de 20 áreas aleatórias através da microcâmera. Todo o interstício foi excluído da análise utilizando ferramentas do software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Rockville, Maryland, EUA). Todos os tipos de pixels das lesões envolvidas foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área em μm^2 .

As áreas da matriz extracelular e de positividade imuno-histoquímica foram calculadas por meio de algoritmos construídos no software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Rockville, Maryland, EUA). Em cada imagem foi realizada seleção de todos os pixels com tons de azul (tricrômico de Masson) e marrom (reações imuno-histoquímicas) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μm^2 .

4.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média e, analisados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism® versão 8.0.2 (GraphPad Software, Inc, Califórnia, EUA). Inicialmente, foi realizada uma estatística descritiva dos dados, sendo calculados os valores máximos e mínimos, a amplitude, além da média e o desvio padrão.

Os dados das análises macroscópica e histomorfométrica foram tabulados e analisados por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguida da análise de variância (ANOVA) "one way" e pós-teste de *Tukey* ou *Dunnet's* com nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$) para estabelecer as diferenças encontradas entre os grupos experimentais.

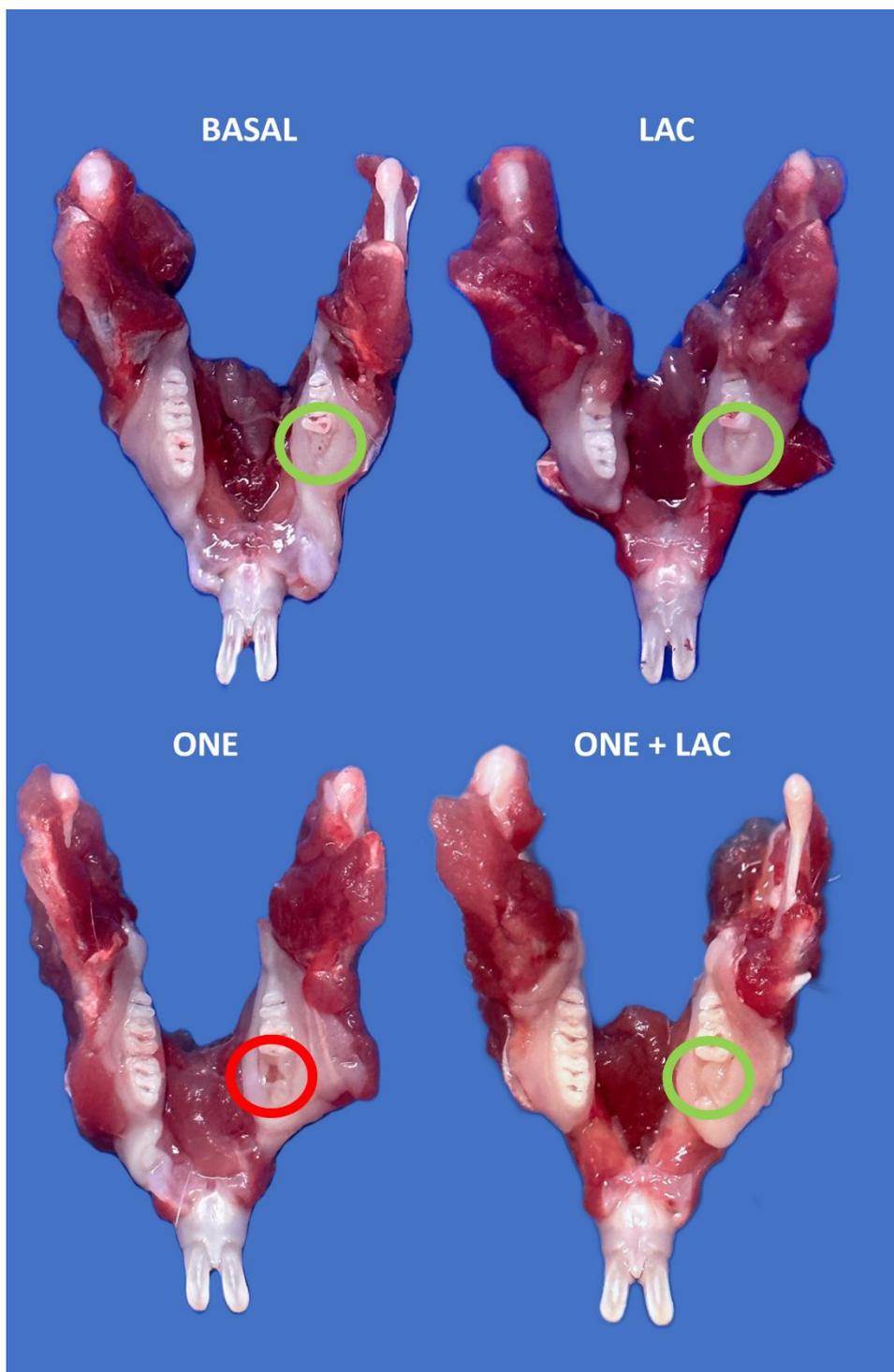
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação macroscópica

Os animais do grupo BASAL apresentaram, após exodontia do primeiro molar inferior esquerdo, uma superfície de mucosa gengival lisa, homogênea, ligeiramente mais clara recobrendo a região lesionada. Nos animais pertencentes aos grupos experimentais, LAC e ONE+LAC, ficou claro o mesmo padrão macroscópico do grupo BASAL, evidenciando a presença de uma mucosa novamente compatível a uma gengiva saudável (círculo verde)

Em contrapartida, os animais do grupo ONE, apresentaram ausência de revestimento mucoso na região da exodontia. É visto também, no grupo supracitado, uma área macroscopicamente amarelada compatível com osso alveolar exposto (círculo vermelho) (**Figura 11**).

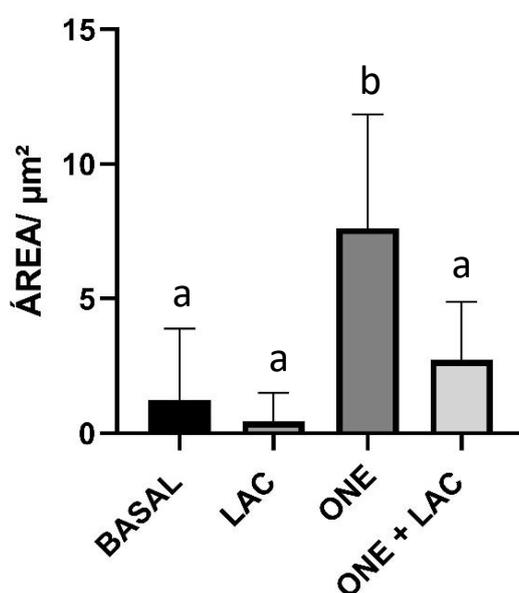
Figura 11. Macroscopia representativa das mandíbulas dissecadas dos animais por grupo. Seta verde: região com tecido gengival revestindo a região alveolar. Seta vermelha: região de osso exposto. Grupos: BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC.



Fonte: do autor.

A área de exposição óssea observada nas macroscopias de cada grupo, é apresentada na figura 12, que representa a análise morfométrica da área em micrômetros quadrados em relação aos grupos experimentais:

Figura 12. Análise morfométrica da área de exposição óssea em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey.



Fonte: do autor.

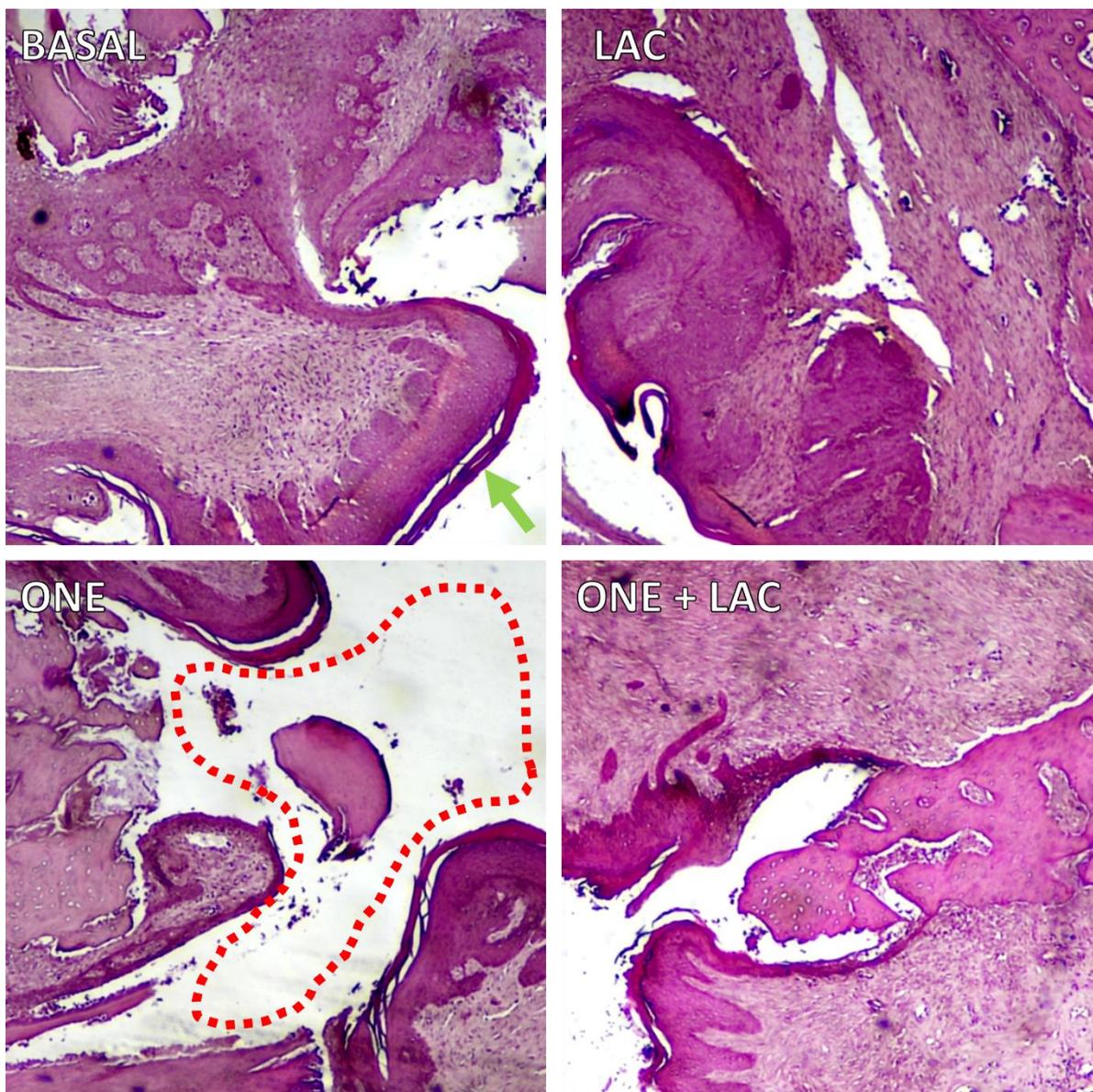
5.2. Avaliações histológica e histomorfométrica da área de exposição óssea

As fotomicrografias das lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) revelaram características distintas no tecido ósseo mandibular entre os diferentes grupos experimentais:

Nos grupos BASAL e LAC, foi possível visualizar um tecido epitelial escamoso estratificado de revestimento intacto (seta verde), seguido de uma camada de tecido conjuntivo e tecido ósseo. Esses grupos mostraram uma organização típica, com o tecido ósseo adequadamente protegido pelo revestimento epitelial (**figura 13**).

Por outro lado, nos grupos ONE e ONE+LAC, foi observado um rompimento do tecido epitelial, resultando na exposição do osso subjacente. Notavelmente, o grupo ONE exibiu uma área de exposição óssea maior do que todos os outros grupos (**figura 13, pontilhado vermelho**), indicando um maior comprometimento da integridade do componente epitelial e conjuntivo neste grupo em particular assim como visto no resultado macroscópico anterior.

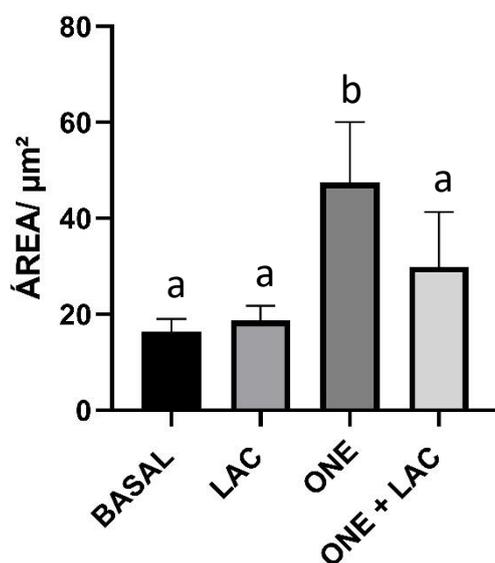
Figura 13. Cortes histológicos representativos de mandíbulas coradas em hematoxilina e eosina, evidenciado o tecido conjuntivo seguido do epitélio de revestimento da mucosa da região de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Seta verde: revestimento epitelial intacto. Linha pontilhada vermelha: área microscópica de exposição óssea. Magnificação: Objetiva (40x); Ampliação (400x).



Fonte: do autor.

As áreas de exposição óssea observadas nas microscopias de cada grupo, são apresentadas na figura 14, que representa a análise histomorfométrica da área em micrômetros quadrados em relação aos grupos experimentais:

Figura 14: Análise histomorfométrica da área de exposição óssea em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 10 marcações para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Dunnett’s considerando diferença significativa entre o grupo BASAL vs ONE.



Fonte: do autor.

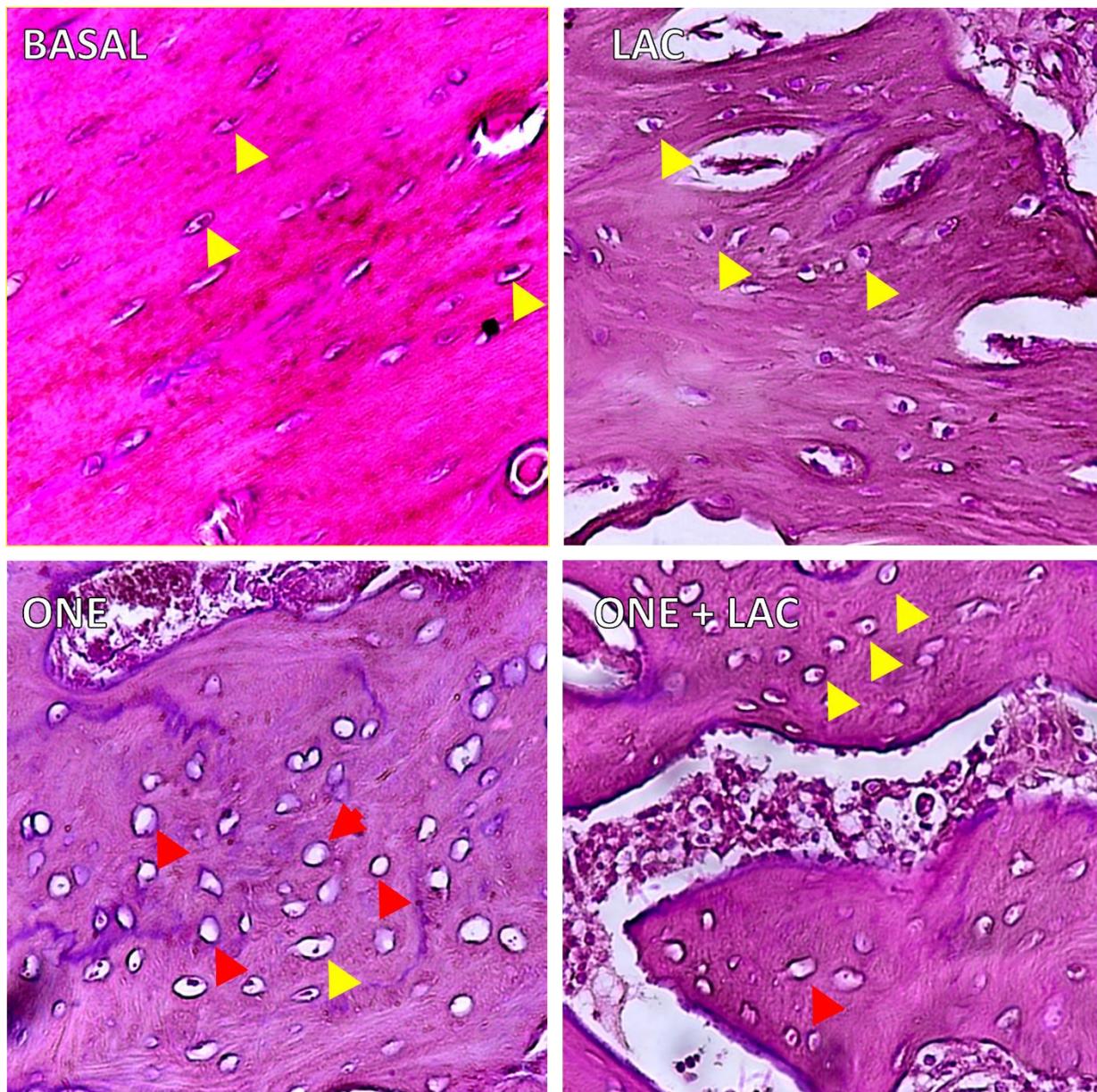
5.3. Avaliação histológica e histomorfométrica da viabilidade do tecido ósseo

Após a confirmação histológica da presença de osso exposto na cavidade oral, as imagens foram aproximadas no intuito de avaliar a viabilidade do tecido em questão. Para tal, foi observada e quantificada a ausência de osteócitos (necrose) em suas lacunas, característica histopatológica de osteonecrose.

Os animais dos grupos BASAL e LAC tiveram os osteócitos preservados, nucleados com tamanhos e formas homogêneas (seta amarela). Já os animais do grupo ONE, em contrapartida, tiveram osteócitos necróticos (seta vermelha), de aspecto tumefeitos e por vezes granuloso (figura 15).

Animais dos grupos ONE+LAC, tiveram tantos osteócitos necróticos, representados pelas setas vermelhas, quanto osteócitos preservados (**figura 15**, setas amarelas).

Figura 15. Corte histológico de mandíbulas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), evidenciando o tecido ósseo. BASAL; LAC; ONE; ONE + LAC Seta amarela: osteócito nucleado. Seta vermelha: osteócito necrosado. Magnificação: 20x.

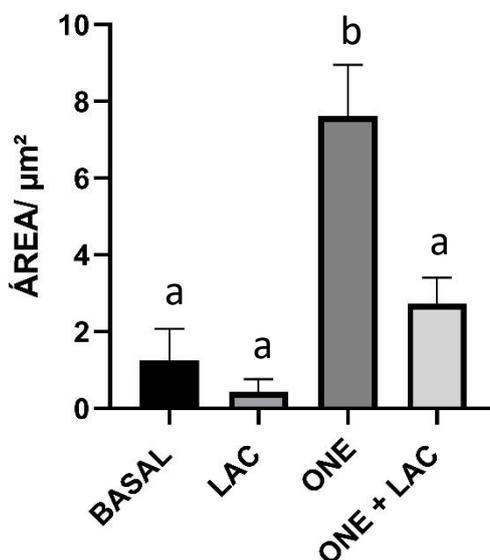


Fonte: do autor.

A fim de correlacionar o achado com a área de exposição óssea, realizou-se a medição da área de osteonecrose por grupo.

A figura 16 representa a análise histomorfométrica da área dos osteócitos necróticos de acordo com a condição experimental. Os animais do grupo BASAL e LAC não apresentam regiões de osteonecrose. Os animais do grupo ONE+LAC, exibiram uma redução da região de osteonecrose quando comparada aos animais do grupo ONE.

Figura 16. Análise histomorfométrica da área de osteonecrose nas diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando dados estatisticamente significantes, para o grupo ONE em relação aos demais modelos experimentais. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey.



Fonte: do autor.

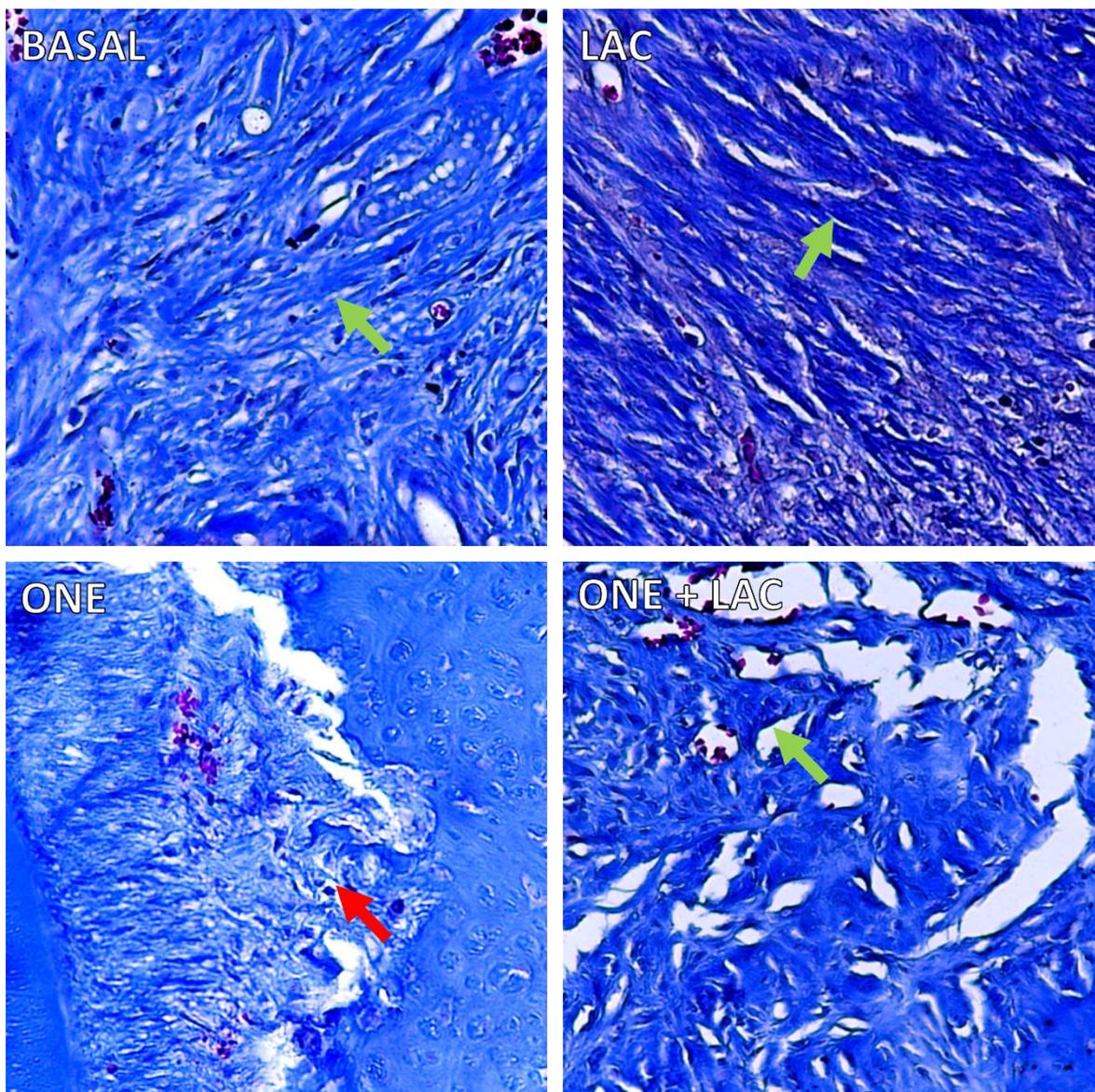
5.4. Avaliações histológica e histomorfométrica da deposição de matriz extracelular

Os animais do grupo BASAL, apresentaram, histologicamente, tecido conjuntivo, em especial fibras colágenas, evidenciadas em azul pela coloração do Tricrômico de Masson. Tais fibras possuíam aspecto homogêneo e de distribuição difusa (figura 19, seta verde).

Os animais dos grupos LAC e ONE+LAC, manifestam fibras com a marcação da deposição de matriz extracelular ainda mais acentuada.

Todavia, o grupo ONE, evidencia fibras de aspecto heterogêneo e de distribuição focal (seta vermelha) além de possuírem poucas regiões de deposição de matriz extracelular quando comparados aos animais dos demais grupos experimentais (**Figura 17**).

Figura 17. Cortes histológicos representativos de mandíbulas coradas em Tricrômico de Masson, evidenciado o tecido conjuntivo. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Seta verde: matriz extracelular com fibras de aspecto homogêneo e distribuição difusa. Seta vermelha: matriz extracelular com fibras de aspecto heterogêneo e de distribuição focal. Magnificação: Objetiva (40x); Ampliação (400x).

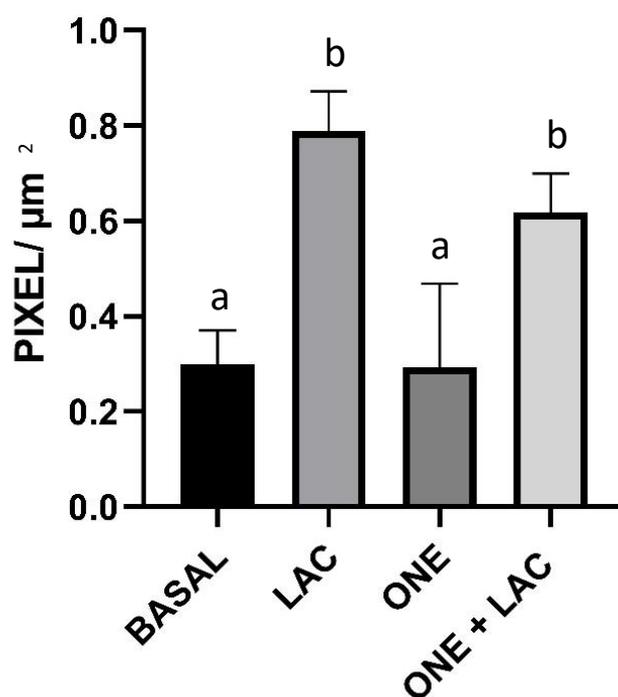


Fonte: do autor.

Os animais dos grupos BASAL, LAC e ONE+LAC, possuíram grandes regiões de intensa deposição de matriz extracelular colagênica, é possível perceber que os grupos suplementados com *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2, apresentaram maior marcação azul escura independente da condição experimental.

As áreas de marcações observadas nas lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson, foram quantificadas na figura 18, que representa a análise histomorfométrica da deposição de matriz extracelular de acordo com os tons de azuis presentes em cada grupo.

Figura 18. Análise morfométrica da área de deposição de matriz extracelular em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 marcações para cada grupo. Valor de P < 0.05 representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey.



Fonte: do autor.

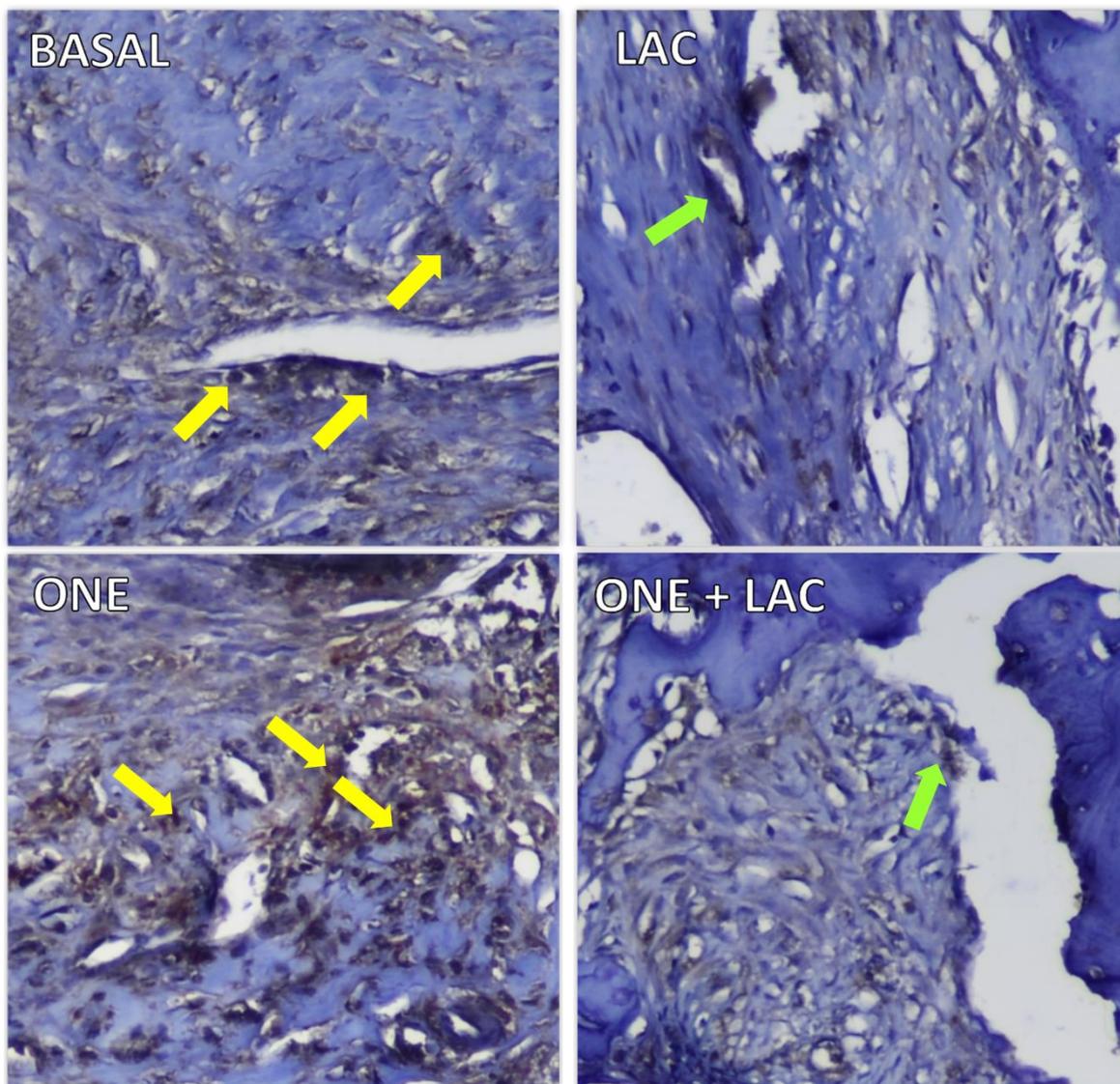
5.5. Avaliação imuno-histoquímica para NF-kB

Os animais de todos os grupos experimentais, apresentaram histologicamente presença de tecido conjuntivo com região de tecido ósseo com marcações marrom acastanhadas que significam a positividade da reação imunohistoquímica contra o NF-kB (Figura 19).

Os animais do grupo BASAL (A) e ONE (B), tiveram marcações multifocais e em múltiplas regiões do tecido, em especial em regiões ricas em tecido de granulação (cabeça de seta amarela).

No entanto, o grupo LAC e ONE+LAC, tiveram uma marcação focal apenas em células e espaços do tecido conjuntivo (cabeça de seta verde). Sendo possível concluir que a suplementação com os lactobacilos foi capaz de diminuir a produção desse fator.

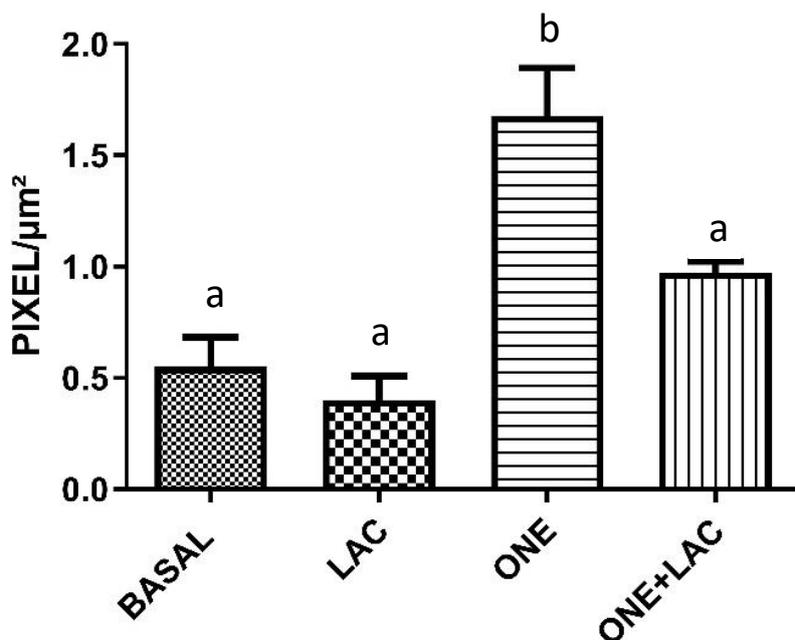
Figura 19. Corte histológico de mandíbulas em reação imuno-histoquímica contra NF-kB contra coradas em Hematoxilina. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Magnificação: Objetiva (40x); Ampliação (400x).



Fonte: do autor.

As áreas de marcações observadas nas lâminas contra-coradas em hematoxilina com reação imuno-histoquímica contra NF- κ B, são apresentadas na figura 20, que representa a análise histomorfométrica das marcações de coloração marrom acastanhadas:

Figura 20. Análise histomorfométrica das áreas de marcações marrom acastanhadas positivas para NF- κ B em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey.



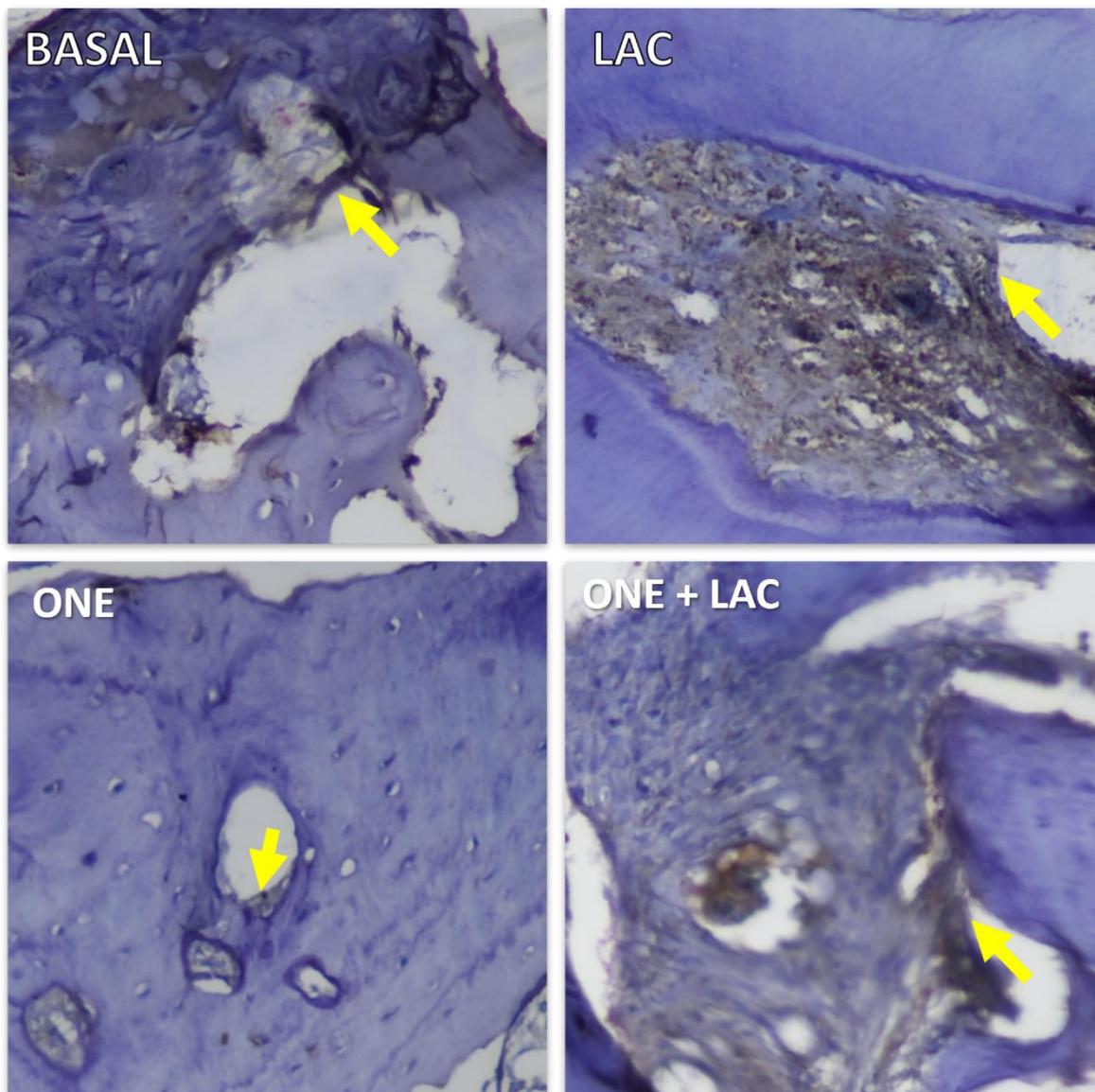
Fonte: do autor.

5.6. Avaliação imuno-histoquímica para TGF- β

Após a análise imuno-histoquímica contra TGF- β , especificamente no tecido ósseo, os resultados revelaram variações significativas nessa marcação entre os diferentes grupos experimentais:

No grupo LAC, observou-se uma marcação intensa de TGF- β no tecido ósseo, indicando uma expressão elevada dessa citocina. No grupo ONE+LAC, a marcação de TGF- β foi semelhante à do grupo BASAL, com uma intensidade significativa, mas ligeiramente menor em comparação com o grupo LAC. A suplementação com lactobacilos, combinada com a administração do AZ, resultou em uma expressão de TGF- β semelhante à condição controle. Esta análise pode ser feita qualitativamente na figura 21 a seguir:

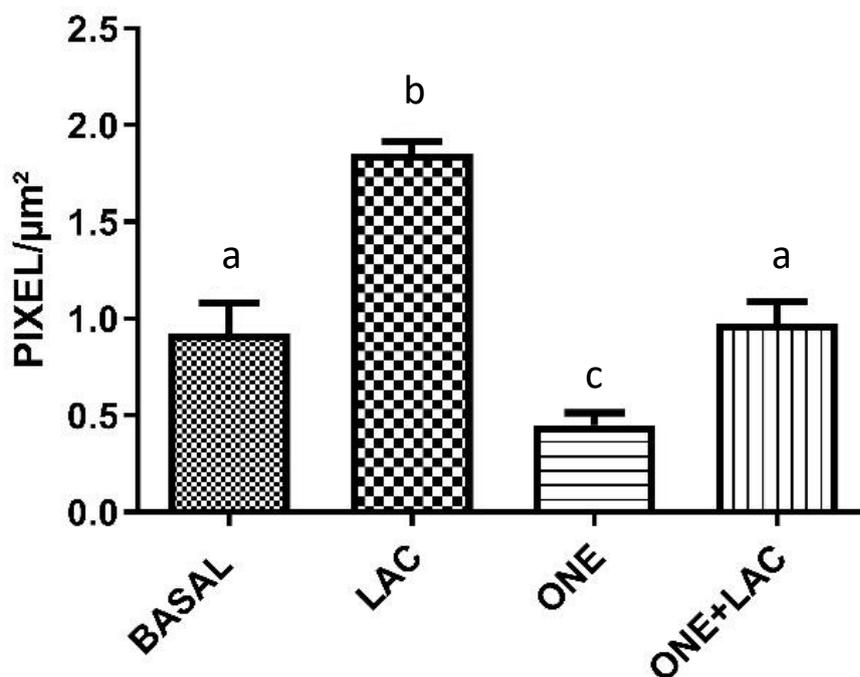
Figura 21. Corte histológico de mandíbulas em reação imuno-histoquímica contra TGF- β contra coradas em Hematoxilina. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Seta amarela: marcação positiva para o TGF-beta no Tecido ósseo. Magnificação: 20x.



Fonte: do autor.

As áreas de marcações observadas nas lâminas contra-coradas em hematoxilina com reação imuno-histoquímica contra TGF- β foram quantificadas na figura 22, que representa a análise histomorfométrica das marcações de coloração marrom acastanhadas:

Figura 22. Análise histomorfométrica das áreas de marcações marrom acastanhadas positivas para TGF- β em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando dados estatisticamente significantes. ANOVA "one way" seguido do teste de Turkey.



Fonte: do autor.

5.7. Avaliação imuno-histoquímica para Zônula de Oclusão (ZO-1)

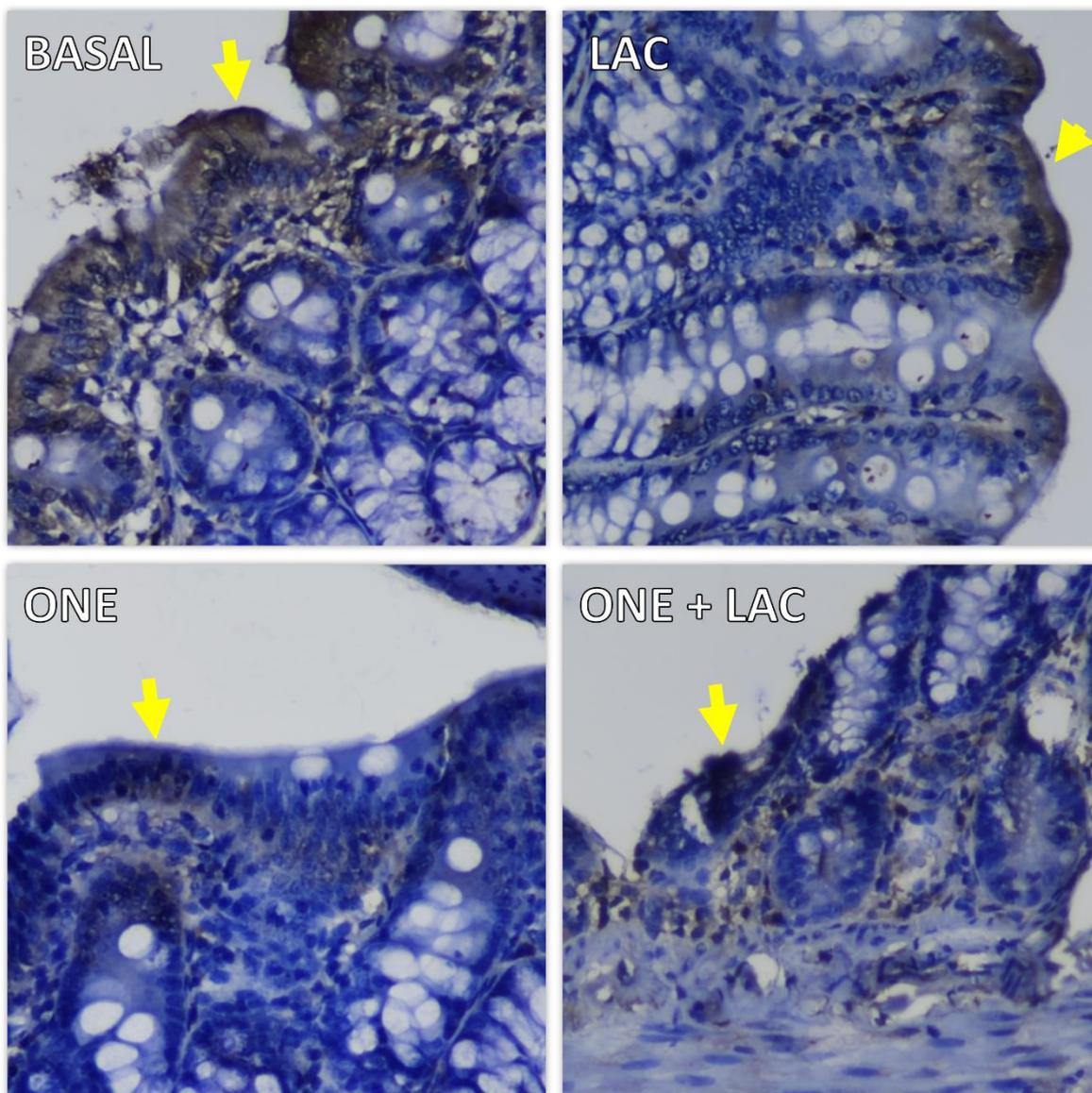
Na imuno-histoquímica para avaliar a marcação da zônula de oclusão nos enterócitos do epitélio de revestimento do trato gastrointestinal, os resultados revelaram padrões distintos de expressão:

Ambos os grupos BASAL e LAC, apresentaram semelhança no valor da marcação marrom acastanhada para zônula de oclusão: a marcação observada foi maior em comparação com os outros grupos experimentais. Tanto na condição basal quanto na condição suplementada com lactobacilos (LAC), a integridade da zônula de oclusão foi mantida em níveis mais elevados.

Entretanto, no grupo ONE+LAC, observou-se uma quantidade de marcação menor em comparação com os grupos BASAL e LAC, porém ainda considerável. Nesse caso, o tratamento com o Ácido Zoledrônico combinado a suplementação LP 6.2, resultou em uma redução na marcação da zônula de oclusão em relação aos grupos BASAL e LAC, mas ainda manteve níveis significativos de expressão dessa estrutura em relação ao grupo não suplementado (ONE).

No grupo ONE, a marcação para zônula de oclusão foi significativamente menor do que em todos os outros grupos experimentais. Isso pode ser visualizado qualitativamente a seguir na figura 23.

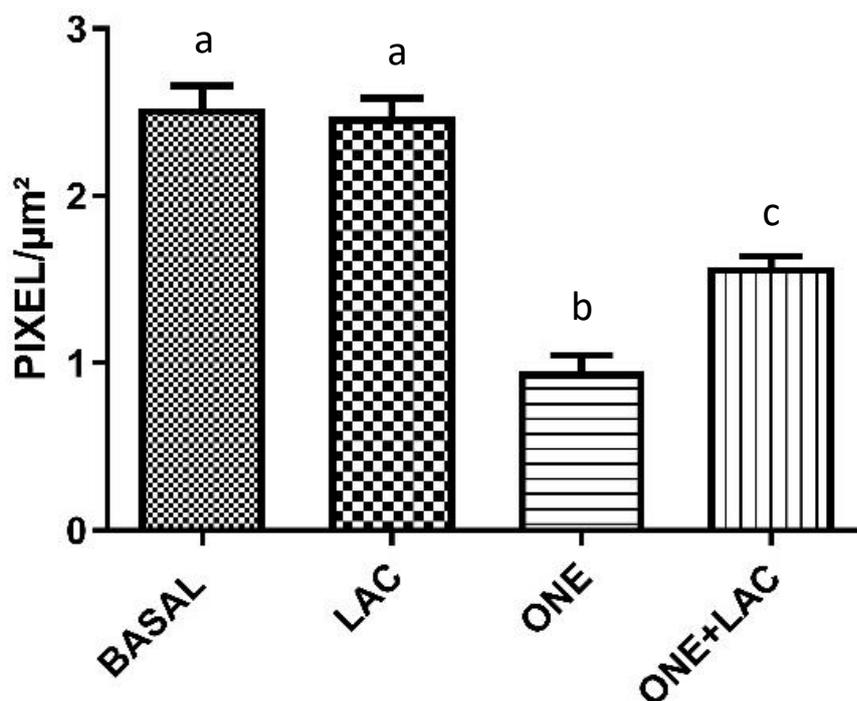
Figura 23. Cortes histológicos de trato gastrointestinal em reação imuno-histoquímica contra Zônula de Oclusão contra coradas em Hematoxilina. BASAL; LAC; ONE; ONE+LAC. Cabeça de seta amarela: marcação positiva para o ZO nos enterócitos do epitélio de revestimento do trato gastrointestinal. Magnificação: Objetiva (40x); Ampliação (400x).



Fonte: do autor.

As áreas de marcações observadas nas lâminas contra-coradas em hematoxilina com reação imuno-histoquímica contra Zônula de Oclusão, foram quantificadas na figura 24, que representa a análise histomorfométrica das marcações de coloração marrom acastanhadas visualizadas na figura anterior:

Figura 24. Análise histomorfométrica das áreas de marcações marrom acastanhadas positivas para Zônula de Oclusão em relação as diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 4 marcações para cada grupo. Valor de $P < 0.05$ representando dados estatisticamente significantes. ANOVA “one way” seguido do teste de Turkey.



Fonte: do autor.

6. DISCUSSÃO

O estudo avaliou a efetividade da suplementação oral com LP62 no tratamento da ONMRM em modelo murino. Para isso, foi adaptado o modelo experimental de indução da ONE em ratos proposto por Biguetti *et al.*, (68), que induziu lesões de ONE em animais da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) quando expostos ao AZ 250µg/Kg durante 07 semanas. O ajuste da dose para suplementação seguiu o modelo respaldado por Santos *et al.*, (71), que sugere concentração de 10^9 bactérias por mL afim de garantir que o efeito probiótico seja alcançado por meio de níveis adequados de lactobacilos no intestino.

A inflamação aguda se trata de uma resposta essencial do hospedeiro a infecções e lesões teciduais, envolvendo uma complexa cascata de eventos sejam eles moleculares ou celulares. A resolução eficaz da inflamação aguda é tão importante quanto a sua indução, e a falha na resolução adequada pode levar cronificação da doença (72, 73).

Nesse contexto, a osteonecrose se trata de uma doença que se caracteriza com o surgimento de uma inflamação nos tecidos moles, mais comum em mandíbula e/ou maxilas, com exposição óssea frequente (74). O processo de reparo tecidual desempenha um papel essencial na resolução da inflamação e na restauração da integridade dos tecidos após lesões ou infecções. Esse mecanismo envolve uma série de eventos como a remoção de tecido danificado, a proliferação celular, a formação de tecido de granulação e a remodelação da matriz extracelular (75).

Os Lactobacilos são um grupo de bactérias que possuem efeito probiótico e são amplamente estudadas devido aos benefícios à saúde do hospedeiro incluindo, suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (76). Tais bactérias são capazes de modular diretamente a atividade de células do sistema imunológico, trazendo resultados que minimizam os sinais e sintomas clínicos da inflamação devido a sua capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como

o TNF- α e IL-6, ao mesmo tempo que aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (77,78).

Segundo Dorigan *et al.*, (79), em casos de ocorrência da ONMRM, o tratamento tem como principal objetivo o fechamento da ferida. Esse objetivo foi contemplado pois o probiótico utilizado no presente estudo, foi capaz de reduzir o sinal clínico de exposição óssea alveolar na região onde foi realizada a extração do primeiro molar inferior esquerdo, na intenção de acelerar o processo de indução da ONE.

Os resultados apresentaram evidências promissoras sobre o potencial da suplementação oral profilática do LP 6.2 no tratamento de lesões de ONE. Na macroscopia das mandíbulas, observou-se uma melhora significativa no reparo ósseo e epitelial nos ratos do grupo ONE+LAC em comparação com o grupo ONE com diferenças estatísticas em suas áreas. Esses achados condizem com a literatura existente que destaca a importância da prevenção da ONE em pacientes submetidos à terapia com medicamentos antirreabsortivos, principalmente os bifosfonatos (80, 18).

O Ácido Zoledrônico, se trata de um tipo de bifosfonato intravenoso utilizado, geralmente, em doses elevadas por um longo período de tempo para tratamentos de condições ósseas em especial cânceres capazes de aumentar o risco de fraturas (81). Apesar do AZ possuir um efeito benéfico no processo de redução e ganho de substância óssea, a ONE ocorre com uma frequência maior em pacientes que fazem uso do medicamento supracitado e, por essa razão, se tornou objeto de escolha para tentativa de indução dessa doença no modelo experimental murino proposto.

Afim de contemplar um diagnóstico histológico de ONE, foram realizadas avaliações das lâminas de tecido ósseo das mandíbulas coradas em HE. Conforme descrito por Aghaloo *et al.* (82), a morte dos constituintes celulares do tecido ósseo, se trata da principal característica histológica de ONE.

Os resultados das fotomicrografias das mandíbulas para avaliação das estruturas celulares, em especial a presença ou ausência de, no mínimo, 5 núcleos nos osteócitos por fotomicrografia, coincidem com a avaliação clínica que apresentou um diagnóstico de osteonecrose visível por meio da descontinuidade

epitelial presente na área de exodontia. Dessa forma, na histomorfometria, o grupo ONE também apresentou maior área de exposição óssea e menor viabilidade do tecido com diferenças estatísticas levando em consideração a ampla região de osteócitos vazios em relação aos demais.

No momento que o fornecimento de sangue para o osso é diminuído, a morte dos osteoblastos e osteócitos pode prejudicar a organização e a deposição da matriz extracelular (MEC), isso resulta em uma influência direta no processo de reparo e na progressão da doença (83). Em condições ideais, a deposição acentuada de MEC pode ajudar na regeneração óssea e na substituição do tecido necrótico por um tecido viável e sadio. Com a finalidade de buscar tratamentos minimamente invasivos para a ONMRM, alguns desses estão sendo explorados, como o uso do Laser de Baixa Intensidade (LBI) (67, 85).

Tal como, no trabalho desenvolvido por Pontes *et al.* (86), foram realizadas técnicas terapêuticas utilizando o LBI e dessa forma, foi possível observar um aumento da área de matriz extracelular e diminuição da inflamação representada pela baixa marcação do NF- κ B, proteína essa responsável por regular a expressão de genes relacionados a inflamação como o TNF-alfa e a interleucina-6. Esse comportamento também é revelado ao lançar mão da suplementação com o LP 62 que apresentou uma deposição de MEC mais acentuada nos grupos LAC e ONE+LAC nas fotomicrografias das lâminas coradas em TM e conseqüente redução do NF- κ B.

O processo inflamatório envolve a ativação de diversas vias de sinalização molecular. Dentre elas, a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) são essenciais para regular a inflamação e trabalham em antagonismo (87,88).

O NF- κ B, fator de transcrição chave envolvido na expressão de genes pró-inflamatórios, quando ativado transloca para o núcleo das células, sendo capaz de induzir a expressão de genes promovendo, assim, uma resposta inflamatória. (89,90). O TGF- β , por sua vez, tem ação cicatrizante e sua alta marcação imuno-histoquímica pode sugerir uma relação com o processo de reparo da ONE.

Najafi *et al.* (80), conduziram uma pesquisa experimental *in vitro* que investigou os efeitos do consumo de diversos probióticos incluindo o

Lactiplantibacillus plantarum nas na modulação de vias inflamatórias, como o a do NF-κB e foram encontradas evidências que o consumo tanto profilático, como terapêutico de probióticos estava associado a uma redução significativa nos níveis de NF-κB e das citocinas IL-1β e IL-6 em células epiteliais gastrointestinais.

Outro exemplo palpável se trata do estudo em modelo animal de camundongos com colite ulcerativa de Quing Gu *et al.* (91), que foi posto em evidência que a administração de *Lactiplantibacillus plantarum* resultou em uma redução significativa da expressão do TNF-α e da IL-6. Além disso, os autores consideraram, em conclusão, que esse efeito pode ser mediado, em partes, pela inibição da via do NF-κB.

No presente estudo, a marcação de NF-κB foi consideravelmente menor no grupo ONE+LAC em relação ao ONE que apresentou maior expressão imunohistoquímica para essa proteína que qualquer outro grupo. Esse resultado coincide com os casos supracitados reiterando a capacidade dos Lactobacilos de modular a resposta inflamatória por meio da inibição do NF-κB em contextos de doenças (76; 85; 92)

O TGF-β se trata de uma proteína capaz de desempenhar um papel importante na regulação da síntese de componentes da matriz extracelular, como o colágeno. Sua ativação pode levar a um aumento na produção e deposição desses componentes, contribuindo para a formação de tecido cicatricial e no reparo (87).

No modelo experimental realizado no trabalho proposto, o aumento da marcação para TGF-β no tecido ósseo mandibular dos grupos LAC e ONE+LAC em relação aos demais, sugere que este probiótico pode estar influenciando a síntese e deposição de MEC, promovendo, potencialmente, uma cicatrização mais eficaz e uma resposta de reparo tecidual melhorada o que corrobora com os resultados expostos e discutidos anteriormente.

Apesar do grupo ONE+LAC ter apresentado menor marcação para TGF- β quando comparado ao grupo LAC, foi possível visualizar uma deposição de MEC acentuada nos grupos suplementados sem diferença estatística. Isto pode ser justificado considerando que TGF- β se trata de apenas uma das proteínas relacionadas ao processo de cicatrização, sendo necessário avaliar em outros

estudos a relação da suplementação com o LP 62 com proteínas que podem alterar a deposição de MEC como a IL-6 ou o TNF-alfa.

O estudo de Yushan Bu *et al.* (93), investigou o efeito probiótico de *Lactiplantibacillus plantarum* YRL45 na microecologia intestinal de camundongos, incluindo a avaliação dos níveis de expressão gênica de mucinas e zônula de oclusão e observou aumento dessas expressões nos animais suplementados representando que o probiótico LPYRL45 foi capaz de regular a barreira intestinal alterando a microbiota e aumentando a imunidade local.

O caso específico dos *Lactiplantibacillus plantarum*, não é diferente: Esta cepa tem, também, um forte efeito probiótico e sua capacidade de controlar a inflamação está intimamente ligada à sua relação com a microbiota intestinal como, por exemplo, por meio da redução da permeabilidade promovendo um fortalecimento da sua barreira. (94). Essas características, de fato, podem ser avaliadas por meio da imuno-histoquímica para zônula de oclusão: estrutura complexa de proteínas de caráter essencial na manutenção da integridade intestinal (95).

Relatos sobre os efeitos dos probióticos na proteção do trato gastrointestinal são amplamente descritos na literatura (96,97). Apresentando menor dano na zônula de oclusão presente no epitélio de revestimento do intestino, a suplementação com o LP62 iniciada de maneira preventiva, possuiu efeito imunomodulador no processo inflamatório. Além disso, obteve efeitos protetivos no trato gastrointestinal.

Segundo trabalho realizado por Cavalcanti e colaboradores (98), animais suplementados com *L. fermentum* com rinite alérgica e síndrome de asma apresentaram aumento de ZO-1 e manutenção da barreira tecidual do intestino. Esse comportamento não foi replicado no modelo de osteonecrose, já que no grupo ONE+LAC existiu uma redução da ZO em relação ao BASAL. Porém, considerando que o grupo ONE exibiu uma marcação ainda menor, é possível interpretar que o tratamento com o LP 62 trouxe uma melhor conservação da ZO de fato.

7. CONCLUSÃO

Macroscopicamente, o LP 6.2 diminuiu o grau de severidade das lesões mandibulares dos animais com ONMRM e microscopicamente apresentou resultados positivos no aumento da deposição da MEC representando efetividade no processo de cicatrização;

O LP 6.2 alterou os resultados das análises histoquímica, Imuno-histoquímica e morfométrica relacionada a propriedade de barreira intestinal, diminuindo a ação da via do NF-kB nos animais suplementados.

Por fim, a indução da ONE foi efetiva nos grupos submetidos ao uso do AZ todavia, a suplementação com LP 6.2 no tratamento da OMRM se mostrou eficaz para o reparo ósseo e epitelial e foi efetivo na redução da inflamação mediada pela via do NF-kB aumentando TGF- β nas lesões de osteonecrose mandibular.

8. REFERÊNCIAS

1. Enge Junior DJ, et al. Necroses avasculares: achados radiológicos e principais sítios de acometimento – ensaio iconográfico. *Radiol Bras.* 2019 Mai/Jun;52(3):187-192.
2. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018 May;55(3):308-327. doi: 10.1177/0004563218759371. Epub 2018 Mar 4. PMID: 29368538.
3. Soutome S, et al. Relationship between tooth extraction and development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–8.
4. Schwech N, Nilsson J, Gabre P. Incidence and risk factors for medication-related osteonecrosis after tooth extraction in cancer patients—A systematic review. *Clin Exp Dent.* 2023;9(1):55–65.
5. Brozoski MA, Traina AA, Deboni MCZ, Marques MM, Naclério-Homem MG. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):260-270.
6. Ruggiero SL, et al. American Association of oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Oct;72(10):1938-56.
7. AlDhalaan NA, BaQais A, Al-Omar A. Medication-related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. *Cureus.* 2020;12(2):e6944.
8. Giovannacci I, Meleti M, Manfredi M, Mortellaro C, Greco LA, Bonanini M, Vescovi P. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw Around Dental Implants: Implant Surgery-Triggered or Implant Presence-Triggered Osteonecrosis? *J Craniofac Surg.* 2016;27(3):697-701.
9. Soutome S, et al. Factors affecting development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving high-dose bisphosphonate or denosumab therapy: Is tooth extraction a risk factor? *PLoS ONE.* 2018;13(7):e0201343.
10. Chaves RAC, Queiroz TP, Faloni APS, Órfão AMA, Betoni-Júnior W. Bisfosfonatos e denosumabes: mecanismos de ação e algumas implicações para a implantodontia. *Rev Bras Multidiscip ReBraM.* 2018;21(2).
11. 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(5):848-860.
12. Mendes JM. Bisfosfonatos: aspetos de segurança. [Tese, Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto]. 2017.

13. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015;30(1):3-23.
14. MELLO NETO, João Martins de. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) sobre o processo de reparo alveolar de ratas tratadas com dose oncológica de zoledronato: estudo histológico, histométrico e histoquímico. 2015. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2015.
15. R. Graham G. Russell, Bisphosphonates: The first 40years, *Bone*, Volume 49, Issue 1, 2011, Pages 2-19, ISSN 8756-3282, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.022>.
16. Lee D, et al. Inhibition of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Bisphosphonate-conjugated Gold Nanoparticles. *Scientific Reports.* 2016;6:1–11.
17. Singh M, Gonedandla GS. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws (BIONJ). *J Maxillofac Oral Surg.* 2019;19(2):162–167.
18. Sturrock A, Preshaw PM, Hayes C, Wilkes S. Perceptions and attitudes of patients towards medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a qualitative study in England. *BJM Open.* 2019;9:1-7.
19. Atalay B, Yalcin S, Emes Y, Aktas I, Aybar B, Issever H, Mandel NM, Cetin O, Oncu B. Bisphosphonate-related osteonecrosis: laser assisted surgical treatment or conventional surgery? *Lasers Med Sci.* 2011; 26:815-823.
20. Vilela-Carvalho LN, et al. Osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicações: Diagnóstico, tratamento e prevenção. *CES Odontologia.* 2018;31(2):48–63.
21. Minamisako MC, Ribeiro GH, Lisboa ML, Cordeiro MRM, Grando LJ. Medication-Related Osteonecrosis of Jaws: A Low-Level Laser Therapy and Antimicrobial Photodynamic Therapy Case Approach. *Case Rep Dent.* 2016;6267406.
22. Tartaroti NC, Marques MM, Naclério-Homem MDG, Migliorati CA, Zindel Deboni MC. Antimicrobial photodynamic and photobiomodulation adjuvant therapies for prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: Case series and long-term follow-up. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101651.
23. Ervolino E, et al. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy mediated by butyl toluidine blue in preventing medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;40.
24. Ren D, et al. Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic *Lactobacillus* strains by in vivo tests. 2015;35:22-27.

25. Ong JS, et al. *Lactobacillus plantarum* USM8613 aids in wound healing and suppresses *Staphylococcus aureus* infection at wound sites. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020;12:125-137.
26. Ramos LP, et al. Antagonistic activity of *Lactiplantibacillus plantarum* 6.2 extracted from cocoa fermentation and its supernatant on *Gardnerella vaginalis*. *An Acad Bras Cienc*. 2022;94(3):e20210731.
27. Junqueira LCU. *Histologia básica I* L.C. Junqueira e José Carneiro. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
28. Deller T. *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch*. 5th ed. München: Elsevier; 2018.
29. Grabowski P. *Physiology of Bone*. *Endocr Dev*. 2015;28:33-55.
30. Souza RP, Batista FRdS. Osteonecrose de mandíbula e maxila relacionada ao uso de bifosfonato. *Rev Ibero-Am De Humanidades, Ciências E Educação*. 2022;8(5):1681–1706.
31. Adele L. Boskey; Mineralization of Bones and Teeth. *Elements* 2007;; 3 (6): 385–391. doi: <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.3.6.385>
32. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):229-238.
33. Rauner, M., Murray, M., Thiele, S. *et al.* Epo/EpoR signaling in osteoprogenitor cells is essential for bone homeostasis and Epo-induced bone loss. *Bone Res* **9**, 42 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00157>
34. Rosenberg N, Rosenberg O, Soudry M. Osteoblasts in bone physiology-mini review. *Rambam Maimonides Med J*. 2012 Apr 30;3(2):e0013. doi: 10.5041/RMMJ.10080. PMID: 23908837; PMCID: PMC3678809.
35. Weivoda, Megan M. et al. Identificação de fatores de acoplamento osteoclasto-osteoblasto em humanos revela ligações entre osso e metabolismo energético. *Nature communications* , v. 11, n. 1, p. 87, 2020.
36. Panahipour L, et al. TGF- β in the Secretome of Irradiated Peripheral Blood Mononuclear Cells Supports In Vitro Osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8569.
37. Jann J, Gascon S, Roux S, Fauchoux N. Influence of the TGF- β Superfamily on Osteoclasts/Osteoblasts Balance in Physiological and Pathological Bone Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 14;21(20):7597. doi: 10.3390/ijms21207597. PMID: 33066607; PMCID: PMC7589189.
38. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000 Sep 29;289(5488):1504-8. DOI: 10.1126/science.289.5488.1504.

39. Da Silva Simões MS, et al. A influência da terapêutica com bifosfonato na movimentação ortodôntica: uma revisão narrativa. *Rev Eletr Acervo Saúde*. 2022;15(4):e10099.
40. Cawley KM, et al. Local production of osteoprotegerin by osteoblasts suppresses bone resorption. *Cell Rep*. 2020;32(10).
41. Li B, et al. Roles of the RANKL–RANK Axis in Immunity—Implications for Pathogenesis and Treatment of Bone Metastasis. *Front Immunol*. 2022; 13:824117.
42. BOYCE, Brendan F.; XING, Lianping. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy*, v. 9, p. 1-7, 2007.
43. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol*. 2020;82(1):485–506.
44. Khan A, Morrison A, Cheung A, et al. Osteonecrosis of the jaw (ONJ): Diagnosis and management in 2015. *Osteoporos Int*. 2016;27:853-859.
45. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1115-1117.
46. Stopeck AT, Fizazi K, Body JJ, et al. Safety of long-term denosumab therapy: results from the open label extension phase of two phase 3 studies in patients with metastatic breast and prostate cancer. *Support Care Cancer*. 2016;24(1):447-455. doi:10.1007/s00520-015-2823-9
47. Fizazi K, Carducci M, Smith M, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet*. 2011;377(9768):813-822. doi:10.1016/S0140-6736(10)62344-6
48. Zhang, N., Zhang, Z. K., Yu, Y., Zhuo, Z., Zhang, G., & Zhang, B. T. (2020). Pros and cons of denosumab treatment for osteoporosis and implication for RANKL aptamer therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 325.
49. Yarom N, et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: MASCC/ISOO/ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(5):2270-2290.
50. Wu VM, et al. Empirical and theoretical insights into the structural effects of selenite doping in hydroxyapatite and the ensuing inhibition of osteoclasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020; 117:111257.
51. LI, Yuan-Yuan et al. Bisphosphonates and risk of cancers: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, v. 123, n. 10, p. 1570-1581, 2020.
52. Kuźnik A, et al. Bisphosphonates—much more than only drugs for bone diseases. *Eur J Pharmacol*. 2020; 866:172773.

53. Rogers MJ, Mönkkönen J, Munoz MA. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. *Bone*. 2020;139:115493.
54. KUROSHIMA, Shinichiro; SASAKI, Muneteru; SAWASE, Takashi. Medication-related osteonecrosis of the jaw: A literature review. *Journal of oral biosciences*, v. 61, n. 2, p. 99-104, 2019.
55. Chiarella E, et al. Targeting of mevalonate-isoprenoid pathway in acute myeloid leukemia cells by bisphosphonate drugs. *Biomedicines*. 2022;10(5):1146.
56. Soares AP. Efeitos do Pamidronato Dissódico sobre a Formação do Esmalte Dentário [Dissertação de Mestrado]. Ano: 2015.
57. Organização Mundial da Saúde (OMS) / Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Relatório do grupo de trabalho conjunto FAO/OMS sobre Avaliação de Probióticos em Alimentos. Geneva, Switzerland; 2002.
58. Marchezan ST, Mendes RH. Suplementação com probióticos para intolerância a lactose: uma revisão narrativa. *Revista Nutrição Brasil*. 2018;17(3):197-202. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/6622207>.
59. Choi S-H, Lee S-H, Kim MG, Lee HJ, Kim GB. *Lactobacillus plantarum* CAU1055 ameliorates inflammation in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells and a dextran sulfate sodium-induced colitis animal model. *J Dairy Sci*. 2019;102(8):6718-6725. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16197>.
60. Ciorba MA. A gastroenterologist's guide to probiotics. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(9):960-968.
61. Marco ML, Heeney D, Binda S, et al. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;44:94-102.
62. Kiymaci ME, Simsek D, Tok KC, Dirican D, Gumustas M. Probiotic potential and anti-quorum sensing activity of *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus kunkeei* isolates from *Apis mellifera*. *J Hellenic Vet Med Soc*. 2022;73(4):4717-4728.
63. Hao, R., Liu, Q., Wang, L., Jian, W., Cheng, Y., Zhang. Anti-inflammatory effect of *Lactiplantibacillus plantarum* T1 cell-free supernatants through suppression of oxidative stress and NF- κ B-and MAPK-signaling pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023; 89(10), e00608-23.
64. Han, K. J., Lee, J. E., Lee, N. K., & Paik, H. D. Antioxidant and anti-inflammatory effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU15149 derived from Korean homemade diced-radish kimchi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020; 30(4), 591.

65. Le B, Yang SH. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicol Rep.* 2018 Mar 2;5:314-317. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.02.007. PMID: 29854599; PMCID: PMC5977373.
66. Messias GC, Rocha AMN, Santos BMS, et al. Administration of *Lactobacillus plantarum* Lp62 to dam rats at the end of delivery and during lactation affects TGF- β 1 level and nutritional milk composition, and body weight of pups. *Eur J Nutr.* 2019;58(3):1137-1146. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1628-y>.
67. ERVOLINO, STATKIEVICZ C, TORO LF, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019;120:101-113
68. BIGUETTI, C. C.; CAVALLA, F.; SILVEIRA, E. M.; FONSECA, A. C.; VIEIRA, A. E.; TABANEZ, A. P. et al. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *Journal of Applied Oral Science*, v. 26, p. 1–24, 2018.
69. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 25, de 29 de setembro de 2015. ["Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal]. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2015.
70. FLECKNELL, P. *Laboratory animal anaesthesia.* 3^a ed. United Kingdom: Academic Press, 2009.
71. Santos CM, Pires MC, Leao TL, Hernández ZP, Rodriguez ML, Martins AK, et al. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiology.* 2016;162(7):1195-1207.
72. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-435.
73. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2010;510(7503):92-101.
74. Sartoria P, Rajcovichb G, Tabora N, Saleme Dazaa MC, Nallyc C. Osteonecrosis del maxilar inferior por bifosfonatos: presentación de caso. *Rev Argent Radiol.* 2015;79(1):40-46./ dos Santos, R. M., Boas, A. D. M. V., dos Santos, R. S. B. M., & Queiroz, J. M. P. (2024). OSTEONECROSE DOS MAXILARES ASSOCIADO AOS BISFOSFONATOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA. *Diálogos & Ciência*, 3(2), 54-62
75. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-21.

76. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa. 1ª Edição. São Paulo, 2019. Disponível em: https://ceua.unifesp.br/images/documentos/CEUA/Guia_Eutanasia_UNIFESP_ver_sao_final_042019.pdf. Acesso em: 10 mai. 2023.

77. Matthes H, Krummenerl T, Giensch M, Wolff C, Schulze J. Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:13.

78. Gómez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Aguilera M, Muñoz-Quezada S, Bermúdez-Brito M, Peso-Echarri P et al. Three main factors define changes in fecal microbiota associated with feeding modality in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57(4):461-466.

79. DORIGAN, M. C. et al. A osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 16, p. e92101623466–e92101623466, 7 dez. 2021.

80. Najafi, S., Sotoodehnejadnematalahi, F., Amiri, M. M., Pourshafie, M. R., & Rohani, M. (2023). Prophylactic vs. therapeutic effect of probiotics on the inflammation mediated by the NF-kb pathway in inflammatory bowel conditions. *Biomedicines*, 11(6), 1675.

81. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, Reid IR, Ruggiero SL, Taguchi A, Tetradis S, Watts NB, Brandi ML, Peters E, Guise T, Eastell R, Cheung AM, Morin SN, Masri B, Cooper C, Morgan SL, Obermayer-Pietsch B, Langdahl BL, Al Dabagh R, Davison KS, Kendler DL, Sandor GK, Josse RG, Bhandari M, El Rabbany M, Pierroz DD, Sulimani R, Saunders DP, Brown JP, Compston J; International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res*. 2015 Jan;30(1):3-23. doi: 10.1002/jbmr.2405.

82. Aghaloo TL, Cheong S, Bezouglaia O, et al. RANKL inhibitors induce osteonecrosis of the jaw in mice with periapical disease. *J Bone Miner Res*. 2014;29(4):843-854.

83. Lane NE, Yao W, Balooch M, Nalla RK, Balooch G, Habelitz S, Kinney JH, Bonewald LF. Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2006 Jan;21(1):466-76. doi: 10.1359/jbmr.051017.

84. Wan JT, Sheeley DM, Somerman MJ, Lee JS. Mitigating osteonecrosis of the jaw (ONJ) through preventive dental care and understanding of risk factors. *Bone Res*. 2020;8(1):14.

85. Molina-Tijeras JA, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME. The immunomodulatory properties of extracellular vesicles derived from probiotics: A novel approach for the management of gastrointestinal diseases. *Nutrients*. 2019 Apr 12;11(4):1038. doi: 10.3390/nu11041038. PMID: 31013866; PMCID: PMC6520887.).
86. PONTES JCXD, FIGUEIREDO LSD, LIMA WJDM, ARAÚJO RDS, SANTOS ABRD, ALMEIDA LDFDD, et al. Photodynamic therapy repairs medication-related osteonecrosis of the jaw by reducing NF-κB protein in rats. *Journal of Applied Oral Science*. 2024;32:e20230447.
87. Zhang, T., Ma, C., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2021). NF-κB signaling in inflammation and cancer. *MedComm*, 2(4), 618-653.
88. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012;26(3):203-34.
89. Massagué, J., & Sheppard, D. (2023). TGF-β signaling in health and disease. *Cell*, 186(19), 4007-4037.
90. Vincenzi, A., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2021). An evaluation of the effects of probiotics on tumoral necrosis factor (TNF-α) signaling and gene expression. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 57, 27-38.
91. Gu, Q., Chen, Z., Liu, N., Xia, C., Zhou, Q., & Li, P. (2023). Lactiplantibacillus plantarum ZJ316–fermented milk ameliorates dextran sulfate sodium–induced chronic colitis by improving the inflammatory response and regulating intestinal microbiota. *Journal of Dairy Science*, 106(11), 7352-7366.
92. Gharaee-Kermani M, Gyetko MR, Hu B, Phan SH. New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a potential role for stem cells in the lung parenchyma and implications for therapy. *Pharm Res*. 2007 Jan;24(1):819-41. doi: 10.1007/s11095-006-9209-8. Epub 2006 Nov 9. PMID: 17091377).
93. Bu, Y., Liu, Y., Zhang, T., Liu, Y., Zhang, Z., & Yi, H. (2023). Bacteriocin-producing Lactiplantibacillus plantarum YRL45 enhances intestinal immunity and regulates gut microbiota in mice. *Nutrients*, 15(15), 3437. ANEXO 1: Parecer emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais
- 94 Campana R, van Hemert S, Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog*. 2017 Jun 24;9:12. doi: 10.1186/s13099-017-0162-6.
95. Hollander D. Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep*. 1999 Oct;1(5):410-6. doi: 10.1007/s11894-999-0044-y.
96. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, et al. Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition*. 2013;2013:481651. doi:10.5402/2013/481651
97. Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the

scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66

98. Cavalcanti RFP, Gadelha FAAF, Ferreira LKDP, Ferreira LAMP, Chaves Júnior JV, Batista RSA, Melo TBL, Souza FS, Alves AF, Batista LM, Piuvezam MR. *Limosilactobacillus fermentum* modulates the gut-airway axis by improving the immune response through FOXP3 activation on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). *Immunobiology*. 2023;228(5):152721. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152721>.



Universidade Federal da Paraíba
**Comissão de Ética no
 Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM NO DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE EXPERIMENTAL EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 6141240423 (ID 001941), sob a responsabilidade de **Adriano Francisco Alves e equipe; Rayne Taveira Rocha do Nascimento; Jannerson Cesar Xavier de Pontes** - 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 04/08/2023.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF ORAL SUPPLEMENTATION WITH LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM ON THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL OSTEONECROSIS IN RATS", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 6141240423 (ID 001941), under the responsibility of **Adriano Francisco Alves and team; Rayne Taveira Rocha do Nascimento; Jannerson Cesar Xavier de Pontes** - 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 08/04/2023.

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

Vigência da Proposta: de **06/2023 a 12/2024** Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **25 a 30 dias**

Quantidade: **24**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 300 g**

João Pessoa, 30 de abril de 2024

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal da Paraíba



ANEXO 2: Resolução Normativa CONCEA

21/05/2024, 19:18

MCTI

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações

VOCÊ ESTÁ AQUI: PÁGINA INICIAL > LEGISLAÇÃO > RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 54, DE 10.01.2022

Resolução Normativa CONCEA nº 54, de 10.01.2022

10/01/2022

Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica e dá outras providências.

O CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 5º, incisos I, III e IV, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e considerando a decisão tomada em sua 53ª Reunião Ordinária, resolve:

Art. 1º Esta Resolução Normativa dispõe sobre o reconhecimento no País de métodos alternativos validados ao uso de animais que tenham por finalidade a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais em atividades de ensino e pesquisa.



Art. 2º Para os efeitos desta Resolução Normativa, considera-se:

I - método alternativo validado: método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa e cuja confiabilidade e relevância foram determinadas por meio de um processo que envolve os estágios de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas, e em conformidade com os procedimentos realizados por centros para validação de métodos alternativos ou por estudos colaborativos internacionais, podendo ter aceitação regulatória internacional, que visem atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que:

- a) não utilizem animais;
- b) usem espécies de ordens inferiores;
- c) empreguem menor número de animais;
- d) utilizem sistemas orgânicos ex vivos; ou
- e) diminuam ou eliminem o desconforto; e

II - método alternativo reconhecido: é o método alternativo validado, devidamente reconhecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Conceca, de observância obrigatória no País.

Art. 3º Os métodos alternativos validados e com aceitação regulatória nacional ou internacional passarão a ser obrigatórios no País a partir das publicações de Resoluções Normativas do Conceca no Diário Oficial da União, reconhecendo e nominando esses métodos, e indicando as fontes.

§ 1º As pessoas sujeitas às normas do Conceca terão o prazo de até 5 (cinco) anos para a observância dos referidos métodos, a contar da publicação da respectiva Resolução Normativa de que trata o *caput* deste artigo.

21/05/2024, 19:18

MCTI

§ 2º As pessoas sujeitas às normas do Concea que não cumprirem o determinado nesta Resolução Normativa sofrerão as sanções previstas na legislação aplicável.

Art. 4º A aplicação específica dos métodos alternativos reconhecidos pelo Concea, bem como a determinação de se destinar à substituição total, à substituição parcial ou à redução da utilização de animais na experimentação, encontrar-se-á descrita no próprio método e, como tal, deverá ser seguida.

Art. 5º Os métodos alternativos validados nacional ou internacionalmente, porém ainda não reconhecidos pelo Concea, poderão ser utilizados, sem prejuízo da competência prevista no inciso III do art. 5º da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Parágrafo único. A possibilidade prevista no caput deste artigo não dispensa a necessidade de observância de normas especiais editadas por outros entes e órgãos públicos com competência regulatória.

Art. 6º O reconhecimento do método alternativo validado ocorrerá por deliberação plenária do Concea, considerando o parecer da Câmara Permanente de Métodos Alternativos, ouvidos os entes e órgãos públicos com competências afins ou responsáveis pela fiscalização das atividades reguladas pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, a critério do Concea.

Art. 7º O Concea manterá em seu sítio eletrônico a lista de métodos alternativos reconhecidos, com as respectivas Resoluções Normativas de reconhecimento e com as fontes para acesso ao inteiro teor dos métodos.

Art. 8º O Concea decidirá sobre as situações não previstas nesta Resolução Normativa acerca do assunto.

Art. 9º Fica revogada a Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, sem prejuízo dos métodos alternativos anteriormente reconhecidos pelo Concea.

Art. 10. Esta Resolução Normativa entra em vigor em 1º de fevereiro de 2022.

MARCOS CESAR 
Presidente do CONCEA

Publicada no D.O.U. de 17/01/2022, Seção I, Pág. 18.

OS TEXTOS AQUI PUBLICADOS NÃO SUBSTITUEM AS RESPECTIVAS PUBLICAÇÕES NO D.O.U.

Revogações:

Resolução Normativa CONCEA nº 17, de 03.07.2014.

Veja também:

Resolução Normativa CONCEA nº 58, de 23.02.2023 - Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências.

Assuntos: Amparo à Pesquisa Experimentação Animal