

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**TAYLINE MROCZEK PEREIRA PINTO**

**EFEITO DO SILDENAFIL NA PREVENÇÃO DA OSTEONECROSE DE  
MANDÍBULA INDUZIDA POR BIFOSFONATOS**

**PONTA GROSSA**

**2021**

**TAYLINE MROCZEK PEREIRA PINTO**

**EFEITO DO SILDENAFIL NA PREVENÇÃO DA OSTEONECROSE DE  
MANDÍBULA INDUZIDA POR BIFOSFONATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Atenção Interdisciplinar à Saúde.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcela Claudino  
Coorientador: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Leandro Lipinski

**PONTA GROSSA**

**2021**

P65 Pinto, Tayline  
Efeito do Sildenafil na prevenção da osteonecrose de mandíbula induzida por bifosfonatos / Tayline Pinto. Ponta Grossa, 2021.  
42 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Marcela Claudino.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Lipinski.

1. Bifosfonatos. 2. Cirurgia bucal. 3. Inibidores da fosfodiesterase. 4. Osteonecrose. 5. Reparo ósseo alveolar. I. Claudino, Marcela. II. Lipinski, Leandro. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD:

TAYLINE MROCZEK PEREIRA PINTO

EFEITO DO SILDENAFIL NA OSTEONECROSE DE MANDÍBULA  
INDUZIDA POR BIFOSFONATOS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de concentração Atenção Interdisciplinar à Saúde.

Ponta Grossa, 11 de novembro de 2021.



Marcela Claudino  
Doutora – UEPG



Gustavo Pompermaier Garlet  
Doutor - Faculdade de Odontologia de Bauru



Gilson César Nobre Franco  
Doutor - UEPG

Dedico aos meus pais, Fernando e Rodimara.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha **família** pelo amor, incentivo e apoio incondicional que sempre me proporcionaram. Agradeço a minha mãe, **Rodimara**, que me apoiou, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai, **Fernando**, onde sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. A eles que me incentivaram e inspiraram através de gestos e palavras a superar todas as dificuldades. À minha irmã, **Maria Fernanda**, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando no que fosse preciso. Sem vocês a realização desse sonho não seria possível.

Ao meu namorado, **Alexandre**, por todo apoio e paciência. Agradeço por toda a companhia e companheirismo, por me aturar em todos os meus momentos de estresse e mau humor, sempre me mostrando o lado mais positivo de tudo.

A minha orientadora, Dra. **Marcela Claudino**, que mesmo sem me conhecer no início, confiou na minha capacidade e no meu trabalho. Obrigada por todas as oportunidades em diferentes projetos e na sala de aula. Obrigada por sempre estar ao meu lado mesmo nos momentos mais complicados. Continue sendo essa pessoa e profissional incrível.

Ao meu “orientador”, Dr. **Gilson Cesar Nobre Franco**, que me deu a primeira oportunidade de ingressar na área de pesquisa. Obrigada por estar sempre disponível auxiliando e compartilhando todo seu enorme conhecimento. Por sempre me incentivar a seguir os meus sonhos. Por ser essa pessoa que admiro. Obrigada.

Ao meu co-orientador, Dr. **Leandro Lipinski**, que me apoiou em todas as minhas ideias, pelas parcerias nos projetos e que sempre esteve ao meu lado quando precisei. Obrigada por toda colaboração.

Aos meus colegas da osteonecrose, **Leomar, Jéssica e Gabrielle**, que fizeram parte desse projeto. Pelo apoio, ajuda, dedicação, paciência e confiança nessa minha trajetória. Por todas as risadas e os trabalhos na UEPG, mesmo nos finais de semana desde 2016. Eu posso dizer que a minha formação não teria sido a mesma sem vocês. Obrigada por tudo.

Aos meus queridos amigos coorientados, **Cassiano, Luise, Gabriela, Amanda, Larissa, Ana Paula, Arielen, Juliane, Milena, Ana Paula, Débora e Hemily**, sem vocês essa pesquisa não seria possível. Vocês são maravilhosas e

terão a minha eterna gratidão por toda ajuda que me deram. Obrigada por fazerem parte dessa caminhada comigo.

A **Mari e Jo**, que estiveram sempre dispostas a nos ajudar no biotério, cuidadosas com nossos ratinhos e sempre amáveis conosco.

À **todos os professores** que me acompanharam no mestrado.

Aos **colegas de mestrado** que ingressaram nessa jornada comigo.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, onde realizei minha graduação e finalizo agora a Pós-Graduação. Obrigada pela estrutura, pelos professores e pelo suporte financeiro. Obrigada pelos melhores anos da minha vida.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da minha vida e que contribuíram para o meu crescimento como pessoa. Muito obrigado.

“Depois de escalar uma montanha muito alta,  
descobrimos que há muitas outras montanhas  
por escalar”.

(Nelson Mandela)



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Delineamento experimental.....	23
Figura 2 –	Avaliação clínica da hemimandíbula esquerda dos grupos C, BF e SIL. No grupo BF e SIL, a seta branca aponta área de exposição óssea, e a seta preta aponta área de edema e eritema. O asterisco mostra área de ausência de úlcera, exposição óssea nos grupos C e SIL.....	27
Figura 3 –	Avaliação radiográfica das hemimandíbulas dos grupos C, BF e SIL. O grupo BF e SIL apresenta regiões radiolúcidas. A, B e C imagens aproximadas.....	28
Figura 4 –	Representação gráfica da presença de osteonecrose no grupo BF. A- Área necrótica; B- Número de lacunas vazias; C- Número de osteócitos e D- Número de osteoclastos. Os resultados estão expressos como média e DP (n=10). A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Área necrótica, número de lacunas vazias e número de osteócitos: ANOVA, Tukey, p <0,05) (Número de osteoclastos: Kruskal-Wallis, Dunn's, p <0,05).....	29
Figura 5 –	Avaliação histológica da hemimandíbula esquerda dos grupos C, BF e SIL. Em A, observar a representação esquemática da casualização dos campos, marcados em preto. Nos grupos C e SIL, observar a presença de vasos sanguíneos (estrela) e de lacunas com osteócitos (seta branca), caracterizando o tecido ósseo com vitalidade. No grupo BF, observar a presença de lacunas vazias (seta amarela), caracterizando a necrose óssea.....	30
Figura 6 –	Quantificação da fosfatase alcalina óssea nos grupos C, BF e SIL. Os resultados estão expressos como média e DP dos valores da fosfatase alcalina óssea (n=10). A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, Tukey, p <0,05).....	31
Figura 7 –	Representação gráfica vascularização óssea. A- Média da fluxometria sanguínea (ua). B- Número de vasos sanguíneos por $\mu\text{m}^2$ . Os resultados estão expressos como média e DP (n=10). A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (A - Kruskal-Wallis, Dunn's, p <0,05; B - ANOVA, Tukey, p <0,05).....	31
Figura 8 –	Incidência de MRONJ. Os resultados estão expressos como média e DP (n=10). A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn's, p <0,05).....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação da Severidade da MRONJ.....	25
Tabela 2 –	Análise clínica macroscópica das hemimandíbulas.....	26
Tabela 3 –	Análise radiográfica das hemimandíbulas.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais
ANOVA	Análise da Variância
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AZ	Ácido Zoledrônico
BFs	Bifosfonatos
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CYR-61	Cisteína rica-61
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FAO	Fosfatase alcalina óssea
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
MRONJ	Osteonecrose de mandíbula relacionada a medicamentos
NaCl	Cloreto de sódio
NAEVI	Núcleo Avançado de Estudos da Vida
ON	Óxido nítrico
RG	Reparo gradual
RR	Raiz Residual
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratórios
SO	Sequestro ósseo
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VO	Via oral
UI	Unidades Internacionais

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>SILDENAFIL REDUZ A OSTEONECROSE DE MANDÍBULA INDUZIDA POR BIFOSFONATOS EM RATOS .....</b>	<b>17</b>
3.1	INTRODUÇÃO .....	20
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.2.1	Animais e Considerações Éticas .....	21
3.2.2	Desenho Experimental .....	22
3.2.3	Análise Clínica.....	23
3.2.4	Análise do Fluxo Sanguíneo.....	23
3.2.5	Análise Sérica da Fosfatase Alcalina .....	24
3.2.6	Análise Radiográfica.....	24
3.2.7	Análise Histopatológica .....	24
3.2.8	Classificação da Severidade de MRONJ.....	25
3.2.9	Análise Estatística .....	25
3.3	RESULTADOS .....	26
3.3.1	Análise Clínica.....	26
3.3.2	Análise da Remodelação Óssea .....	27
3.3.3	Análise da Vascularização Óssea .....	31
3.3.4	Severidade de Osteonecrose .....	32
3.4	DISCUSSÃO .....	32
3.5	REFERÊNCIAS.....	35
	<b>ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO NA CEUA.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A osteonecrose da mandíbula relacionada à medicação (“Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw” ou MRONJ) é estabelecida como uma condição potencialmente dolorosa e debilitante (RUGGIERO et al., 2014). De acordo com a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS), a MRONJ é caracterizada como exposição óssea não cicatrizante na região maxilofacial que persiste por mais de oito semanas, em paciente sob tratamento atual ou anterior com agentes antirreabsortivos ou antiangiogênicos e sem histórico de radioterapia ou doença metastática evidente na região da cabeça e pescoço (VILELA-CARVALHO et al., 2018, ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).

Dentre estes agentes antirreabsortivos, o ácido zolendrônico, pertencente da classe dos BFs, liga-se fortemente aos cristais de hidroxiapatita e se acumula de 1-2% nos tecidos mineralizados. Após o terceiro ano de terapia, sua incidência pode aumentar em até 21% (MARX, 2003; ALMEIDA et al., 2018; STRAMANDINOLIZANICOTTI et al., 2018; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2020). São utilizados para o tratamento da osteoporose e de metástases ósseas, uma vez que atuam como potentes inibidores da reabsorção óssea e da angiogênese capilar (ROELOFS et al., 2006; GONÇALVES, 2018).

O mecanismo pelo qual os BFs atuam comprometendo a morfologia e atuação dos osteoclastos, bem como na indução de apoptose destas células, é baseado na inibição da enzima farnesil difosfato sintetase (CHAVES et al., 2018; HOLSTEIN, 2019). A atividade antiangiogênica exercida pelos BFs diminui o suprimento vascular, possibilitando a ocorrência de isquemia e, conseqüentemente, de necrose tecidual (SANTOS et al., 2008; LI; WANG, 2020). Esses BFs são cada vez mais prescritos, podendo chegar até 190 milhões de prescrições por ano em todo mundo (RUGGIERO et al., 2014).

Em relação à prevalência de MRONJ, são relatados 1 a 15% em pacientes oncológicos recebendo bifosfonatos em altas doses e 0,001-0,01% em pacientes com osteoporose tratados com BFs em baixas doses (KHAN et al., 2017; ADACHI et al., 2020). Portanto, MRONJ vem sendo fortemente relacionada com uso deste fármaco, sendo sua ocorrência mais acentuada com a administração intravenosa

(HOWIE et al., 2015). Neste contexto, o tratamento da MRONJ é complexo e nenhum protocolo de tratamento eficaz ainda foi estabelecido (ADACHI et al., 2020).

Com base em seus efeitos estimulatórios nos vasos sanguíneos e no tecido ósseo, o sildenafil se torna uma alternativa relevante para o tratamento da MRONJ. É um medicamento considerado inibidor seletivo da fosfodiesterase-5 que atua aumentando o GMPc intracelular (KARAKOYUN et al., 2011; DINCEL et al., 2018). De fato, vários estudos demonstraram que o sildenafil apresenta efeitos angiogênicos devido à regulação de diferentes fatores de crescimento pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e do aumento da estimulação da via do óxido nítrico (ON) que acarreta em uma melhora na recuperação tecidual após uma patologia isquêmica e aumento da formação de tubo capilar (KONERU et al., 2008; VIDAVALUR et al., 2006; ORCHARD et al., 2017; SONG et al., 2017; BERKET et al., 2018).

Histing et al. em 2011, foi o primeiro a demonstrar que o tratamento com sildenafil acelera o reparo de fraturas em decorrência do aumento na deposição óssea. Este efeito no metabolismo ósseo pode ser decorrente da expressão de fatores angiogênicos e osteogênicos, como o VEGF e cisteína rica-61 (CYR-61), e também, da regulação da diferenciação dos osteoblastos (HART et al., 2006; GHOFRANI; OSTERLOH; GRIMMINGER et. al., 2006; AFZAL; POLAK; BUTTERY, 2014). Outro efeito relacionado é a ação anti-inflamatória relacionada a produção de citocinas e inibição do estresse oxidativo por meio de um mecanismo dependente do ON, reduzindo a adesão e infiltração leucocitária (SANTOS et al, 2005; YILDIRIM et al, 2010; KARAKOYUN et al, 2011; PIFARRE et al., 2011; GOKAKIN et al., 2013; SOARES et al., 2018).

Assim, este fármaco se mostra eficaz no tratamento da disfunção erétil, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar, neuropatias, isquemia cardíaca, diabetes, fraturas e defeitos ósseos (SONG et al., 2017). Nestas doenças, é importante ressaltar a presença do componente isquêmico, indicando o potencial terapêutico do sildenafil. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito profilático da administração de sildenafil no desenvolvimento de osteonecrose de mandíbula pós-exodontia em ratos submetidos ao tratamento sistêmico com bifosfonatos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos profiláticos da administração de sildenafil no desenvolvimento de osteonecrose de mandíbula pós-exodontia em ratos submetidos ao tratamento sistêmico com bifosfonato.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito do sildenafil sobre a incidência e severidade da osteonecrose por meio de análise clínica, imaginológica e histológica no reparo da região do alvéolo pós-exodontia em ratos submetidos ao tratamento sistêmico com ácido zolendrônico.

Avaliar o efeito do sildenafil sobre os níveis séricos de fosfatase alcalina em ratos submetidos ao tratamento sistêmico com ácido zolendrônico.

Avaliar o efeito do sildenafil sobre o fluxo sanguíneo no reparo da região do alvéolo pós-exodontia em ratos submetidos ao tratamento sistêmico com ácido zolendrônico.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI, N. et al. Preventive effect of fluvastatin on the development of medication related osteonecrosis of the jaw. **Scientific report**, v.10, n.5620, p.1-8, mar. 2020.
- AFZAL, F.; POLAK, J.; BUTTERY, L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. **Journal Pathology**, v. 202, n.4, p.503-510, abr. 2014.
- ALDHALAAN, N. A.; BAQAIS, A.; AL-OMAR, A. Medication-related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. **Cureus**, v.12, n.2, p.1-11, fev. 2020.
- ALMEIDA, A. D. et al. Safety and efficacy of hydroxyapatite scaffold in the prevention of jaw osteonecrosis in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 5, p. 1799-1808, 2018.
- BEREKET, C. et al. Efeitos terapêuticos benéficos do sildenafil na cicatrização óssea em animais tratados com bisfosfonato. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v.21, n.2, p.217-224, fev. 2018.
- CHAVES, R. A. C. et al. Bifosfonatos e Denosumabes: mecanismos de ação e algumas implicações para a implantodontia. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v.21, n.2, p.66-80, maio 2018.
- DINCEL, Y. M. et al. Biomechanical, histological, and radiological effects of different phosphodiesterase inhibitors on femoral fracture healing in rats. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v.26, n.2, p.1–9, abr. 2018.
- GOKAKIN, A. K. et al. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. **Burns**, v.39, n.6, p.1193-1199, set. 2013.
- GONÇALVES, F. C. **Influência do estrôncio não radioativo na prevenção do processo de osteonecrose induzida por bisfosfonato**. 2018, 57f. Dissertação (Mestrado em odontologia) - Faculdade de Odontologia da UNESP, Araraquara, 2018.
- GHOFRANI, H. A.; OSTERLOH, I. H.; GRIMMINGER, F. Sildenafil: From angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, p.689-702, ago. 2006.
- HART K. et al. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. **Laryngoscope**, v.116, p. 522-528, abr. 2006.
- HISTING, T. et al. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. **Journal of Orthopedic Research**, v.29, p. 867-873, jan. 2011.
- HOLSTEIN S. A. A patent review of bisphosphonates in treating bone disease. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, v. 29, n. 1, p. 315-325, abr. 2019.



HOWIE, R. N. et al. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. **Plos One**, v.10, n.7, p.1-16, jul. 2015.

KARAKOYUN, B. et al The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. **Life Science**, v.89, p.402-407, jul. 2011.

KHAN, A. A. et al. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management From the International Task Force on ONJ. **Journal of Clinical Densitometry**, v.20, p.8–24, jan. 2017.

KONERU, S. et al. Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: Role of VEGF/angiopoietin-1. **Journal Cellular Molecular Medicine**, v.12, n.6B, p.2651-2664, mar. 2008.

LI, J.; WANG, W.. Positive effect of pentoxifylline on medication-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Stomatology*, **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 19, n. 7, p. 1-13, jun. 2020.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.61, n.9, p.1115-1117, set. 2003.

ORCHARD, E. et al. Sildenafil Transiently Delays Early Alveolar Healing of Tooth **Clinical Surgery**, v.2, n.1458, p.1-12, maio 2017.

PIFARRE, P. et al. Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v.121, n.4, p.499-508, abr. 2011.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, M. D. P. et al. The Effectiveness of the Low-Level Laser, Antibiotic and Surgical Therapy in the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Case Report. **Journal Lasers Medical Sciences**, v.11, n.1, p.98-103, jan. 2020.

ROELOFS, A. J. et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. **Clinical Cancer**, v. 12, n. 20, p. 6222–31, out. 2006.

RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 10, p.1938-1956, out. 2014.

SANTOS, C. L. et al. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **British Journal of Pharmacology**, v.146, n.4, p.481–486, ago. 2005.

SANTOS, P. S. S. et al. Osteonecrose maxilar em pacientes portadores de doenças neoplásicas sob uso de bisfosfonatos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30, n.6, p.501-504, out. 2008.

SOARES, D. M. et al. Sildenafil citrate on experimental periodontitis in rats: microtomographic and histological analyses. **Oral Diseases**, v.24, n.6, p.1073-1082, fev. 2018.

SONG, Q. et al. Sildenafil improves blood perfusion in steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbits via a protein kinase G-dependent mechanism. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v.51, n5, p.398-403, jul. 2017.

STRAMANDINOLI-ZANICOTTI, R. T. et al. Dental implants in patients under bisphosphonate therapy: is the risk of osteonecrosis of the jaw and implant loss real? Report of three clinical cases. **Revista Sul-brasileira de Odontologia**, v. 15, n. 1, p. 50-59, set. 2018.

VIDAVALUR, R. et al. Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. **Vascular Pharmacology**, v.45, n.2, p.91-95, mar. 2006.

VILELA-CARVALHO, L. N. et al. Osteonecrosis de los maxilares relacionados con el uso de medicamentos: Diagnóstico, tratamiento y prevención. **Revista CES Odontologia**, v.31, n.2, p.48-63, dez. 2018.

YILDIRIM, A. et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. **Pulmonary Pharmacology Therapeutics**, v.23, n.3, p.215-221, jun. 2010.

### 3 SILDENAFIL REDUZ A OSTEONECROSE DE MANDÍBULA INDUZIDA POR BIFOSFONATOS EM RATOS

Tayline Mroczek<sup>a\*</sup>, Gabrielle Delfrate<sup>b</sup>, Leomar Emanuel Almeida Mecca<sup>c</sup>, Jéssica Daniela Andreis<sup>d</sup>, Leandro Cavalcante Lipinski<sup>e</sup>, Daniel Fernandes<sup>f</sup>, Gustavo Pompermaier Garlet<sup>g</sup>, Gilson Cesar Nobre Franco<sup>h</sup>, Marcela Claudino<sup>i</sup>

<sup>a</sup> M.Sc., Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa (PR), Brasil, CEP: 84030-900. Email: [tayline\\_mpp@hotmail.com](mailto:tayline_mpp@hotmail.com).

<sup>b</sup> Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa (PR), Brasil, CEP: 84030-900. Email: [g\\_delfrate@hotmail.com](mailto:g_delfrate@hotmail.com)

<sup>c</sup> Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa (PR), Brasil, CEP: 84030-900. Email: [leoo.mecca@gmail.com](mailto:leoo.mecca@gmail.com)

<sup>d</sup> M.Sc., Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa (PR), Brasil, CEP: 84030-900. Email: [jdandreis@outlook.com](mailto:jdandreis@outlook.com)

<sup>e</sup> M.Sc., Ph.D, Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa (PR), Brasil, CEP: 84030-900. Email: [leandrolipinski@yahoo.com.br](mailto:leandrolipinski@yahoo.com.br)

<sup>f</sup> M.Sc., Ph.D, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). R. Engenheiro Agrônomo Andrei Cristian Ferrira, s / n - Trindade, Florianópolis (SC), Brasil, CEP: 88040-900. Email: [fernandesfarmaco@yahoo.com.br](mailto:fernandesfarmaco@yahoo.com.br)

<sup>g</sup> M.Sc., Ph.D, Departamento de Odontologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla - Jardim Brasil, Bauru (SP), Brasil, CEP: 17012-901. Email: [garletgp@usp.br](mailto:garletgp@usp.br)

<sup>h</sup> M.Sc., Ph.D, Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa (PR), Brasil, CEP: 84030-900. Email: [gilsoncnf@gmail.com](mailto:gilsoncnf@gmail.com)

<sup>i</sup> M.Sc., Ph.D, Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa (PR), Brasil, CEP: 84030-900. Email: [marcelaclaudino@hotmail.com](mailto:marcelaclaudino@hotmail.com)

\* Autor para correspondência: Tayline Mroczek, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, General Carlos Cavalcanti, 4748, CEP: 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Email: [tay\\_mpp@hotmail.com](mailto:tay_mpp@hotmail.com)

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar o efeito profilático da administração de sildenafil no desenvolvimento de osteonecrose de mandíbula pós-exodontia em ratos submetidos ao tratamento sistêmico com ácido zoledrônico (AZ).

**Metodologia:** Trinta ratos machos Wistar foram divididos em três grupos iguais: C (solução salina, n=10), BF (AZ + solução salina, n=10) e SIL (AZ + SIL, n=10). O experimento foi iniciado (dia 0) com a aplicação de AZ 0,1 mg/kg duas vezes por semana durante 12 semanas. Na quinta semana, o grupo SIL iniciou a profilaxia com 10mg/kg/dia de sildenafil. Após uma semana do início da profilaxia, todos os grupos foram submetidos a exodontia. No fim da semana 12, foi realizada a eutanásia de todos os animais e coleta das amostras. A presença e severidade da osteonecrose foram avaliadas pela análise clínica, imaginológica e histológica da hemimandíbula. Além disso, o fluxo sanguíneo local e os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea também foram analisados.

**Resultados:** O tratamento profilático com sildenafil diminuiu significativamente a incidência de úlceras, eritema, edema, área necrótica, número de lacunas vazias e aumentou o reparo gradual, número de osteócitos e níveis séricos de fosfatase alcalina quando comparado ao grupo BF ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** O sildenafil apresenta efeitos positivos na remodelação óssea, o qual melhora a cicatrização. Portanto, pode ser utilizado como adjuvante na prevenção da MRONJ.

**Palavras chave:** Bifosfonatos, Cirurgia Bucal, Inibidores da Fosfodiesterase, Osteonecrose, Reparo ósseo alveolar.

## ABSTRACT

**Objectives:** Evaluate the prophylactic effect of the administration of sildenafil after tooth extraction, in the therapy of medication-related jaw osteonecrosis (MRONJ) in rats submitted to systemic treatment with zoledronic acid (AZ).

**Methodology:** Thirty male Wistar rats were divided into three equal groups: C (saline, n=10), BF (AZ + saline, n=10) and SIL (AZ + SIL, n=10). The experiment was started (day 0) with the application of AZ 0.1 mg/kg twice a week for 12 weeks. In the 5th week, the SIL group started prophylaxis with 10mg/kg/day of sildenafil. One week after starting prophylaxis, all groups underwent tooth extraction. At the end of week 12, all animals were euthanized and samples were collected. The presence and severity of osteonecrosis were evaluated by clinical, imaging and histological analysis of the jaw. In addition, was analyzed the local blood flow and serum bone alkaline phosphatase levels.

**Results:** Prophylactic treatment with sildenafil significantly reduced the incidence of ulcers, erythema, edema, necrotic area, number of empty gaps and increased the gradual repair, number of osteocytes and serum alkaline phosphatase levels when compared to the BF group ( $p < 0,05$ ).

**Conclusions:** Sildenafil has positive effects on bone remodeling, which improves healing. Therefore, it can be used as an adjuvant in the prevention of MRONJ.

**Keywords:** Bisphosphonates, Oral Surgery, Phosphodiesterase Inhibitors, Osteonecrosis, Alveolar bone repair.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose da mandíbula relacionada à medicação (*Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw* ou MRONJ) é caracterizada pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (AAOMS) como exposição óssea na região maxilofacial que persiste por mais de oito semanas, em paciente sob tratamento atual ou anterior com agentes antirreabsortivos ou antiangiogênicos e sem histórico de radioterapia ou doença metastática evidente na região da cabeça e pescoço (Vilela-carvalho et al., 2018, Aldhalaan; Baqais; Al-Omar, 2020).

Dentre estes agentes antirreabsortivos, o ácido zolendrônico, pertencente da classe dos bifosfonatos (BFs), liga-se fortemente aos cristais de hidroxiapatita e se acumula de 1-2% nos tecidos mineralizados. Após o terceiro ano de terapia, sua incidência pode aumentar em até 21% (Marx, 2003; Rodríguez-Sánchez et al., 2020). São indicados para o tratamento de osteoporose, hipercalcemia, mieloma múltiplo e metástases ósseas (Aldhalaan, Baqais, & Al-Omar, 2020; Adachi et al., 2020) atuando como potentes inibidores da reabsorção óssea e da angiogênese capilar (Roelofs et al., 2006).

Os BFs inibem enzima farnesil difosfato sintetase que compromete a morfologia e a atuação dos osteoclastos prejudicando a reabsorção óssea (Chaves et al., 2018; Holstein, 2019). Ao mesmo tempo em que diminuem o suprimento vascular, levando a isquemia e necrose tecidual (Santos et al., 2008; Li; Wang, 2020). Estes mecanismos associados a inflamação e infecção local (Howie et al., 2015; Kang; Park; Kim, 2020), contribuem para a patogênese da MRONJ, a qual permanece parcialmente elucidada. Assim, o tratamento da MRONJ é complexo e nenhum protocolo efetivo de prevenção foi estabelecido (Adachi et al., 2020).

Neste contexto, o sildenafil, inibidor seletivo da fosfodiesterase-5 utilizado para disfunção erétil, pode ser uma alternativa no tratamento da MRONJ devido seus efeitos angiogênicos, elevação da deposição óssea e ação anti-inflamatória (Karakoyun et al., 2011; Dincel et al., 2018). Vários estudos demonstram ação angiogênica devido à regulação de fatores de crescimento pró-angiogênicos e estimulação da via do óxido nítrico (ON) (Koneru et al., 2008; Vidavalur et al., 2006; Orchard et al., 2017; Song et al., 2017; Bereket et al., 2018). O efeito no

metabolismo ósseo é decorrente da expressão de fatores angiogênicos, osteogênicos e da regulação dos osteoblastos (Hart et al., 2006; Ghofrani; Osterloh; Grimminger et. al., 2006; Afzal; Polak; Buttery, 2014). E, por fim, a ação anti-inflamatória relacionada á produção de citocinas e inibição do estresse oxidativo, reduzindo a adesão e infiltração leucocitária (Santos et al, 2005; Yildirim et al, 2010; Karakoyun et al, 2011; Pifarre et al., 2011; Gokakin et al., 2013; Soares et al., 2018). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito profilático da administração de sildenafil no desenvolvimento de osteonecrose de mandíbula pós-exodontia em ratos submetidos ao tratamento sistêmico com ácido zolendrônico.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Animais e Considerações Éticas

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) de 90 dias, com peso entre 250 a 300g, provenientes do Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI, UEPG). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (4 ou 5 animais cada) com regime 12/12h (claro e escuro), temperatura controlada (25°C), dieta comercial normoprotéica (Nuvilab CR, Quimtia, Colombo, PR, Brasil) e água natural *ad libitum*. Todo o período de experimento seguiu as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e as diretrizes da *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) (Percie du Sert et al., 2020). Além disso, o delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (Ponta Grossa/Paraná-Brasil) (protocolo 0045167-2019).

A partir do programa G\*Power 3.1 (GPower, Universität Düsseldorf, Düsseldorf, North Rhine-Westphalia, Germany) foi obtido o cálculo do tamanho amostral com base nos dados de Mecca et al. (2018), que em seu experimento animal induziu MRONJ a partir de ácido zoledrônico (AZ). Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder do teste em 85% e um tamanho de efeito (d de Cohen) de 0,5 ([www.3Rs-Reduction.co.uk](http://www.3Rs-Reduction.co.uk)). Assim, o tamanho amostral foi estabelecido com base na variável MRONJ, resultando no n=10. Considerando possíveis perdas e erros metodológicos de 20-

30%, considerou-se um “n” amostral de 14 animais por grupo. O nível de significância adotado foi de  $p=0,05$ .

### 3.2.2 Desenho Experimental

Trinta ratos Wistar machos foram divididos em 3 grupos iguais ( $n=10$ ). Não foram utilizados critérios de inclusão ou exclusão. O modelo de indução de MRONJ foi adaptado de Cordova et al. (2016), baseado na administração de ácido zoledrônico (AZ) (Sigma-Aldrich, Charleston, WV, EUA) intraperitoneal (IP) na dose de 0,1 mg/kg, duas vezes por semana durante 12 semanas, nos grupos BF (bifosfonato) e SIL (bifosfonato+sildenafil) em um intervalo de tempo de 24 horas a partir do dia 0. A dose total de AZ administrada foi equivalente a quatro semanas de terapia para mieloma múltiplo em um adulto de 70 kg (Pozzi et al., 2009). O grupo C (controle) recebeu 1mL de NaCl 0,9% via gavagem.

A partir da quinta semana até o final do experimento, os grupos C e BF recebeu 1mL de NaCl 0,9% via gavagem e o grupo SIL recebeu 10mg/kg/dia de sildenafil (Valdequímica, São Paulo, SP, Brasil) via gavagem (Reagan-shaw, Nihal e Ahmad; 2007). Após seis semanas do início do experimento, todos os grupos foram submetidos ao procedimento de exodontia bilateral do primeiro molar inferior, sob efeito de anestesia geral com 70 mg/kg de Quetamina (Cetamin®; Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 10 mg/kg de Xilazina (Xilasin®; Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil). Esse procedimento foi realizado com uma sonda entre o primeiro e segundo molar e realizado movimento para a luxação do dente. Depois foi colocada entre as raízes realizando o movimento de alavanca para exteriorização do elemento dental. Ao término do procedimento, os animais foram mantidos aquecidos e separados até o retorno da anestesia (Howie et al., 2015).

No período de 48 horas e de doze semanas pós-exodontia, o sítio cirúrgico foi inspecionado para a confirmação do desenvolvimento de osteonecrose. Na semana 12, a aplicação de AZ, NaCl 0,9% e sildenafil foi encerrada e todos os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de quetamina (210 mg/kg IP; Cetamin®; Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e xilazina (30 mg/kg IP; Xilasin®; Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) (Figura 1).



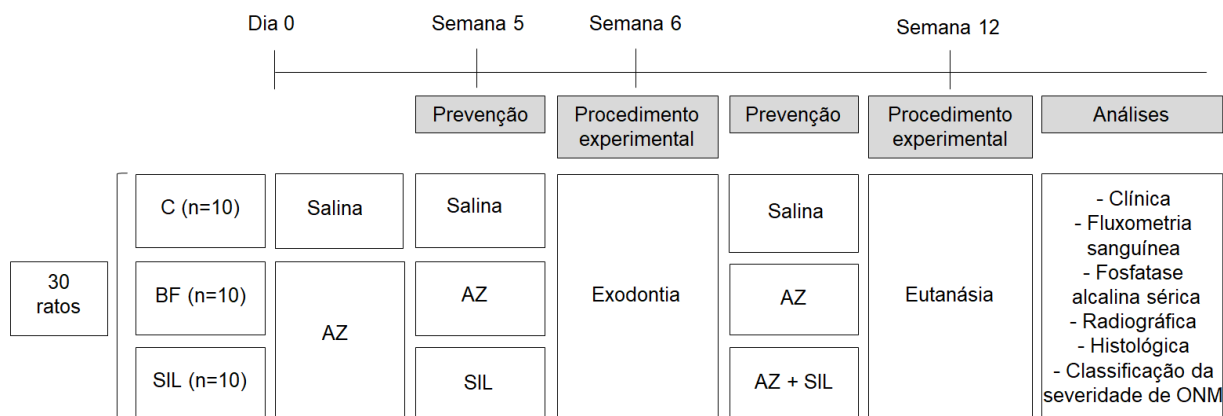


Figura 1. Delineamento experimental. Fonte: a autora.

### 3.2.3 Análise Clínica

No dia da eutanásia, os animais foram posicionados em camas de experimentação apropriadas sob efeito anestésico. As áreas de extrações dentárias foram inspecionadas por um examinador cego, quanto à presença/ausência de úlcera, fístula, edema, eritema e exposição óssea.

### 3.2.4 Análise do Fluxo Sanguíneo

A mensuração do fluxo sanguíneo na região do alvéolo foi realizada por meio de um dispositivo laser Doppler Blood Flow Monitor (Moor Instruments Ltd, Axminster, Reino Unido) de um equipamento laser de diodo de arseneto de gálio e alumínio (BioWave LLLT Kondortec, São Carlos, Brasil) emitindo à 660 nm constantemente. A ponta da sonda foi colocada numa distância vertical de 1mm com posicionamento estável. A banda Doppler do instrumento foi fixada a 15 kHz segundo a metodologia proposta por Núñez et. al. (2004) e foram realizadas três leituras distintas de 30 segundos em cada alvéolo com posterior média e analisados por um examinador cego pelo software fornecido pelo fabricante, MoorSoft para Windows / moorLDLS2 (Moor Instruments Ltd, Reino Unido).

### 3.2.5 Análise Sérica da Fosfatase Alcalina

Após a punção do sangue, os tubos sem anticoagulante com gel separador foram utilizados e submetidos à centrifugação em 3000 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos para separação do soro. O soro foi coletado e armazenado em tubos de eppendorfs, os quais permaneceram em temperatura de -80°C. A partir do equipamento fotométrico (Beckman Coulter AU480), foi realizada a análise da fosfatase alcalina óssea (FAO) por um examinador cego.

### 3.2.6 Análise Radiográfica

As radiografias digitais das hemimandíbulas esquerdas foram realizadas após fixação em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e desidratação em álcool absoluto. As hemimandíbulas foram posicionadas paralelamente a película digital radiográfica, com uma distância de 10 cm e tempo de exposição de 0,14 segundos utilizando o aparelho digital (Gnatus Produtos Médicos e Odontológicos Ltda, Gnatus, Barretos, São Paulo, Brasil). Na avaliação qualitativa, foram analisadas áreas de sequestros ósseos (SO), presença/ausência de raiz residual (RR) e reparo gradual (RG) no alvéolo pós exodontia por um examinador calibrado (Jabbour et al., 2014; Silva et al., 2015). Todas as análises foram realizadas por um examinador cego.

### 3.2.7 Análise Histológica

Após a análise radiográfica, as hemimandíbulas esquerdas foram descalcificadas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 9% sob agitação contínua e troca da solução a cada 2 dias por aproximadamente 30 dias. Após desmineralização, foram processadas em um sistema histotécnico semifechado (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, EUA) (Howie et al., 2015). Em seguida, foram realizados cortes em plano coronal com espessura de 5 µm no micrótomo (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, EUA) e coloração com hematoxilina e eosina. A análise da área óssea após a exodontia foi realizada por um microscópio

binocular (Olympus, São Paulo, SP, Brasil) a partir da raiz mesial do segundo molar inferior, onde quatro campos no aumento de 400x foram fotografados (Figura 6A).

O software ImageJ® (National Institute of Mental Health-Bethesda, Maryland, EUA) foi utilizado por um examinador calibrado para avaliação da presença de oito lacunas de osteócitos vazias adjuntas caracterizando osteonecrose (Pacheco et al. 2015), área de tecido ósseo necrótico, número de vasos sanguíneos em tecido ósseo, número de osteoclastos e osteócitos. A concordância intraexaminador foi obtida repetindo 20% das medições, seguido de um teste t pareado.

### 3.2.8 Classificação da Severidade da MRONJ

Após confirmação da presença da osteonecrose, foi realizada uma classificação do grau de gravidade da ONM em subclínica e clínica, de acordo com parâmetros histológicos, imaginológicos e clínicos (Ruggiero et al., 2014) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da severidade da MRONJ.

<b>CLASSIFICAÇÃO DE SEVERIDADE DA MRONJ</b>					
CARACTERÍSTICAS	OSTEONECROSE SUBCLÍNICA		OSTEONECROSE CLÍNICA		
	I	II	III	IV	V
Histológica	Presença de oito lacunas vazias adjuntas				
Imaginológica	X	Sequestros ósseos			
Clínica	X	X	Úlcera e eritema		
	X	X	X	Exposição óssea	
	X	X	X	X	Fístula macroscópica

Fonte: a autora.

### 3.2.9 Análise Estatística

Os dados nominais dicotômicos dos parâmetros clínicos macroscópicos e a análise radiográfica qualitativa das hemimandíbulas foram analisados usando o teste exato de Fisher. As análises paramétricas de média dos valores de cinza e da

fosfatase alcalina óssea foram realizados por meio do one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Para dados não paramétricos, como na fluxometria sanguínea, utilizou o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Todos os dados foram expressos como média e desvio padrão, utilizando o software Graph Pad Prism 7 (University of California, San Diego, CA, EUA) com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Análise Clínica

A avaliação clínica das hemimandíbulas do grupo C não apresentou nenhum dos parâmetros clínicos analisados devido às áreas corticais ósseas intactas. Enquanto, o grupo BF apresentou defeitos ósseos decorrentes do atraso no processo de reparo ósseo, sendo 90% de úlcera intra-oral, 40% de sequestro ósseo, 100% de eritema e 100% de edema. O grupo SIL apresentou redução significativa nos parâmetros clínicos em relação ao grupo BF (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2. Análise clínica macroscópica das hemimandíbulas.

PARÂMETROS CLÍNICOS	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
	C	BF	SIL
Úlcera intra-oral	0% <sup>A</sup> (n=0)	90% <sup>B</sup> (n=9)	20% <sup>A</sup> (n=2)
Fístula extra-oral	0% <sup>A</sup> (n=0)	0% <sup>A</sup> (n=0)	0% <sup>A</sup> (n=0)
Exposição óssea	0% <sup>A</sup> (n=0)	40% <sup>A</sup> (n=4)	0% <sup>A</sup> (n=0)
Eritema	0% <sup>A</sup> (n=0)	100% <sup>B</sup> (n=10)	20% <sup>A</sup> (n=2)
Edema	0% <sup>A</sup> (n=0)	100% <sup>B</sup> (n=10)	0% <sup>A</sup> (n=0)

Observação macroscópica da frequência de úlcera intra-oral, fístula extra-oral, sequestro ósseo, edema e eritema nas áreas das exodontias nos grupos C, BF e SIL. A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Teste exato de Fischer,  $p < 0,05$ ). Fonte: a autora.

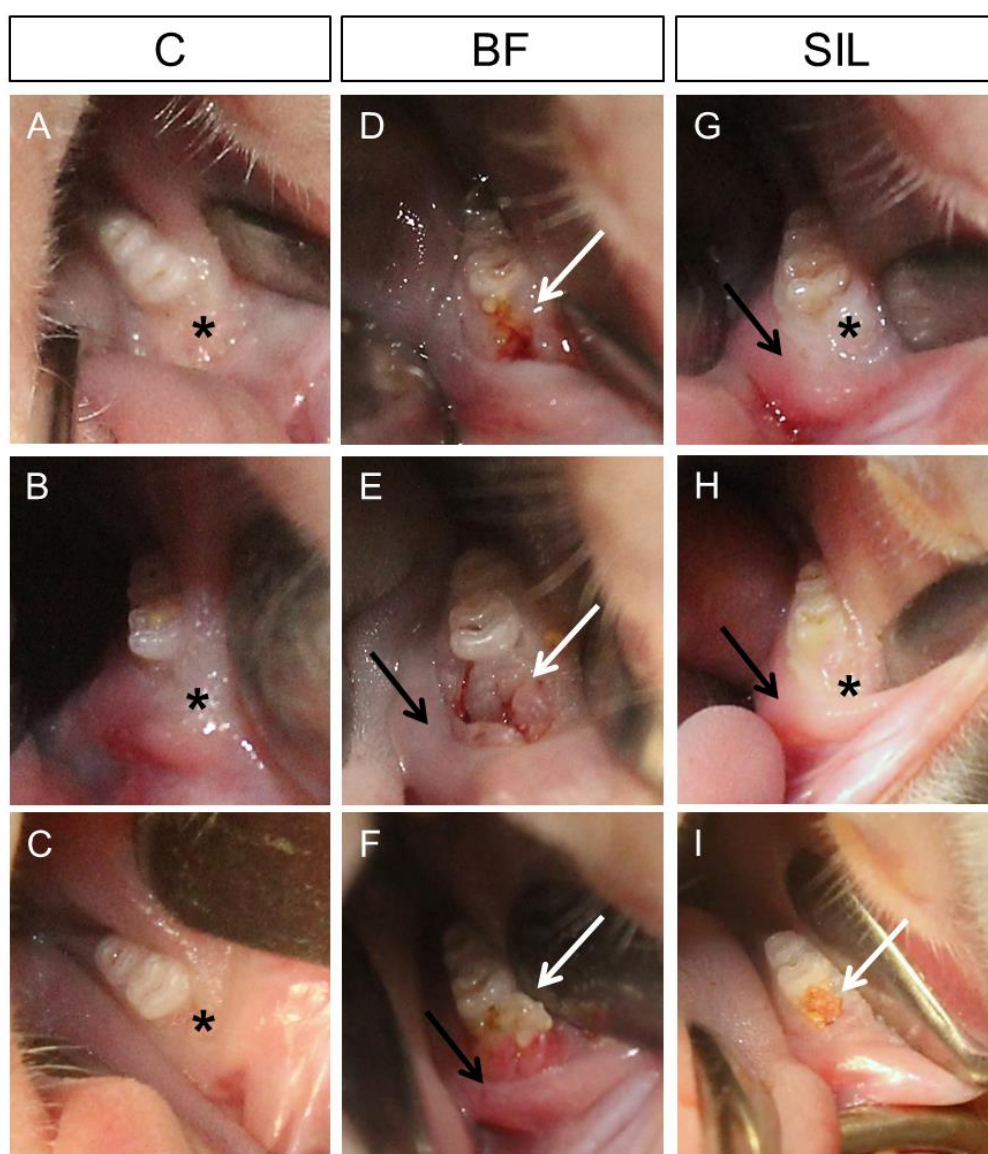


Figura 2. Avaliação clínica da hemimandíbula esquerda dos grupos C, BF e SIL. No grupo BF e SIL, a seta branca aponta área de exposição óssea, e a seta preta aponta área de edema e eritema. O asterisco mostra área de ausência de úlcera, exposição óssea nos grupos C e SIL. Fonte: a autora.

### 3.3.2 Análise da Remodelação Óssea

A partir das análises radiográficas, o sequestro ósseo foi observado em 80% das amostras do grupo BP e 30% do grupo SIL. O processo de reparo ósseo gradual foi observado em todos os animais do grupo C e significativamente maior no grupo SIL em relação ao grupo BF (Tabela 3, Figura 3).

Tabela 3. Análise radiográfica das hemimandíbulas. Fonte: a autora.

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
	C	BF	SIL
Raízes residuais	20% <sup>A</sup> (n=2)	20% <sup>A</sup> (n=2)	50% <sup>A</sup> (n=5)
Sequestro ósseo	0% <sup>A</sup> (n=0)	80% <sup>B</sup> (n=8)	30% <sup>AB</sup> (n=3)
Reparo gradual	100% <sup>A</sup> (n=10)	10% <sup>B</sup> (n=10)	70% <sup>A</sup> (n=7)

Observação radiográfica qualitativa da frequência raízes residuais, sequestro ósseo e cicatrização gradual nas áreas das exodontias nos grupos C, BF e SIL. A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Teste exato de Fischer,  $p < 0,05$ ). Fonte: a autora.

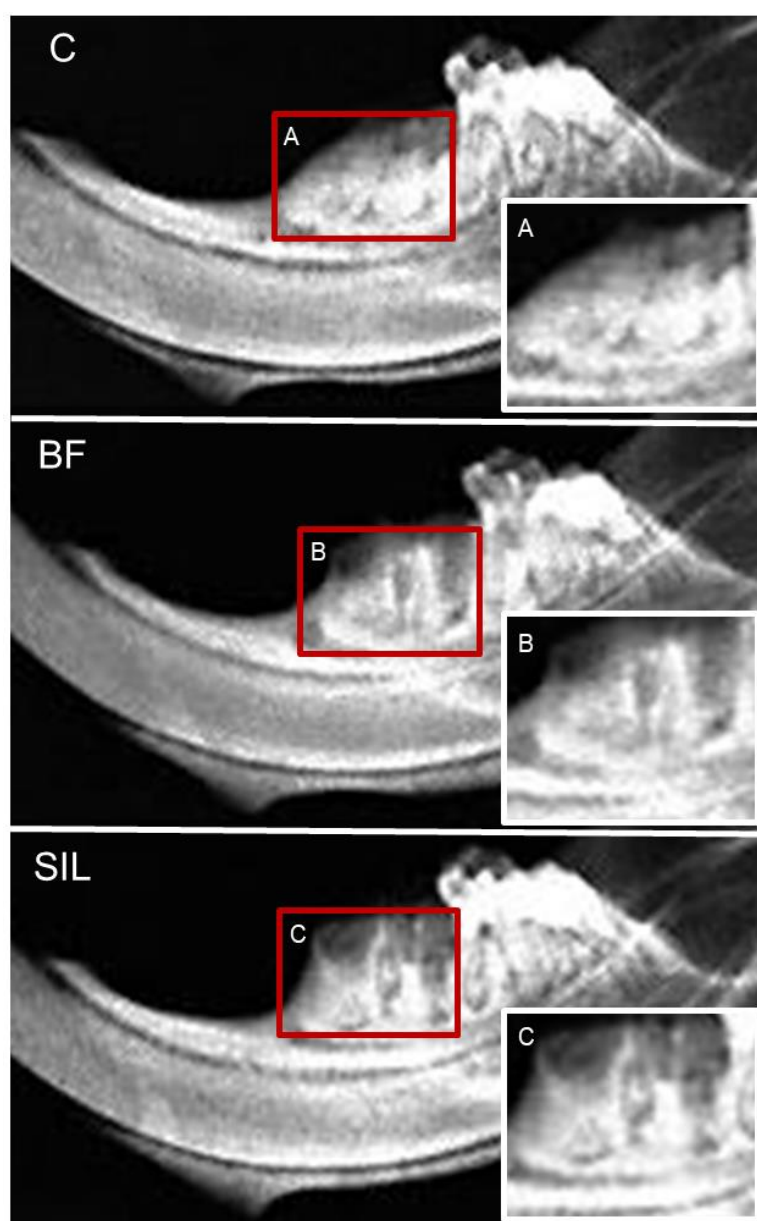


Figura 3. Avaliação radiográfica das hemimandíbulas dos grupos C, BF e SIL. O grupo BF e SIL apresenta regiões radiolúcidas. A, B e C imagens aproximadas. Fonte: a autora.

A análise histológica revelou aumento na área de tecido ósseo necrótico no grupo BF ( $p < 0.05$ ) em relação aos grupos C e SIL, os quais não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0.05$ ) (Figura 4.A). A área de necrose óssea é caracterizada histologicamente pela presença de lacunas vazias (sem osteócitos), o que foi observado amplamente no grupo BF (Figura 4.B) em relação aos grupos C e SIL, nos quais novamente não foram observadas diferenças estatísticas entre eles ( $p > 0.05$ ) (Figura 5.B).

A presença de osteócitos no interior das lacunas ósseas foi maior nos grupos C e SIL, confirmando a vitalidade óssea anteriormente abordada pela mensuração das áreas necróticas (Figura 4.C). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nas contagens de osteoclastos entre os grupos C, BP e SIL ( $p > 0.05$ ) (Figura 4.D).

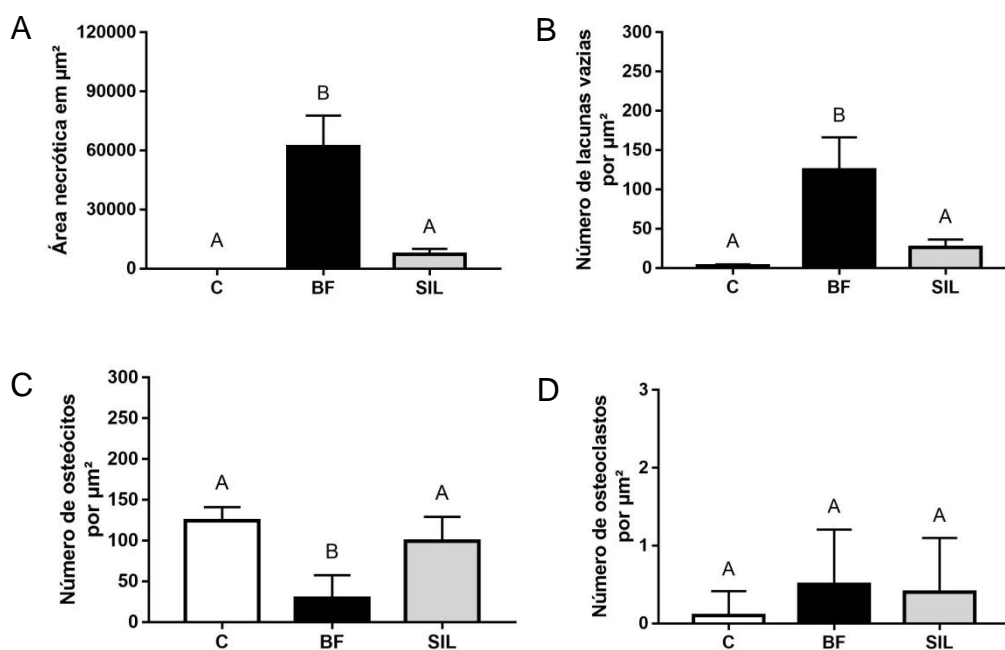


Figura 4. Representação gráfica da presença de osteonecrose no grupo BF. A- Área necrótica; B- Número de lacunas vazias; C- Número de osteócitos e D- Número de osteoclastos. Os resultados estão expressos como média e DP ( $n=10$ ). A  $\neq$  B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Área necrótica, número de lacunas vazias e número de osteócitos: ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ) (Número de osteoclastos: Kruskal-Wallis, Dunn's,  $p < 0,05$ ). Fonte: a autora.

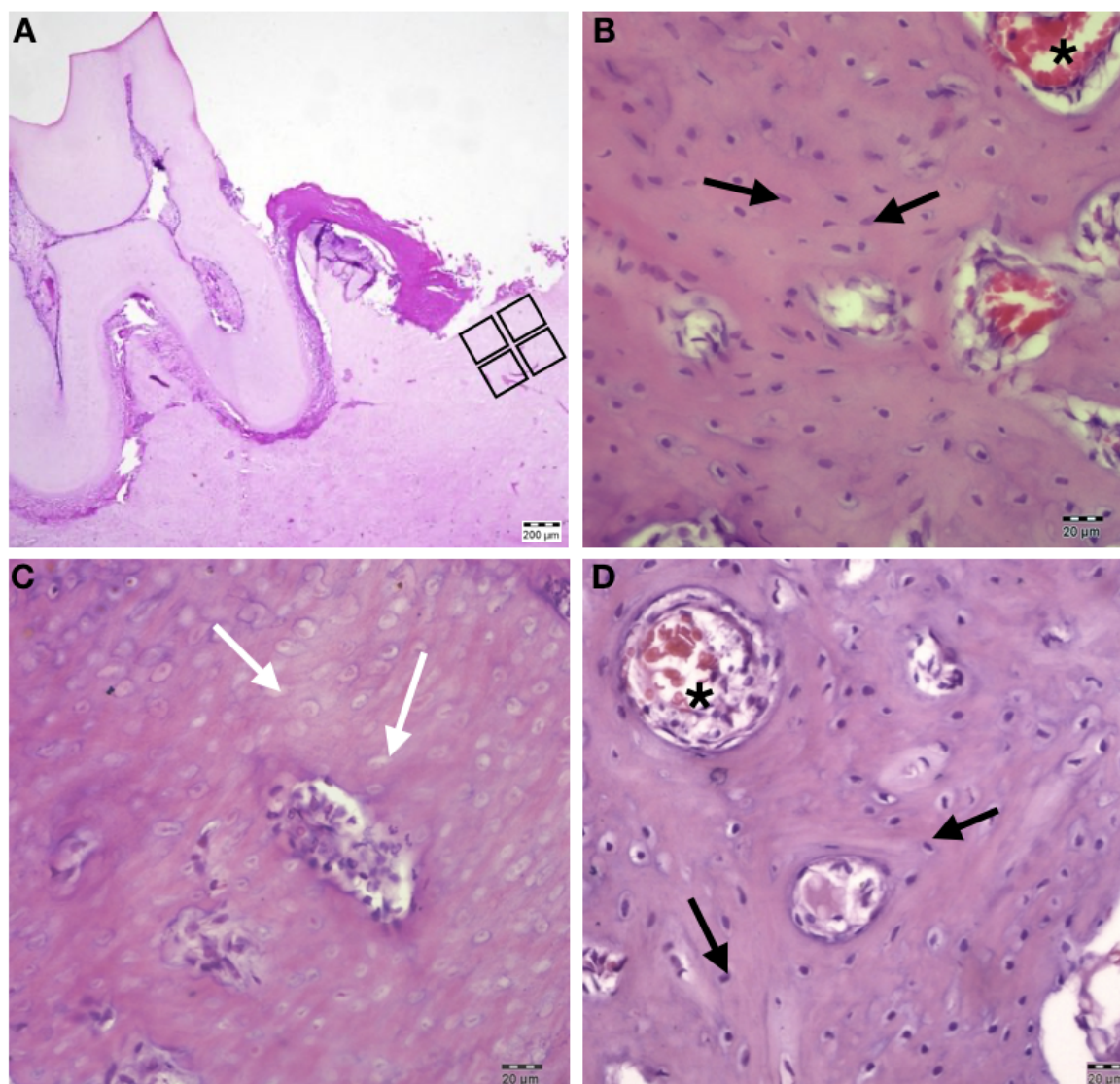


Figura 5. Avaliação histológica da hemimandíbula esquerda dos grupos C, BF e SIL. Em A, observar a representação esquemática da casualização dos campos, marcados em preto. Nos grupos C e SIL, observar a presença de vasos sanguíneos (asterisco) e de lacunas com osteócitos (seta preta), caracterizando o tecido ósseo com vitalidade. No grupo BF, observar a presença de lacunas vazias (seta branca), caracterizando a necrose óssea. Fonte: a autora.

A quantificação da fosfatase alcalina óssea, relacionada com a atividade osteoblástica, revelou níveis mais elevados ( $p < 0.05$ ) no grupo C, seguido pelo grupo SIL. Os níveis mais discretos de fosfatase alcalina óssea foram observados no grupo BF (Figura 7).



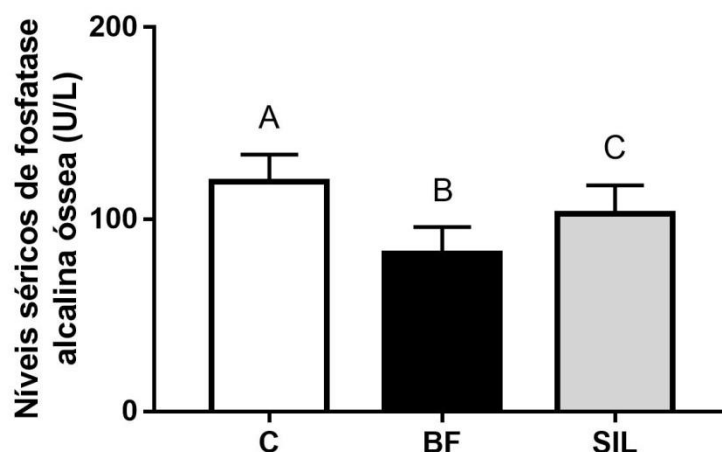


Figura 6. Quantificação da fosfatase alcalina óssea nos grupos C, BF e SIL. Os resultados estão expressos como média e DP dos valores da fosfatase alcalina óssea (n=10). A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ). Fonte: a autora.

### 3.3.3 Análise da Vascularização Óssea

O fluxo sanguíneo na região alveolar revelou índices significativamente maiores no grupo C ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos BF e SIL. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos BF e SIL (Figura 8).

O número de vasos sanguíneos foi obtido por meio da análise histológica. Assim como observado nos dados de fluxometria, o grupo C apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos BF e SIL. Estes grupos (BF e SIL) não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ) (Figura 8).

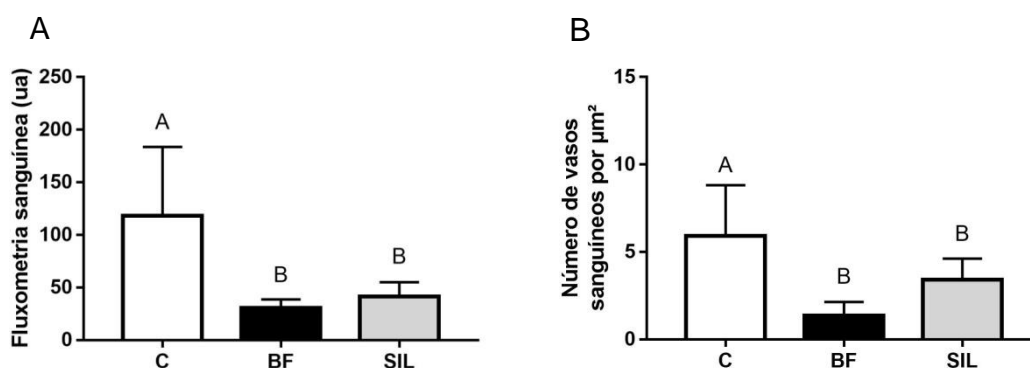


Figura 7. Representação gráfica vascularização óssea. A- Média da fluxometria sanguínea (ua). B- Número de vasos sanguíneos por  $\mu\text{m}^2$ . Os resultados estão expressos como média e DP (n=10). A ≠ B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (A - Kruskal-Wallis, Dunn's,  $p < 0,05$ ; B - ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ). Fonte: a autora.

### 3.3.4 Severidade de Osteonecrose

Com base nos resultados obtidos, a incidência de MRONJ foi observada histologicamente pela presença de 8 lacunas vazias adjacentes, imaginologicamente por sequestros ósseos e clinicamente por úlcera, eritema, exposição óssea e fístula. O grupo C não desenvolveu MRONJ. O grupo BF apresentou escores variando entre III e IV, com elevadas taxas de necrose. Já o grupo SIL revelou uma tendência de redução, apresentando escores entre II e III. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos BF e SIL (Figura 9).

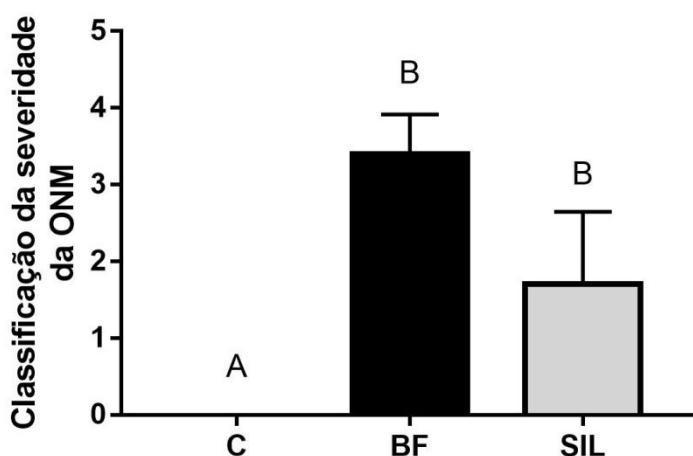


Figura 8. Incidência de MRONJ. Os resultados estão expressos como média e DP (n=10). A  $\neq$  B indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn's,  $p < 0,05$ ). Fonte: a autora.

## 3.4 DISCUSSÃO

A MRONJ é caracterizada por uma condição dolorosa e debilitante que não possui protocolo efetivo de prevenção estabelecido (Adachi et al., 2020). Sua origem é multifatorial, relacionando com a inibição da remodelação óssea por disfunção de osteoclastos, processos inflamatórios desregulados associados com quadros infecciosos, inibição do processo de angiogênese local e estresse oxidativo dos tecidos moles, sendo que a combinação dos mecanismos pode interagir de forma sinérgica, contribuindo para o aumento na severidade da doença (Aghaloo; Hazboun; Tetradis, 2015). Neste contexto, alternativas que promovam angiogênese local e recuperação do fluxo sanguíneo para evitar uma maior disfunção tecidual são

relevantes (Myers et al., 2012). Dentro deste perfil, o fármaco Sildenafil, inibidor seletivo da fosfodiesterase-5 (PDE-5), demonstrou eficácia em várias condições isquêmicas associada ao fluxo sanguíneo cutâneo diminuído e vascularização insuficiente (Koneru et al., 2008; Vidavalur et al., 2006; Orchard et al., 2017; Song et al., 2017; Bereket et al., 2018).

O uso de ratos como modelo experimental permitiu uma avaliação do tecido ósseo e suas características (Mosekilde, 1995), além de possibilitar a aplicação das doses necessárias para indução da ONM em um menor tempo (Córdova et al., 2016). Em relação ao sildenafil, seu metabolismo é semelhante em ratos e humanos, apresentando uma biodisponibilidade e tempo de concentração máxima equivalentes (Walker et al., 1999).

Embora a ocorrência espontânea também seja descrita, as exodontias e a instalação de implantes dentários são frequentemente citadas como fatores predisponentes da MRONJ (Kun-Darboris et al., 2018; Lu et al., 2021). Assim, a presença de traumatismos e lesões nos ossos gnáticos, associado ao uso de medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos como os bifosfonatos, podem desencadear a necrose óssea (Li & Wang, 2019; AlDhalaan, BaQais & Al-Omar, 2020). Baseado nestas condições, o modelo de indução da osteonecrose escolhido apresenta um protocolo terapêutico fundamentado na administração de ácido zolendrônico, pertencente à classe dos bifosfonatos (Córdova et al., 2016).

Este modelo mostrou-se eficaz, no qual o grupo BF apresentou histologicamente mais de 8 lacunas vazias e redução do número de osteócitos caracterizando áreas de tecido ósseo necrótico significativos. Além disso, observaram-se 80 % de sequestro ósseo na análise radiográfica e, 90% de úlceras e 40% de sequestro ósseo nas análises macroscópicas. Achados histológicos semelhantes foram encontrados nos estudos de Howie et al. (2015) e Yanik et al. (2016). Não foi observado área de necrose no grupo SIL e C, sem diferença estatística entre eles. A administração do sildenafil aumentou o número de osteócitos no interior das lacunas ósseas, confirmando a vitalidade óssea. Este também reduz os efeitos negativos do zoledronato na consolidação de fraturas por meio do aumento na deposição óssea (Histing et al., 2011). Corroborando com estes achados, nossos resultados revelaram aumento nos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea.

De fato, a presença de raízes residuais pode ser considerada uma limitação do delineamento experimental (Bolette et al., 2019). Contudo, vale salientar que a ocorrência destas raízes no grupo controle e SIL parece não ter exercido influência relevante no processo de reparo alveolar pós-exodontia uma vez que houve baixa incidência de úlceras.

Os achados histológicos obtidos em nosso estudo não revelaram diferença estatística significativa no número de osteoclastos entre os três grupos. No grupo BF, os resultados referem ausência de diferença na contagem destas células (Córdova et al., 2016). Contudo, estas células apresentam modificação na sua morfologia, podendo apresentar prejuízos na reabsorção óssea. Os dados obtidos no grupo SIL que indicaram que os inibidores de PDE-5 não induzem a formação de osteoclastos na calvária (Takami et al., 2005; Mirhashemi et al., 2016). E ainda, o sildenafil não afetou significativamente o equilíbrio do eixo RANK/RANKL/OPG (Histing et al., 2011).

A vascularização óssea do grupo BF apresentou redução dos valores de fluxometria sanguínea e no número de vasos sanguíneos comparado ao grupo C. De fato, os BFs diminuem a vascularização, densidade dos microvasos, células endoteliais circulantes e angiogênese, devido aos menores níveis de VEGF (Bereket et al., 2018; Kun-Darboris et al., 2018). O relato de casos de MRONJ relacionados a outros medicamentos antiangiogênicos, como o bevacizumab, um inibidor do VEGF, suporta a teoria de que a diminuição de vasos sanguíneos está envolvida na patogênese da doença (Li & Wang, 2019; Eguia, Bagan & Cardona, 2020).

O sildenafil, um inibidor específico da PDE-5, apresenta-se como um potente estimulador da angiogênese (Dincel et al., 2018). Nos dados de fluxometria sanguínea e o número de vasos sanguíneos, o grupo SIL não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo BF, porém há uma tendência ao aumento desses aspectos. Essa tendência se confirma ao associar à diminuição dos parâmetros clínicos, radiográficos e da área do tecido ósseo necrótico apresentado pelo grupo SIL, sem diferença estatística significativa com o grupo C, revelando redução na MRONJ. O sildenafil induz a expressão de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF, e controle da concentração de GMPc (Pufe et al., 2002; Athanasopoulos et al., 2007; Koneru et al., 2008; Dincel et al., 2018; Ala, Mohammad Jafari, & Dehpour, 2020). De fato, este fármaco previne a degradação do óxido nítrico, resultando em vasodilatação e, conseqüentemente, em aumento do

suprimento sanguíneo tecidual (Diwan et al., 2000; Baldiket al., 2002; Derici et al., 2010; MalekiGorji et al., 2020). Além disso, o tratamento com sildenafil pode tornar os tecidos mais sensíveis aos estímulos angiogênicos ou arteriogênicos endógenos durante a isquemia (Pyriochou et al., 2007; Senthilkumar et al., 2007).

Apesar dos estudos mostrarem efeito positivo no angiogênese, nossos resultados não foram suficiente para compensar a ação potente do ácido zolendrônico (Bereket et al., 2018). Estudos observaram acúmulo desse medicamento nos tecidos mineralizados o qual aumenta ao decorrer do tempo (Marx, 2003; Almeida et al., 2018; Stramandinoli-Zanicotti et al., 2018; Rodríguez-Sánchez et al., 2020). A partir dos resultados clínicos, radiográficos e histológicos, a severidade de MRONJ foi abordada. O grupo SIL apresentou uma redução dos escores, variando entre II e III, enquanto o grupo BF apresentou escores entre III e IV, com elevadas taxas de necrose.

Avaliando os dados de forma conjunta, o sildenafil apresentou efeitos benéficos na patogênese da MRONJ, melhorando o reparo ósseo, diminuindo o tecido necrótico, aumentando os osteócitos e fosfatase alcalina, colaborando na redução dos efeitos negativos do ácido zolendrônico na consolidação óssea. Em contrapartida, não observa efeito antibacteriano, sendo importante na conduta uma possível associação do sildenafil com antibiótico, porem mais estudos seriam necessários para confirmação.

### 3.5 REFERÊNCIAS

Adachi, N., Ayukawa, Y., Yasunami, N., Furuhashi, A., Imai, M., Sanda, K., et al. (2020). Preventive effect of fluvastatin on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Scientific reports*, 10, 1-8. [<https://doi.org/10.1038/s41598-020-61724-6>]

Afzal, F., Polak, J., Buttery, L. (2014). Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *Journal Pathology*, 202, 503-510. [<https://doi.org/10.1002/path.1536>]

Ala, M., Mohammad Jafari, R., Dehpour, A. R. (2020). Sildenafil beyond erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension: Thinking about new indications. *Fundamental e Clínica Pharmacologia*, 35(2), 235-259. [<https://doi.org/10.1111/fcp.12633>].

- AIDhalaan, N. A., BaQais, A., & Al-Omar, A. (2020). Medication-related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. *Cureus*, 12(2), e6944. [<https://doi.org/10.7759/cureus.6944>].
- Aghaloo, T., Hazboun, R., Tetradis, S. (2015) Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 27(4), 489-496. [<https://doi.org/10.1016/j.coms.2015.06.001>].
- Athanasopoulos, A. N., Schneider, D., Keiper, T., et al. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *The Journal of biological chemistry*, 282(37), 26746–26753. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M705200200>].
- Baldik, Y., Talu, U., Altinel, L., Bilge, H., Demiryont, M., Aykac-Toker, G. Bone healing regulated by nitric oxide: an experimental study in rats. *Clinical orthopaedics and related research*, (404), 343–352. [<https://doi.org/10.1097/00003086-200211000-00051>].
- Bereket, C., Sener, I., Cakir-Özkan, N., Önger, M. E., & Polat, A. V. (2018). Beneficial Therapeutic Effects of Sildenafil on Bone Healing in Animals Treated with Bisphosphonate. *Nigerian journal of clinical practice*, 21(2), 217–224. [[https://doi.org/10.4103/njcp.njcp\\_172\\_16](https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_172_16)].
- Bolette, A., Lecloux, G., Rompen, E., Albert, A., Kerckhofs, G., & Lambert, F. (2019). Influence of induced infection in medication-related osteonecrosis of the jaw development after tooth extraction: A study in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 47(2), 349-356. [<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.08.011>].
- Chaves, R. A. C., Órfão, A. M. A., Júnior, W. B., Queiroz, T. P., & Faloni, A. P. (2018). Bifosfonatos e Denosumabes: mecanismos de ação e algumas implicações para a implantodontia. *Revista Brasileira Multidisciplinar*, 21, 66-80. [<https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2018.v21i2.483>].
- Córdova, L. A., Guilbaud, F., Amiaud, J., Battaglia, S., Charrier, C., Lezot, F., et al. (2016). Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Journal of Cranio Maxillofacial Surgery*, 44, 1387-1394. [<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.07.015>].
- Derici, H., Kamer, E., Unalp, H. R., Diniz, G., Bozdog, A. D., Tansug, T., et al. (2010). Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. *Langenbeck's archives of surgery*, 395(6), 713–718. [<https://doi.org/10.1007/s00423-009-0471-2>].
- Dincel, Y. M., Alagoz, E., Arikan, Y., Cglar, A. K., Dogru, S. C., Ortes, F. et al. (2018). Biomechanical, histological, and radiological effects of different phosphodiesterase inhibitors on femoral fracture healing in rats. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 26, 1–9. [<https://doi.org/10.1177/2309499018777885>].

Diwan, A. D., Wang, M. X., Jang, D., Zhu, W., Murrell, G. A. (2000). Nitric oxide modulates fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15, 342-51. [<https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.2.342>].

Eguia, A., Bagan, L., Cardona, F. (2020). Review and update on drugs related to the development of osteonecrosis of the jaw. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 25, e71. [<https://doi.org/10.4317/medoral.23191>].

Ghofrani, H. A., Osterloh, I. H., Grimminger, F. (2006). Sildenafil: From angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 689-702. [<https://doi.org/10.1038/nrd2030>].

Gokakin, A. K., Deveci, K., Kurt, A., Karakus, B. C., Duger, C., Tuzcu, M. et al. (2013). The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. *Burns*, 39, 1193-1199. [<https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.12.017>].

Hart K., Baur, D., Hodam, J., Lesoon-Wood, L., Parham, M., Keith, K. et al. (2006). Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope*, 116, 522-528. [<https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000200792.67802.3b>].

Histing, T., Marciniak, K., Scheuer, C., Garcia, P., Holstein, J. H., Klein, M. et al. (2011). Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *Journal of Orthopedic Research*, 29(6), 867-873. [<https://doi.org/10.1002/jor.21324>].

Holstein S. A. (2019). A patent review of bisphosphonates in treating bone disease. *Expert Opinion On Therapeutic Patents*, 29(5), 315-325. [<https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1608180>].

Howie, R. N., Borke, J. L., Kurago, Z., Daoudi, A., Cray, J., Zakhary, I. E., et al. (2015). A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma. *PloS one*, 10, e0132520. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132520>]

Jabbour, Z., El-Hakim, M., Henderson, J. E., & Rubens, F. (2014). Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. *Oral oncology*, 50, 485-490. [<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.02.013>]

Kang, S. H., Park, S. J., & Kim, M. K. (2020). The effect of bisphosphonate discontinuation on the incidence of postoperative medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 46(1), 78–83. [<https://doi.org/10.5125/jkaoms.2020.46.1.78>]

Karakoyun, B., Uslu, U., Ercan, F., Aydin, M. S., Yuksel, M., Ogunc, A. V. et al. (2011). The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. *Life Science*, 89, 402-407. [<https://doi.org/10.1007/s11011-016-9852-8>].

Koneru, S., Varma Penumathsa, S., Thirunavukkarasu, M., Vidavalur, R., Zhan, L., Singal, P. K., Engelman, R. M., Das, D. K., & Maulik, N. (2008). Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: role of VEGF/angiopoietin-1. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(6B), 2651–2664. [<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00319.x>].

Kün-Darbois, J. D., Libouban, H., Mabileau, G., Pascaretti-Grizon, F., & Chappard, D. (2018). Bone mineralization and vascularization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an experimental study in the rat. *Clinical oral investigations*, 22(9), 2997–3006. [<https://doi.org/10.1007/s00784-018-2385-2>].

Li, J., & Wang, W. (2020). Positive effect of pentoxifylline on medication-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 121, 264-267. [<https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.12.003>].

Lu, S.Y., Ma, M.C., Wang, M.C., & Hsue, S.S. (2021). The status of jaw lesions and medication-related osteonecrosis of jaw in patients with multiple myeloma. *Journal of the Formosan Medical Association*, 120(11):1967-1976 [<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2021.01.015>].

Marx R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 61(9), 1115–1117. [[https://doi.org/10.1016/s0278-2391\(03\)00720-1](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(03)00720-1)].

Mecca, L.E.A. (2018). Avaliação do Ranelato de Estrôncio na indução ou proteção de osteonecrose. Estudo em ratas ovariectomizadas. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 66f.

Mirhashemi, A. H., Akhoundi, M. S., Ghazanfari, R., Etemad-Moghadam, S., Alaeddini, M., Khorshidian, A., Dehpour, A. R., & Momeni, N. (2016). Assessment of the Role of NO-cGMP Pathway in Orthodontic Tooth Movement Using PDE5 Inhibitors: An Animal Study. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*, 13(6), 388–393.

MalekiGorji, M., Golestaneh, A., & Razavi, S. M. (2020). The effect of two phosphodiesterase inhibitors on bone healing in mandibular fractures (animal study in rats). *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 46(4), 258–265. [<https://doi.org/10.5125/jkaoms.2020.46.4.258>].

Mosekilde, L. (1995). Assessing bone quality — Animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone*, 17(4), 343-352.

Myers, S.A., DeVries, W.H., Gruenthal, M.J., Andrés, K.R., Hagg, T., Whittemore, S.R. (2012). Sildenafil improves epicenter vascular perfusion but not hindlimb functional recovery after contusive spinal cord injury in mice. *Journal of Neurotrauma*, 29(3), 528-38. [<https://doi.org/10.1089/neu.2011.2036>].

Núñez, S. C., Nogueira, G. E., Ribeiro, M. S., Garcez, A. S., & Lage-Marques, J. L. (2004). He-Ne laser effects on blood microcirculation during wound healing: a



method of in vivo study through laser Doppler flowmetry. *Lasers in surgery and medicine*, 35(5), 363–368. [<https://doi.org/10.1002/lsm.20109>].

Orchard, E., Green, W., Nair, R. P., Abreo, F., & Sunavala-Dossabhoy, G. (2017). Sildenafil Transiently Delays Early Alveolar Healing of Tooth Extraction Sockets. *Clinics in surgery*, 2, 1458.

Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., et al. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40, 1769-1777. [<https://doi.org/10.1177/0271678X20943823>].

Pifarre, P., Prado, J., Baltrons, M. A., Giralt, M., Gabarro, P., Feinstein, D. L., Hidalgo, J., & Garcia, A. (2011). Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Acta neuropathologica*, 121(4), 499–508. [<https://doi.org/10.1007/s00401-010-0795-6>].

Pozzi, S., Vallet, S., Mukherjee, S., Cirstea, D., Vaghela, N., Santo, L., et al. (2009). High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clinical Cancer Research*, 15, 5829-5839. [10.1158/1078-0432.CCR-09-0426]

Pufe, T., Wildemann, B., Petersen, W., Mentlein, R., Raschke, M., & Schmidmaier, G. (2002). Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell and tissue research*, 309(3), 387–392. [<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0605-0>].

Pyriochou, A., Zhou, Z., Koika, V., Petrou, C., Cordopatis, P., Sessa, W. C., & Papapetropoulos, A. (2007). The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil stimulates angiogenesis through a protein kinase G/MAPK pathway. *Journal of cellular physiology*, 211(1), 197–204. [<https://doi.org/10.1002/jcp.20929>].

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(3), 659–661. [<https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>].

Rodríguez-Sánchez, M. D. P., Statkiewicz, C., de Mello-Neto, J. M., Toro, L. F., Bassi, A. P. F., Garcia, V. G., et al. (2020). The Effectiveness of the Low-Level Laser, Antibiotic and Surgical Therapy in the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Case Report. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 11, 98. [<https://doi.org/10.15171/jlms.2020.16>].

Roelofs, A. J., Thompson, K., Gordon, S., & Rogers, M. J. (2006). Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(20 Pt 2), 6222s–6230s. [<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0843>].

- Santos, C. L., Souza, M. H., Gomes, A. S., Lemos, H. P., Santos, A. A., Cunha, F. Q., & Wallace, J. L. (2005). Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. *British journal of pharmacology*, 146(4), 481–486. [<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706361>].
- Santos, P. S. S., Gambirazi, L. M., Feliz, V. B., Magalhães, M. H. C. G. (2008). Osteonecrose maxilar em pacientes portadores de doenças neoplásicas sob uso de bisfosfonatos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30, 501-504. [<https://doi.org/10.1590/S1516-84842008000600016>].
- Senthilkumar, A., Smith, R. D., Khitha, J., Arora, N., Veerareddy, S., Langston, et al. (2007). Sildenafil promotes ischemia-induced angiogenesis through a PKG-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. Sep*;27(9), 1947-54. [<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147421>].
- Silva, P. G., Junior, A. E. C. F., Teófilo, C. R., Barbosa, M. C., Júnior, R. C. P. L., Sousa, F. B., et al. (2015). Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*, 60, 1237-1245. [<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.015>]
- Soares, D. M., Ramos-Perez, F., Araújo, S. S., Marcelos, P. G. C. L., Pontual, A. A., Perez, D. (2018). Sildenafil citrate on experimental periodontitis in rats: microtomographic and histological analyses. *Oral Diseases*, 24(6), 1073-1082. [<https://doi.org/10.1111/odi.12846>].
- Song, Q., Ni, J., Jiang, H., & Shi, Z. (2017). Sildenafil improves blood perfusion in steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbits via a protein kinase G-dependent mechanism. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*, 51(5), 398–403. [<https://doi.org/10.1016/j.aott.2017.07.002>].
- Takami, M., Cho, E.S., Lee, S.Y., Kamijo, R., Yim, M. (2005) Phosphodiesterase inhibitors stimulate osteoclast formation via TRANCE/RANKL expression in osteoblasts: possible involvement of ERK and p38 MAPK pathways. *FEBS Lett*, 579, 832-8. [<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.066>].
- Vidavalur, R., Penumathsa, S. V., Zhan, L., Thirunavukkarasu, M., & Maulik, N. (2006). Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. *Vascular pharmacology*, 45(2), 91–95. [<https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.03.010>].
- Vilela-Carvalho, L. N., Tuany-Duarte, N., Andrade-Figueiredo, M., Lopez-Ortega, K. (2018). Osteonecrosis de los maxilares relacionados con el uso de medicamentos: Diagnóstico, tratamiento y prevención. *Revista CES Odontologia*, 31, 48-63.
- Walker, D. K., Ackland, M. J., James, G. C., Muirhead, G. J., Rance, D. J., Wastall, P., & Wright, P. A. (1999). Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 29(3), 297–310. [<https://doi.org/10.1080/004982599238687>].

Yanık, S., Aras, M. H., Erkılıç, S., Bozdağ, Z., Demir, T., & Çetiner, S. (2016). Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Archives of oral biology*, 65, 59–65. [<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.10.010>].

Yildirim, A., Ersoy, Y., Ercan, F., Atukeren, P., Gumustas, K., Uslu, U. et al. (2010). Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulmonary Pharmacology Therapeutics*, 23, 215-221.

## ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO NA CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaíras - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

CARTA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS

*CARTA DE APROVAÇÃO*

Processo/ Proceso: CEUA – 0045167

Protocolo UEPG – 1900000434-2

Título – Efeito do sildenafil no tratamento da osteonecrose de mandíbula induzida por bifosfanatos

Interessada – Profa. Marcela Claudino da Silva

e-mail: [marcelaclaudino@hotmail.com](mailto:marcelaclaudino@hotmail.com)

Data de Entrada – 25/07/2019

Resultado: Aprovado

### Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 112 ratos Wistar machos, de 120 dias e 200 a 300 g para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 08 de agosto de 2019

Profa. Dra. Luciana da Silva Leal Karolewski  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG



Documento assinado eletronicamente por **Luciana da Silva Leal Karolewski**, Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPEP, em 08/08/2019, às 23:36, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0045167** e o código CRC **2E23FEFF**.