

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Priscila dos Santos Simões

**EFEITO DO ALENDRONATO DE SÓDIO NA ATIVIDADE DE LEUCÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS COM *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Belo Horizonte

2021

Priscila dos Santos Simões

**EFEITO DO ALENDRONATO DE SÓDIO NA ATIVIDADE DE LEUCÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS COM *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Clínicas Odontológicas, Área Temática: Periodontia.

Linha de Pesquisa: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

S593e Simões, Priscila dos Santos
Efeito do alendronato de sódio na atividade de leucócitos humanos
estimulados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* / Priscila dos Santos
Simões. Belo Horizonte, 2021.
56 f. : il.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Doença periodontal - Tratamento. 2. Alendronato. 3. Citocinas. 4.
Monócitos. 5. Leucócitos. 6. Difosfonatos. I. Souza, Paulo Eduardo Alencar de.
II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.311.2

Ficha catalográfica elaborada por Elizângela Ribeiro de Azevedo - CRB 6/3393

Priscila dos Santos Simões

**EFEITO DO ALENDRONATO DE SÓDIO NA ATIVIDADE DE LEUCÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS COM *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínicas Odontológicas, Área Temática: Periodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Profa. Dra. Paula Rocha Moreira – UFMG
- 2- Profa. Dra. Jôice Dias Corrêa – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 20 de dezembro de 2021

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação em
Odontologia**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e sabedoria para estar aqui.

Ao professor Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza por ter aceitado o convite de ser meu orientador em mais uma parte da minha história acadêmica, por sua compreensão paterna às dificuldades do maternar e por ter se preocupado e resolvido a parte administrativa quando estive internada com Covid. Gratidão!

Aos professores que empenharam em transmitir o conhecimento necessário para minha formação, principalmente ao professor Dr. Fernando Mauad, pelos trabalhos que desenvolvemos juntos e seu vasto conhecimento na minha especialidade.

À funcionária Angélica da secretaria do Programa de Pós-graduação em Odontologia por sua excepcional assistência, desde a minha matrícula até o depósito da dissertação.

Às amigas que o mestrado me proporcionou, principalmente aos mestrandos Fábio Bruzinga e Gianfilippo Cornacchia, mais presentes durante esses dois anos, me apoiando nos estudos, produção científica e deslocamento RJ/BH. E a minha veterana Tamiris de Oliveira que me apresentou ao mestrado da PUC Minas.

À minha filha Larimar Simões, que foi meu presente surpresa durante este trabalho.

À colaboração da pós-doutoranda Carolina Cattoni Koh e da professora Walderez Ornelas Dutra, do laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB/UFMG, na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À CAPES pelo apoio financeiro da bolsa para mensalidade, tornando possível a realização do mestrado.

A todos que de alguma forma me incentivaram e apoiaram nesta caminhada, aos meus amigos e familiares que estiveram presentes nesta jornada, principalmente pelo apoio psicológico para aguentar a carga emocional.

RESUMO

Alendronato de sódio (Ale) é um bisfosfonato que tem sido utilizado de forma tópica como adjuvante no tratamento da doença periodontal, com resultados clínicos satisfatórios. Embora os osteoclastos sejam os principais alvos farmacológicos dos bisfosfonatos, esses fármacos também atuam diretamente em células fagocitárias como macrófagos e neutrófilos, células que participam ativamente dos processos biológicos nos tecidos periodontais, combatendo bactérias e induzindo destruição tecidual. Dessa forma, Ale pode afetar a resposta imunoinflamatória a periodontopatógenos nos sítios periodontais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de doses tópicas de Ale na atividade de granulócitos e monócitos estimulados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) *in vitro*. Para isso, amostras de sangue de 10 indivíduos saudáveis foram incubadas com Ale a 1%, por 2 horas. Em seguida, foi adicionado Aa e, após 6 horas de incubação, foi realizada lise das hemácias. Foram avaliadas por citometria de fluxo a viabilidade celular, produção de intermediários reativos do oxigênio, pela marcação com DHR123, expressão de TLR2 e TLR4 e expressão das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF e TGF- β 1 por granulócitos (CD66b⁺) e monócitos (CD14⁺). Análises citométricas mostraram que concentração de 1% de Ale não afetou significativamente a viabilidade de granulócitos e monócitos humanos. Ale reduziu a expressão de CD66b, DHR123, TLR4, IL-8, TNF e IL-10 em granulócitos e a expressão de TLR2 e 4, IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 e TGF- β 1 em monócitos *ex vivo*. Considerando células estimuladas com Aa, Ale reverteu os efeitos da bactéria nos granulócitos, reduzindo a expressão de CD66b, DHR123 e IL-8 e aumentando a expressão de TNF e IL-10 nos granulócitos. Já nos monócitos, Ale também reverteu o efeito do Aa, reduzindo a expressão de DHR123, IL-1 β , IL-8, TNF e IL-10. Ale foi capaz de reduzir ainda mais a expressão de TLR4 em monócitos estimulados com Aa. Nossos resultados sugerem que Ale é capaz de modular a ativação de granulócitos e a expressão de TLR, intermediários reativos do oxigênio e citocinas por granulócitos e monócitos humanos estimulados ou não com Aa, sugerindo que a utilização tópica desse bisfosfonato nos tecidos periodontais possa afetar os mecanismos imunoinflamatórios envolvidos na doença periodontal.

Palavras-chave: Alendronato. Citocinas. Granulócitos. Monócitos. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Sodium alendronate (Ale) is a bisphosphonate that has been used topically as an adjuvant in the treatment of periodontal disease, with satisfactory clinical results. Although osteoclasts are the main pharmacological targets of bisphosphonates, these drugs also act directly on phagocytic cells such as macrophages and neutrophils, cells that participate in biological processes in periodontal tissues, fighting bacteria and inducing tissue destruction. Thus, Ale could affect the immunoinflammatory response to periodontopathogens at periodontal sites. The aim of this study was to evaluate the effect of topical doses of Ale on the activity of granulocytes and monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) *in vitro*. For this purpose, blood samples from 10 healthy individuals were incubated with 1% Ale for 2 hours. Then, Aa was added and, after 6 hours of incubation, red blood cell lysis was performed. Cell viability, production of reactive oxygen intermediates, by labeling with DHR123, expression of TLR2 and TLR4 and expression of IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF and TGF- β 1 by granulocytes (CD66b⁺) and monocytes (CD14⁺) were evaluated by flow cytometry. Analysis showed that 1% Ale concentration did not significantly affect the viability of human granulocytes and monocytes. Ale reduced the expression of CD66b, DHR123, TLR4, IL-8, TNF and IL-10 in granulocytes and the expression of TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and TGF- β 1 in monocytes *ex vivo*. Considering Aa-stimulated cells, Ale reversed the effects of the bacteria on granulocytes, reducing the expression of CD66b, DHR123 and IL-8 and increasing the expression of TNF and IL-10 in granulocytes. In monocytes, Ale also reversed the effect of Aa, reducing the expression of DHR123, IL-1 β , IL-8, TNF and IL-10. Ale was able to further reduce TLR4 expression in Aa-stimulated monocytes. Our results suggest that Ale is able to modulate the activation of granulocytes and the expression of TLR, reactive oxygen intermediates and cytokines by granulocytes and monocytes stimulated or not with Aa, suggesting that the topical use of this bisphosphonate in periodontal tissues may affect the immunoinflammatory mechanisms involved in periodontal disease.

Keywords: Alendronate. Cytokines. Granulocytes. Monocytes. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Bisfosfonatos.....	14
1.2 Efeito dos bisfosfonatos em células fagocitárias	15
1.3 Doença periodontal.....	16
1.4 Uso dos bisfosfonatos no tratamento periodontal.....	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	25
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas	55

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial crônica associada a biofilmes de placa disbiótica e caracterizada pela destruição progressiva do aparelho de suporte dentário (PAPAPANOU *et al.*, 2018). Pode acometer um ou mais sítios em boca, envolvendo gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar. O acúmulo de placa bacteriana é considerado o principal fator causal, pois, na sua presença, células do hospedeiro secretam mediadores químicos que participam dos processos de reabsorção óssea e degradação da matriz extracelular, podendo levar a perda de inserção, dano este irreversível (ATA-ALI *et al.*, 2015). A bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um importante microrganismo capaz de interferir nos mecanismos de defesa do periodonto e na homeostase óssea (HERBERT *et al.*, 2016).

Em resposta ao acúmulo de biofilme, leucócitos se acumulam rapidamente nos tecidos periodontais (NICU; LOOS, 2016). Macrófagos e neutrófilos desempenham importante papel na patogênese da periodontite, atuando na imunorregulação, na eliminação das bactérias por meio da fagocitose e geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ZENG *et al.*, 2019) e nos processos de destruição tecidual, por meio da secreção de enzimas, citocinas e outros mediadores inflamatórios (ALMUBARAK, 2020). A atividade dessas células nos tecidos periodontais é modulada por várias citocinas pró e anti-inflamatórias (LIU *et al.*, 2016). Após a terapia periodontal de suporte, os pacientes mostram um aumento significativo das funções fagocíticas (NAIFF, 2020).

Nos últimos anos, a aplicação tópica de alendronato de sódio nos sítios periodontais, como adjuvante no tratamento periodontal, tem mostrado resultados clínicos satisfatórios (AKRAM *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2011; IPSHITA *et al.*, 2018; KANORIYA *et al.*, 2016). O alendronato é um bisfosfonato amplamente utilizado no tratamento da osteoporose, que apresenta efeito inibidor da atividade de osteoclastos e, conseqüentemente, da reabsorção óssea (RODAN; RESZKA, 2002). Além da ação em osteoclastos, estudos mostraram que os bisfosfonatos podem atuar diretamente nos monócitos e macrófagos, alterando a morfologia celular, reduzindo a sobrevivência, diferenciação e função celular, afetando a secreção de metaloproteinasas de matriz e a expressão de toll-like receptor 4 (PATNTIRAPONG; POOLGESORN, 2018; ZHU *et al.*, 2019). Os bisfosfonatos também foram capazes de inibir quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* e a atividade da enzima NADPH oxidase de maneira dose-dependente e o recrutamento de neutrófilos *in vivo* (KUIPER *et al.*, 2012).

Embora os efeitos dos bisfosfonatos na atividade de osteoclastos tenham sido bastante estudados, pouco se conhece sobre seus efeitos em células imunocompetentes, principalmente quando estas estão estimuladas por produtos de microrganismo orais, como ocorre nos tecidos periodontais. Considerando o papel dos neutrófilos e monócitos no combate aos microrganismos periodontais e na destruição tecidual, torna-se relevante avaliar os efeitos de concentrações de uso tópico de alendronato de sódio na atividade dessas células sob estimulação ou não com periodontopatógenos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do alendronato de sódio (Ale) na viabilidade celular e na expressão de moléculas envolvidas nas respostas imunoinflamatórias por granulócitos e monócitos estimulados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). As hipóteses testadas foram: (1) concentrações de uso tópico de Ale reduzem significativamente a viabilidade de granulócitos e monócitos; (2) concentrações de uso tópico de Ale inibem a atividade de granulócitos e monócitos estimulados com Aa.

1.1 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são drogas que inibem o processo de reabsorção óssea, sendo utilizados inicialmente no tratamento da doença de Paget e, posteriormente, no tratamento da osteoporose e de pacientes com neoplasias malignas e metástases nos ossos (CASTRO *et al.*, 2004). Os primeiros bisfosfonatos aprovados para uso terapêutico foram clodronato e pamidronato dissódico e, em seguida, alendronato e risedronato de sódio, esses últimos usados amplamente por pacientes com osteoporose (CASTRO *et al.*, 2004). Os bisfosfonatos apresentam grande afinidade pela hidroxiapatita, sendo absorvidos pelos osteoclastos durante a reabsorção óssea e gerando efeitos anti-reabsorção óssea de longa duração (FISCHER *et al.*, 2006).

Por sua estrutura química, os bisfosfonatos são classificados em duas categorias: nitrogenados e não nitrogenados. Os bisfosfonatos não nitrogenados são incorporados às novas moléculas de adenosina trifosfato (ATP), após captação osteoclástica na superfície mineral óssea (RUSSELL, 2006). O acúmulo desses análogos de ATP não hidrolisáveis nas células é citotóxico para os osteoclastos devido à sua ação inibitória sobre processos celulares dependentes de ATP, o que leva a apoptose dos osteoclastos. Diferentemente, os bisfosfonatos nitrogenados inibem a enzima farnesildifosfato sintase, resultando na interrupção de várias vias envolvidas na organização do citoesqueleto, na sobrevivência

celular e na proliferação celular, o que também leva a apoptose das células osteoclásticas (RODAN; RESZKA, 2002).

Bisfosfonatos nitrogenados, como pamidronato e alendronato, mostraram-se de 10 a 100 vezes mais potentes que os não-nitrogenados, como etidronato e clodronato (CASTRO *et al.*, 2004). Além dos efeitos inibitórios da reabsorção óssea, estudos sugerem que os bisfosfonatos nitrogenados também podem apresentar efeito antineoplásico e capacidade de modular a sinalização imune inata (NORTON *et al.*, 2011). Foi demonstrado ainda que alguns bisfosfonatos podem ser uma nova opção para o tratamento de infecções bacterianas, por sua capacidade de inibir a relaxase conjugada do plasmídeo F, uma enzima essencial para a transferência conjugativa que as bactérias usam para adquirir resistência contra antibióticos (LUJAN *et al.*, 2007). Na Odontologia, um estudo mostrou que os bisfosfonatos atuam auxiliando a remoção química da matriz inorgânica nas paredes dos canais radiculares durante tratamento endodôntico (GIRARD *et al.*, 2005).

Um dos efeitos adversos mais graves do uso de bisfosfonato sistêmico é a osteonecrose dos maxilares, caracterizada por uma área de osso exposto que persiste por pelo menos oito semanas. Sua incidência varia de 1 por 10.000 a 110.000 pacientes/ano, podendo chegar a aproximadamente 10% em pacientes com mieloma (KHOSLA *et al.*, 2007). Outro efeito é a ocorrência de fraturas por estresse em ossos longos devido à inibição da remodelação óssea, gerando acúmulo de microdanos causados por impacto (BLACK *et al.*, 2010).

1.2 Efeito dos bisfosfonatos em células fagocitárias

Os bisfosfonatos atuam diretamente nos monócitos e macrófagos, reduzindo a sobrevivência, induzindo alterações morfológicas, prejudicando a diferenciação de monócitos em macrófagos e afetando a função dos macrófagos (PATNTIRAPONG; POOLGESORN, 2018). A viabilidade de macrófagos é afetada tanto pelo alendronato quanto pelo ácido zoledrônico em concentrações de 100 e 10-100 μM , respectivamente. Em alta concentração (100 μM), o ácido zoledrônico causa uma redução na diferenciação celular. Por outro lado, em doses baixas (1-10 μM), alendronato e ácido zoledrônico aumentam a expressão de metaloproteinases de matriz nos macrófagos (PATNTIRAPONG; POOLGESORN, 2018).

Estudo recente mostrou que a exposição de macrófagos de camundongos ao zolendronato estimula a expressão de toll-like receptor 4 (TLR4) com consequente ativação

de NF- κ B e indução da diferenciação para o fenótipo M1, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ZHU *et al.*, 2019). Este estudo mostrou ainda que a utilização de camundongos *knockout* para TLR4, em modelo de indução de osteonecrose induzida por bisfosfonato, reduziu a ocorrência de osteonecrose e a frequência de macrófagos M1 nos sítios de exodontia, sugerindo participação da via TLR4 no processo.

Estudo avaliando os efeitos de bisfosfonatos na atividade de neutrófilos mostrou que zoledronato e pamidronato inibiram a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* e a atividade da enzima NADPH oxidase de maneira dose-dependente. O recrutamento *in vivo* de neutrófilos também foi suprimido (KUIPER *et al.*, 2012).

1.3 Doença periodontal

A periodontite é uma das doenças inflamatórias crônicas humanas mais comuns, sendo diagnosticada em 8 a 10% da população em geral (EKE *et al.*, 2012). A resposta imunoinflamatória a bactérias presentes no sulco gengival desencadeia destruição dos tecidos periodontais, podendo levar à perda dentária (CHAPPLE; MATTHEWS, 2007).

A chave para o início e a progressão da periodontite é uma complexa interação entre as bactérias orais e o hospedeiro. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* estão fortemente associados com a progressão da doença periodontal e o insucesso terapêutico (GAJARDO *et al.*, 2005).

A periodontite decorre de complexas interações entre o hospedeiro e a microbiota disbiótica subgengival que levam a respostas inflamatórias excessivas ou desreguladas envolvendo elementos da imunidade inata (fagócitos) e da imunidade adaptativa (linfócitos regulatórios e efetores) (MALANDRINO *et al.*, 2015).

Prostaglandinas e citocinas, como IL-1 e TNF, produzidas por macrófagos e outras células do tecido conjuntivo fibroso em resposta ao LPS de periodontopatógenos, estimulam a secreção de catepsina K e metaloproteínases de matriz (MMPs) que causam degradação da matriz extracelular e expressão de RANKL que estimula a osteoclastogênese, gerando reabsorção óssea (GRAVES, 2011). Alterações quantitativas e da composição da microbiota (disbiose) induzem vias inatas de sinalização imunológica que levam ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa dentro do tecido conjuntivo gengival (LAMONT; HAJISHENGALLIS, 2015). Subtipos de linfócitos T auxiliares atuam modulando esses processos de destruição tecidual. Linfócitos Th1 e Th17 secretam interferon-gama e interleucina-17 (IL-17), respectivamente, as quais estimulam os processos de destruição

tecidual. Por outro lado, linfócitos Th2 e T regulatórios (Treg) secretam citocinas, como IL-4 e IL-10, que inibem os processos de degradação tecidual (GRAVES, 2011). Além disso, estudos recentes demonstraram o potencial dos linfócitos B para secretar citocinas pró-inflamatórias, MMPs e RANKL (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

A. actinomycetemcomitans e *P. gingivalis* são bactérias tipicamente associadas à doença periodontal (FARIAS *et al.*, 2012). Recentes resultados apoiam a hipótese de que o complexo microbiano associado à periodontite é resultado de um processo lento e contínuo, ocorrendo em habitat com condições ecológicas favoráveis. Enquanto a microbiota nas infecções bacterianas clássicas em lesões altamente ativas ou em indivíduos com condições médicas graves evolui sob baixa diversidade, na maioria dos casos de periodontite, a diversidade da microbiota aumenta à medida que a doença se desenvolve (MOMBELLI *et al.*, 2017). Acredita-se que as bactérias danifiquem os tecidos apenas se presentes em números altos por períodos prolongados (MOMBELLI *et al.*, 2017).

Após colonização, *A. actinomycetemcomitans* apresenta a partir de seus sorotipos (sendo o sorotipo b mais comum na periodontite) (GHOLIZADEH *et al.*, 2017), diferentes fatores de virulência, sendo os mais importantes CDT (toxina distensora citoletal) - *A. actinomycetemcomitans* é a única espécie do microbioma oral com a propriedade de produzir exotoxina proteica – a leucotoxina e LPS, com intuito de evadir os mecanismos de defesa e levar a uma resposta fisiopatológica inflamatória. A leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com periodontite é aumentada em comparação com de indivíduos sem periodontite. Uma condição de cultura anaeróbia aumenta significativamente a produção de leucotoxina, como é a condição da bolsa periodontal, apesar de *A. actinomycetemcomitans* estar presente tanto supra quanto subgengivalmente (BELIBASAKIS *et al.*, 2019).

O ATP extracelular (eATP) é uma importante molécula sinalizadora intercelular e o rápido aumento de sua concentração no espaço extracelular resulta no recrutamento e ativação de fagócitos. Estudos recentes mostram que as bactérias também liberam ATP no meio extracelular, sugerindo um papel potencial para o eATP nas interações hospedeiro-microrganismo (DING *et al.*, 2016). O estudo de DING *et al.* (2016) mostrou que *A. actinomycetemcomitans*, mas não *P. gingivalis*, *P. intermedia* ou *F. nucleatum*, secreta ATP na cultura. O eATP bacteriano atua como um potente quimioatraente para neutrófilos e monócitos. Os achados do estudo

fornece evidências de ATP secretado de *A. actinomycetemcomitans* como um novo fator de virulência que contribui para a inflamação durante a doença periodontal.

O papel de defesa dos tecidos periodontais é exercido pelos macrófagos (LIU *et al.*, 2014; RUCKERL; ALLEN, 2014; YANG *et al.*, 2014). Após o tecido ser infectado, os monócitos que estavam na corrente sanguínea deslocam-se para o local do estímulo bacteriano onde são ativados e se tornam macrófagos. Em seguida, ocorrem processos nocivos ao tecido conjuntivo periodontal, como a fagocitose das bactérias e a liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e collagenases. A contribuição para destruição dos tecidos periodontais também ocorre pela secreção, por monócitos, de altos níveis de metaloproteinase, espécies reativas do oxigênio (ROS), fator de necrose tumoral (TNF), IL-1, IL-6 e RANKL, amplificando a resposta inflamatória para controlar a infecção bacteriana (VARANAT *et al.*, 2017).

Os neutrófilos são células imunes inatas fagocitárias essenciais para a eliminação de bactérias por meio da ativação de uma ampla variedade de respostas efetoras e geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS). A maioria das ROS nos neutrófilos é gerada pela ativação da enzima geradora de superóxido nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (ZENG *et al.*, 2019). Os neutrófilos desempenham um papel importante na manutenção da saúde bucal por meio de interações com biofilmes microbianos orais. Tanto a hiperatividade dos neutrófilos quanto a subversão bacteriana das respostas dos neutrófilos podem causar dano tecidual mediado pela inflamação, como observado na doença periodontal (OVEISI *et al.*, 2019). Neste estudo de OVEISI, foi demonstrado que biofilmes bacterianos específicos alteram diferentemente as vias de ativação dos neutrófilos, influenciando a fagocitose, produção de ROS, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos e liberação de mieloperoxidase.

Os neutrófilos são o principal tipo de célula imune no sangue humano adulto e os mediadores primários das respostas inflamatórias contra microrganismos invasores. Os neutrófilos circulantes migram para os tecidos periféricos, como a pele, intestino, pulmões e tecido periodontal, em resposta à infecção ou inflamação. (KORKMAZ *et al.*, 2010). Ao fagocitarem microrganismos, os neutrófilos ativam processos microbicidas, que envolvem grânulos contendo peptídeos antimicrobianos, proteínas e serino-proteases (DELIMA; VAN DYKE, 2003).

Os neutrófilos parainflamatórios orais são capazes de interagir com biofilmes comensais sem induzir uma resposta inflamatória, demonstrando que nem todos os neutrófilos que trafegam através dos tecidos periodontais são totalmente ativados (FINE *et al.*, 2016).

A maioria dos leucócitos segregados do fluido crevicular é do tipo neutrófilo. Essas células se acumulam rapidamente nos tecidos periodontais, onde há acúmulo de placa bacteriana (NICU; LOOS, 2016). Os neutrófilos atuam na eliminação bacteriana e também nos processos de destruição de tecidos na periodontite. Anormalidades genéticas na migração de neutrófilos, quimiotaxia e fagocitose se manifestam como formas graves de periodontite (NICU; LOOS, 2016). Estudos mostraram que a capacidade fagocitária dos neutrófilos não varia significativamente com a idade ou sexo dos indivíduos (GURSOY *et al.*, 2008).

A função dos neutrófilos é fundamental para início e progressão de doenças infecciosas inflamatórias (KURGAN *et al.*, 2017). A leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, além de induzir apoptose em linfócitos, induz a degranulação de neutrófilos, o que resulta na ativação e liberação de enzimas proteolíticas como a elastase e a MMP-8 (BELIBASAKIS *et al.*, 2019; JOHANSSON *et al.*, 2017). Análises bioquímicas e morfológicas mostram que a leucotoxina exibe citotoxicidade contra neutrófilos humanos, sugerindo que a mesma agrava a periodontite por meio de uma via dependente de neutrófilos (HOGLUND, 2014).

A ação das citocinas na patogênese da doença periodontal envolve a estimulação da atividade microbicida, estímulo da reabsorção óssea e da destruição dos tecidos moles periodontais (LIU *et al.*, 2016). Os neutrófilos também desempenham um papel importante na imunorregulação e sua atividade é modulada por várias citocinas pró e anti-inflamatórias. Qualquer fator que quebre a homeostase resultará no dano da imunidade do hospedeiro e pode ter relação com a periodontite (LIU *et al.*, 2016). Os neutrófilos de pacientes com periodontite apresentam baixa resposta antioxidante, resultando em aumento do dano tecidual oxidativo (SIMA *et al.*, 2016). Algumas citocinas têm efeitos pró-inflamatórios, como IL-1, TNF, IL-6, IL-8 e IL-12, enquanto outras têm efeitos anti-inflamatórios, como IL-4, IL-10 e fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (NICU; LOOS, 2016). IL-1 e TNF estão presentes em altas concentrações nos tecidos periodontais durante a periodontite ativa, são catabolicamente ativos na estimulação da reabsorção óssea e seus níveis são reduzidos após a terapia periodontal mecânica (NICU; LOOS, 2016). Uma subpopulação de células T auxiliares denominada LTh17 secreta a citocina IL-17 que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, levando a ativação de células imunes inatas, a indução de vias de sinalização pró-inflamatória e recrutamento de neutrófilos (DONG, 2006). IL-17 também está envolvida na destruição tecidual por meio da estimulação da produção de metaloproteinases de matriz e RANKL por células estromais (ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015). No estudo de Eskin *et al.* (2012), a infiltração de neutrófilos e o aumento da perda óssea foram

associados à sinalização de IL-17. Na periodontite crônica resistente à terapia convencional, a alta produção de ROS por neutrófilos está associada à destruição grave do periodonto (SIMA *et al.*, 2016).

A resposta imune adaptativa das células T resulta na produção de citocinas que podem ser protetoras, mas também envolvidas na destruição do osso periodontal (GARLET *et al.*, 2008). Os neutrófilos podem potencialmente suprimir a ativação das células T liberando arginase-1 (esgota a arginina necessária para a ativação das células T) ou entregando peróxido de hidrogênio na sinapse imunológica de uma maneira dependente da integrina Mac-1 (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017). Os neutrófilos também podem suprimir indiretamente a ativação das células T por meio da mieloperoxidase ou por mecanismos dependentes da elastase que inibem a função das células dendríticas (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017). Além disso, os neutrófilos podem liberar ectossomos que podem regular negativamente a atividade inflamatória das células imunes inatas, como macrófagos e células *natural killer* (NK) (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

No estudo de Herbert *et al.* (2016) todas as células imunes do hospedeiro derivadas do sistema hematopoiético, incluindo neutrófilos, macrófagos, células T e osteoclastos, responderam à presença de *A. Actinomycetemcomitans in vitro*.

Estudos sugerem que o fator de virulência LtxA do *A. actinomycetemcomitans* medeia a lise de neutrófilos humanos e induz a liberação subsequente de elastase de neutrófilos, a qual pode causar ruptura do tecido periodontal e, assim, agravar a periodontite (HIYOSHI *et al.*, 2019). Essa leucotoxina, quando associada à poli-N-acetilglucosamina, pode também proteger o *A. actinomycetemcomitans* da ação bactericida dos macrófagos. Além disso, o fator de virulência CDT induz apoptose em macrófagos em proliferação (RABIN *et al.*, 2009) e, interrompendo sua atividade fagocítica, modifica o equilíbrio das citocinas (ANDO-SUGUIMOTO *et al.*, 2020). Também foi mostrado que apesar das linhagens de células fibroblásticas serem suscetíveis à CDT, as células do ligamento periodontal não são (SMITH, 2006).

1.4 Uso dos bisfosfonatos no tratamento periodontal

O tratamento da periodontite visa prevenir a progressão da doença e restaurar tecidos perdidos, por meio de técnicas de mudança comportamental do paciente, como instruções de higiene oral personalizadas; apoio à cessação do tabagismo; intervenção dietética; instrumentação subgingival para remover a placa e o cálculo; farmacoterapia local e

sistêmica; e vários tipos de cirurgia. A doença periodontal crônica requer uma combinação de modalidades terapêuticas e compromisso ao longo da vida com autocuidado periodontal (GRAZIANI *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, a aplicação tópica de bisfosfonatos nos sítios periodontais, como adjuvante no tratamento periodontal, tem mostrado resultados clínicos satisfatórios. A utilização tópica do gel de alendronato de sódio a 1% no tratamento periodontal não cirúrgico mostrou melhora do quadro clínico periodontal (KANORIYA *et al.*, 2016).

O alendronato é uma substância farmacêutica com caráter ácido-básico e hidrofílico com permeabilidade reduzida (OCHIUZ *et al.*, 2016). Também apresenta uma biocompatibilidade favorável, menor toxicidade se comparado a outros polímeros, tem a capacidade de sequestrar o cálcio do fosfato de cálcio e apresenta alta solubilidade em meio aquoso (DOLCI *et al.*, 2017).

A aplicação de enxerto de hidroxiapatita associado a 200 µg de solução de alendronato no tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais na periodontite crônica mostrou diminuição significativa no índice gengival, profundidade de bolsa e perda de inserção clínica, em 3 e 6 meses (GUPTA *et al.*, 2011). Além disso, em bolsas periodontais associadas a defeitos intraósseos, foi observada significativa redução de profundidade à sondagem e perda de inserção, ganho radiológico e ganho volumétrico de defeito ao final de 6 meses (GUPTA *et al.*, 2011).

O alendronato a 1% como adjuvante da terapia possui propriedades anti-reabsortivas e osteoestimulantes. O seu uso foi avaliado no aplainamento radicular em pacientes com periodontite crônica com defeitos de furca de classe II, encontrando-se uma porcentagem média significativamente maior de redução da profundidade do defeito com o uso do alendronato em 6 e 12 meses. O alendronato também mostrou melhora significativa em todos os parâmetros clínicos (IPSHITA *et al.*, 2018).

Estudos usaram o alendronato como um complemento à terapia periodontal por meio de aplicação tópica, via oral, e estudo de meta-análise mostrou uma redução estatisticamente significativa da doença periodontal e ganho de inserção (AKRAM *et al.*, 2017). A aplicação de alendronato de sódio a 10^{-5} M como adjuvante no tratamento mecânico da periodontite induzida em ratos também mostrou resultados satisfatórios em região de furca dos dentes (DE ALMEIDA *et al.*, 2015).

Outro estudo em modelo experimental de periodontite em ratos mostrou que a injeção subcutânea de alendronato reduziu a atividade dos osteoclastos e diminuiu significativamente a reabsorção da crista alveolar. Enquanto a imunoe expressão de RANKL não foi inibida pelo

medicamento, a expressão de osteoprotegerina (OPG) foi aumentada nos animais tratados (MOREIRA *et al.*, 2014).

Defeitos ósseos verticais interproximais foram tratados aleatoriamente com gel de alendronato a 1% em aplicação única e foram avaliados pelos parâmetros dos índices periodontais 6 meses após o tratamento. Embora o alendronato tenha produzido um ganho maior de nível de inserção clínica quando comparado ao placebo, 6 meses após o tratamento, ambos os tratamentos produziram efeitos semelhantes na profundidade de bolsa, sangramento à sondagem e altura óssea. Diferenças significativas no preenchimento ósseo foram observadas apenas em pacientes do grupo tratado com alendronato 6 meses após o tratamento (DUTRA *et al.*, 2017).

Outro estudo em modelo de periodontite em ratos induzida por inoculação oral de *P. gingivalis* e *F. Nucleatum* mostrou que o uso de alendronato, via oral, por 8 semanas reduziu a perda óssea, sugerindo potencial de inibição da progressão da doença periodontal em indivíduos que utilizam essa droga e recebem tratamento periodontal convencional (STORRER *et al.*, 2016).

A utilização tópica de alendronato como adjuvante no tratamento da doença periodontal tem mostrado efeitos significativos na melhoria de parâmetros clínicos e radiográficos. O efeito dos bisfosfonatos na atividade de osteoclastos é bem conhecido, entretanto, os efeitos desses fármacos na atividade de células imunocompetentes durante combate microbiano ainda não foram completamente esclarecidos. Considerando o papel dos neutrófilos e monócitos na doença periodontal, torna-se relevante avaliar os efeitos do alendronato na atividade dessas células durante estimulação com periodontopatógeno, quanto à viabilidade celular, atividade microbicida e a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do alendronato de sódio em concentração de uso tópico periodontal na produção de espécies reativas do oxigênio e na expressão de TLRs e citocinas por granulócitos e monócitos humanos estimulados com *A. actinomycetemcomitans*.

2.2 Objetivos específicos

- a) determinar e comparar o efeito do alendronato de sódio na produção de espécies reativas do oxigênio e na expressão de TLR2, TLR4 e das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF e TGF- β 1 por granulócitos e monócitos humanos, *in vitro*;
- b) determinar e comparar o efeito do alendronato de sódio na produção de espécies reativas do oxigênio e na expressão de TLR2, TLR4 e das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF e TGF- β 1 por granulócitos e monócitos humanos estimulados *in vitro* com *A. actinomycetemcomitans*.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “**Sodium alendronate affects the activity of human leukocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***” será submetido ao periódico **Journal of Applied Oral Science (Qualis A2)**. Endereço eletrônico para acesso às normas do periódico: <https://www.scielo.br/journal/jaos/about/#instructions>

Sodium alendronate affects the activity of human leukocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Priscila dos Santos Simões^a, Carolina Kol^b, Walderez Ornelas Dutra^b, Celso Martins Queiroz-Junior^c, Mila Fernandes Moreira Madeira^c, Martinho Campolina Rebello Horta^a, Paulo Eduardo Alencar Souza^a.

^aPostgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Laboratory of Biology of Cellular Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^c Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author: Paulo Eduardo Alencar Souza. Department of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Avenida Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101, Coração Eucarístico. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 30535-901. Telephone: +55 31 3319-4414. FAX: +55 31 3319-4415. E-mail: pauloalencar@pucminas.br.

ABSTRACT

Objectives: Sodium alendronate (Ale) has been used topically as an adjuvant in the treatment of periodontal disease, with satisfactory clinical results. The aim of this work was to evaluate the effect of topical doses of Ale on the activity of granulocytes and monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(Aa) in vitro.

Methods: Blood samples from 10 healthy subjects were incubated with 1% Ale for 2 hours. Then, Aa was added and, after 6 hours of incubation, lysis of red blood cells was performed. Cell viability, production of reactive oxygen intermediates, labeling with DHR123, expression of TLR2 and TLR4 and expression of cytokines IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF and TGF- β 1 by granulocytes (CD66b⁺) and monocytes (CD14⁺) were evaluated by flow cytometry.

Results: Ale did not significantly affect the viability of human granulocytes and monocytes. Ale reduced the expression of CD66b, DHR123, TLR4, IL-8, TNF and IL-10 in granulocytes and the expression of TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and TGF- β 1 in monocytes *ex vivo*. Considering cells stimulated with Aa, Ale reversed the effects of the bacteria on granulocytes, reducing the expression of CD66b, DHR123 and IL-8 and increasing the expression of TNF and IL-10 in granulocytes. In monocytes, Ale also reversed the effect of Aa, reducing the expression of DHR123, IL-1 β , IL-8, TNF and IL-10. Ale was able to further reduce TLR4 expression in Aa-stimulated monocytes.

Conclusion: Alendronate is able to modulate the activation of granulocytes and the expression of TLR, reactive oxygen intermediates and cytokines by granulocytes and monocytes stimulated or not with Aa, suggesting that the topical use of this bisphosphonate in periodontal tissues may affect the immunoinflammatory mechanisms involved in periodontal disease.

Keywords: Alendronate. Cytokines. Granulocytes. Monocytes. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

INTRODUCTION

Periodontitis is a chronic multifactorial inflammatory disease associated with dysbiotic plaque biofilms and characterized by the progressive destruction of the dental support apparatus.¹ It can affect one or more sites in the mouth, involving the gingiva, periodontal ligament and alveolar bone. The accumulation of bacterial plaque is considered the main causal factor, because in the presence of bacterial products host cells secrete chemical mediators that participate in the processes of bone resorption and degradation of the extracellular matrix, which can lead to loss of attachment, which is irreversible damage.² The bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is an important microorganism capable of interfering with the defense mechanisms of the periodontium and bone homeostasis.³

In response to biofilm accumulation, leukocytes rapidly accumulate in periodontal tissues.⁴ Macrophages and neutrophils play an important role in the pathogenesis of periodontitis, acting in immunoregulation, in the elimination of bacteria through phagocytosis and generation of large amounts of reactive oxygen species and in tissue destruction processes, through secretion of enzymes, cytokines and other inflammatory mediators.^{5,6} The activity of these cells in periodontal tissues is modulated by several pro- and anti-inflammatory cytokines.⁵ After supportive periodontal therapy, patients show a significant increase in phagocytic functions.⁷

In recent years, topical application of sodium alendronate to periodontal sites as an adjuvant in periodontal treatment has shown satisfactory clinical results^{8,9,10,11}. Alendronate is a bisphosphonate widely used in the treatment of osteoporosis, which has an inhibitory effect on osteoclast activity and, consequently, on bone resorption¹². In addition to the action on osteoclasts, studies have shown that bisphosphonates can act directly on monocytes and macrophages, altering cell morphology, reducing cell survival, differentiation and function, affecting the secretion of matrix metalloproteinases and the expression of toll-like receptor 4^{13,14}. Bisphosphonates were also able to inhibit neutrophil chemotaxis in vitro and the activity of the NADPH oxidase enzyme in a dose-dependent manner and neutrophil recruitment in vivo¹⁵.

Although the effects of bisphosphonates on osteoclast activity are already known, little is known about their effects on immunocompetent cells, especially when they are stimulated by oral microorganism products, as occurs in periodontal tissues. Considering the role of neutrophils and monocytes in combating periodontal microorganisms and tissue destruction, it is relevant to evaluate the effects of concentrations of topical use of sodium alendronate on the activity of these cells under stimulation with periodontopathogens. The aim of the present work was to evaluate the effect of sodium alendronate (Ale) on cell viability and on the expression of molecules involved in the immunoinflammatory responses by granulocytes and monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in vitro.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples

Approximately 20 mL of blood was collected from ten healthy voluntary donors through peripheral vein puncture, using tubes containing heparin (Becton Dickinson Vacutainer®, USA). Exclusion criteria were: smokers, immunosuppression, systemic infectious disease, chronic alcoholics, autoimmune disease, chronic inflammatory diseases or who were undergoing treatment with antibiotic, chemotherapy, antineoplastic, immunosuppressive or anti-inflammatory drugs in the last 30 days. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Minas Gerais, under number CAAE: 61550216.0.0000.5137.

Sodium alendronate

Sodium alendronate (Rini Life Science Pvt. Ltd, India) (Ale) was dissolved in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) medium (Sigma Aldrich), moments before use. Previous experiments performed by our research group showed that Ale concentrations ranging from 0.125 to 2% did not significantly affect granulocyte viability (90.7% to 92.4% viability in CD66b⁺ cells) or monocyte viability (86.6% to 91.8% viability in CD14⁺ cells) in short-term culture, using Live/Dead staining and flow cytometry methods. Based on the Ale concentration used clinically in periodontal treatment, a final concentration of 1% in culture was defined for use in the experiments.

Bacteria preparation

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC29523) samples were cultured on TSA agar supplemented with 5% blood and 5% yeast extract, in anaerobic jars containing a gas mixture of 90% N₂ and 10% CO₂, at 37°C, for 48h. Colonies were transferred to tubes containing saline, homogenized and quantified in a spectrophotometer (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Biochrom, Cambridge, UK), at OD of 1, at a wavelength of 600nm. Then, the bacteria were washed with PBS and heated for 30 minutes at 100°C for heat inactivation. The inactivated bacteria were kept at -80°C for use in the experiments.

Treatment with alendronate and stimulation with *A.actinomycetemcomitans*

1mL blood samples from each donor were transferred to polypropylene tubes and sodium alendronate (Ale) was added at final concentration of 1% in culture. The samples were kept at 37°C, 5% CO₂, for 2 hours. Then, *A.actinomycetemcomitans* (Aa) was added at a final concentration of 3x10⁶ CFU/mL and the samples were incubated for another 6 hours in a 5% CO₂ atmosphere, 37°C. Four hours before the end of incubation, in all experimental groups, Brefeldin A (1 µg/ml) (eBioscience, San Diego, CA, USA) was added to the tubes.

At the end of the treatments, the blood was transferred to 50mL conical tubes and 20mL of lysis solution (8.26g/L NH₄Cl; 1g/L KHCO₃; 37.2mg/L Na₂EDTA) were added to each 1mL of

blood to lyse the red blood cells. The samples were incubated for 15 minutes at room temperature, protected from light, with gentle agitation and then centrifuged at 600g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the cells washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) by centrifugation. Cells were resuspended in PBS and distributed into wells of 96-well U-bottom plates for immunofluorescence reactions. Cells were added to each well in proportion to the volume of 400 µL of blood.

Two experimental groups were established: cells stimulated or not with Aa. In each group, the effect of Ale on the expression of the markers was evaluated, thus obtaining four experimental conditions: Control (RPMI); Ale (1% Sodium Alendronate); Aa (*A. actinomycetemcomitans*); Ale + Aa (Sodium Alendronate + *A. actinomycetemcomitans*).

Assessment of cell viability

To assess cell viability after each treatment, Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to the cells along with anti-CD14 (FITC, clone M5E2, BioLegend) and anti-CD66b (PE, clone G10F5, BioLegend) monoclonal antibodies for phenotypic identification of monocytes and granulocytes, respectively. After 30 minutes of incubation at 4°C, the cells were washed with PBS 0.5% fetal bovine serum (SFB), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, washed with PBS and kept at 4°C until acquisition of 100,000 events per tube on the FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Evaluation of reactive oxygen species

To measure the production of reactive oxygen species, especially hydrogen peroxide, cells were centrifuged at 600g for 10 minutes at 4°C, washed twice with PBS and incubated with anti-CD14 antibody (FITC, clone M5E2, BioLegend), anti-CD66b antibody (PE, clone G10F5, BioLegend), dihydrorodamine 123 (DHR123) (Life Technologies, Molecular Probes, Oregon, USA) and Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), for 30 minutes at 4°C. Then, the cells were washed with PBS 0.5% fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, washed with PBS and kept at 4°C, until acquisition of 100,000 events per tube in the FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Immunofluorescence reactions for TLR and cytokine labeling

Cells were incubated for 30 minutes at 4°C with Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-CD14 (FITC or APC, clone M5E2, BioLegend), anti-CD66b (PE, clone G10F5, BioLegend), anti-TLR2 (FITC, clone TL2.1, BioLegend) and anti-TLR4 (APC, clone HTA125, BioLegend) monoclonal antibodies. Then, the cells were washed with PBS 0.5% fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, and washed again with PBS. For intracytoplasmic labeling, cells were permeabilized with 0.5% saponin

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated with anti-IL-1 β (ALEXA FLUOR 647, clone JK1B-1, BioLegend), anti-IL-8 (PerCP-Cy5, clone BH0814, BioLegend), anti-IL-10 (PE/Cy7, Clone JES3-19F1, BioLegend), anti-TNF (PE/Cy7, clone MAb11, Biolegend) and LAP (TGF- β 1) (PE/Cy7, clone TW4-2F8, BioLegend) monoclonal antibodies for 30 minutes at room temperature. After washing with 0.5% saponin and PBS, the cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA), with acquisition of 100,000 events per tube. Unlabeled cells and isotype controls conjugated to the fluorochromes FITC, PE, PE/Cy7, APC, ALEXA FLUOR 647 and PerCP-Cy5 were added to all experiments.

Cytometric analyzes

FlowJo X software (Tree Star Inc., USA) was used for cytometric analysis. Considering the viable cells by Live/Dead staining, CD66b positive (granulocytes) and negative cells were selected. Within the CD66b negative population, the CD14⁺ population (monocytes) was selected (Fig. 1). Within the granulocyte (CD66b⁺) and monocyte (CD14⁺) populations, the percentages of positive cells and the median fluorescence intensity (MFI) for DHR123, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and TGF- β 1 were quantified. To analyze the cell viability of granulocytes and monocytes, CD66b⁺ or CD14⁺ populations were initially selected and within each of these populations the percentages of positive cells for Live/Dead were quantified.

Statistical analysis

The Kolmogorov-smirnov normality test was used to verify data distribution. To verify the existence of differences in the expression of markers between the control group and the group stimulated with Aa and between the groups treated or not with Ale, the paired Student's t test was used, with a significance level of 5%. Analyzes were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

Cell viability analysis of granulocytes and monocytes in different treatments

Cell viability analysis by Live/Dead staining showed that 1% Ale was not able to significantly affect the viability of human granulocytes and monocytes (Fig. 2). Stimulation with Aa significantly reduced the viability of CD66b⁺ granulocytes, but prior exposure of these cells to Ale reversed this effect (Fig. 2A). Considering the population of CD14⁺ monocytes, stimulation with Aa also reduced cell viability and previous exposure of these cells to Ale was able to further reduce cell viability (Fig. 2).

Effect of Ale on CD66b expression and production of reactive oxygen species by granulocytes

Analysis of CD66b expression showed that Ale significantly reduced the MFI of this molecule in the granulocyte population (Fig. 3A). Stimulation with Aa significantly increased CD66b MFI when compared to the control group (Fig. 3A). However, prior exposure to Ale significantly reduced CD66b MFI in Aa-stimulated granulocytes, reversing the effect of bacteria (Fig. 3A).

Analysis of the production of reactive oxygen species, especially hydrogen peroxide, by labeling with dihydrorhodamine123 (DHR123), showed that exposure to Ale reduced the frequency of positive cells and DHR123 MFI in granulocytes (Fig. 3B and C). Stimulation with Aa increased the frequency of DHR123⁺ cells, but reduced the MFI of this molecule in granulocytes (Fig. 3B and C). Exposure to Ale significantly reduced the frequency of DHR123⁺ cells in the Aa-stimulated granulocytes, reversing the stimulatory effect of bacteria (Fig. 3B).

Effect of Ale on TLR2 and TLR4 expression by granulocytes

Treatment with Ale significantly reduced the frequencies of TLR4⁺ cell and the MFI of these molecule in CD66b⁺ granulocytes (Fig. 3F and G), although it did not significantly affect TLR2 expression in this cell population (Fig. 3D and E). Stimulation with Aa reduced the frequency of TLR2⁺ cells (Fig. 3D), but increased the MFI of TLR2 and TLR4 in the CD66b⁺ population (Fig. 3E and G). Considering Aa-stimulated cells, the treatment with Ale increased the frequencies of TLR2⁺ and TLR4⁺ cells, but reduced the MFI of TLR2 in granulocytes (Fig. 3D, E and F).

Effect of Ale on cytokine expression by granulocytes

Analysis of cytokine production showed that exposure to Ale significantly reduced the MFI of IL-8 and TNF (Fig. 4D and F) and the frequency of IL-10⁺ cells (Fig. 4G) in the CD66b⁺ granulocyte population.

In the CD66b⁺ granulocyte population, stimulation with Aa significantly increased the frequencies of IL-1 β and IL-8 producing cells (Fig. 4 A and C), as well as the MFI of IL-8 (Fig. 4D), but reduced the frequencies of TNF⁺ and IL-10⁺ cells (Fig. 4E and G). Considering the cells stimulated with Aa, exposure to Ale reduced the MFI of IL-8 (Fig. 4D) and increased the frequencies of TNF⁺ and IL-10⁺ cells (Fig. 4E and G), reversing the effects of the bacteria on the expression of these cytokines in the population of CD66b⁺ granulocytes.

Effect of Ale on the production of reactive oxygen species by monocytes

Exposure to Ale did not significantly alter the expression of DHR123 in CD14⁺ monocytes not stimulated with Aa (Fig. 5A and B).

Stimulation with Aa significantly increased the frequency of DHR123 positive cells in the CD14⁺ monocyte population (Fig. 5A). Considering Aa-stimulated cells, exposure to Ale significantly

reduced the frequency of DHR123⁺ cells (Fig. 5A), reversing the effect of the bacteria on the production of reactive oxygen intermediates by the CD66b⁺ granulocyte population.

Effect of Ale on TLR2 and TLR4 expression by monocytes

Exposure to Ale significantly reduced the frequencies of TLR4⁺ cells (Fig. 5E) and the MFI of TLR2 and TLR4 (Fig. 5D and F) in CD14⁺ monocytes not stimulated with Aa.

Stimulation with Aa significantly reduced the frequency of TLR2⁺ cells and the MFI of this molecule (Fig. 5C and D), as well as the frequency of TLR4⁺ cells (Fig. 5E) in the CD14⁺ monocyte population. Considering Aa-stimulated CD14⁺ monocytes, exposure to Ale significantly reduced the frequencies of TLR4⁺ cells (Fig. 5E).

Effect of Ale on cytokine expression by monocytes

Analysis of cytokine production in CD14⁺ monocyte not stimulated with bacteria showed that exposure to Ale significantly reduced the frequencies of IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and TGF- β 1 producing cells (Fig. 6A,C, E, G and I), as well as the MFI of IL-8 and TGF- β 1 (Fig. 6F and J).

Stimulation with Aa significantly increased the frequencies of positive cells and the MFI of the cytokines IL-1 β , IL-8, TNF and IL-10 (Fig. 6A to F), but reduced the frequency of positive cells and the MFI of TGF- β 1 (Fig. 6I and J) in the CD14⁺ monocyte population. Considering Aa-stimulated cells, exposure to Ale reduced the MFI of IL-1 β , IL-8 and TNF (Fig. 6B, D and F) and also reduced the frequencies of TNF⁺ and IL-10⁺ cells (Fig. 6E and G), partially reversing the effects of the bacteria on the expression of these cytokines in the population of CD14⁺ monocytes.

DISCUSSION

Topical application of bisphosphonates to periodontal sites as an adjunct to periodontal treatment has shown satisfactory clinical results. Topical use of 1% sodium alendronate gel in non-surgical periodontal treatment has shown improvement in the clinical parameters, in terms of bleeding on probing, clinical attachment loss and probing depth.¹⁰ Bisphosphonates act directly on monocytes and macrophages, reducing survival, inducing morphological changes, impairing the differentiation of monocytes into macrophages and affecting macrophage function.¹³ Previous studies have shown that macrophage viability was affected by alendronate at a concentration of 100 μ M, while at low doses of 1 to 10 μ M, a stimulatory effect was observed, with increased expression of matrix metalloproteinases by macrophages.¹³

Studies have shown that bisphosphonates are endocytosed by phagocytic cells, affecting the activity of these cells. In the present study, the cytotoxicity in granulocytes and monocytes of sodium alendronate (Ale) concentration used topically in periodontal treatment was evaluated. Cytometric analyzes showed that 1% alendronate did not significantly affect the viability of human granulocytes and monocytes in short-term culture. Stimulation of leukocytes with *A. actinomycetemcomitans* (Aa)

reduced the viability of granulocytes and monocytes, confirming the pathogenicity of Aa demonstrated in previous studies. The production of leukotoxins, such as protein exotoxins and CDT, represents an important virulence factor of Aa in periodontal disease, significantly affecting the viability and activity of immunocompetent cells in periodontal tissues.¹⁶ Exposure to Ale in Aa-stimulated cells significantly increased granulocyte cell viability, while in monocytes, it caused an even greater reduction in cell viability. Previous studies have shown that the effects of bisphosphonates on phagocytes depend on drug concentration. In this context, it is important to emphasize that in vivo, the presence of crevicular fluid and saliva, acting on periodontal sites, can elute bisphosphonates applied in gel form and reduce the bioavailability of these drugs to cells present in tissues. Furthermore, the molecular mechanisms by which Ale acts on phagocytes stimulated by bacterial products have not yet been established. It is possible that different signaling pathways activated by Aa products in granulocytes and monocytes are affected differently by Ale, which would explain the different effects of this bisphosphonate on the viability of these cell populations.

The CD66b molecule, expressed on the surface of granulocytes, plays a role in cell adhesion, chemotaxis and binding to microbial products, and the intensity of its expression is related to the level of neutrophil activation.¹⁷ In the present study, stimulation of granulocytes with Aa significantly increased CD66b expression. Exposure to Ale reduced the MFI of CD66b in both Aa-stimulated and not stimulated cells, reversing the bacterial effect on cells. These data suggest an inhibitory effect on granulocyte activation performed by Ale.

The results obtained in the analysis of the expression of DHR123, a marker of the production of reactive oxygen intermediates, especially hydrogen peroxide, corroborate the findings observed in the expression of CD66b. While stimulation with Aa significantly increased the frequency of DHR123⁺ cells, treatment with Ale reduced the expression of this marker, both in Aa-stimulated or not stimulated granulocytes. Aa infection stimulates leukocytes to produce reactive oxygen intermediates, molecules involved in the microbicidal activity of phagocytes.¹⁸ Inhibition of the production of reactive oxygen intermediates by Ale may represent an unfavorable local effect of bisphosphonate in the fight against to periodontopathogenic bacteria by neutrophils. Studies on the microbicidal capacity of neutrophils treated with Ale are needed to elucidate the local effects of the application of this bisphosphonate on periodontal sites during periodontal therapy.

Analysis of toll-like receptors (TLRs) expression showed that Ale reversed the effects of Aa stimulation on TLR2 expression by granulocytes. While Aa reduced the frequency of TLR2⁺ cells and increased the MFI of this molecule, exposure to Ale increased the frequency of positive cells and reduced the MFI of TLR2 in Aa-stimulated granulocytes. While Ale reduced the expression of TLR4 in granulocytes not stimulated with Aa, in Aa-stimulated cells Ale increased the expression of this receptor. TLRs consist of receptors of molecular patterns associated with pathogens, which are expressed in leukocytes and activate intracellular signaling pathways involved in the production of various cytokines and stimulation of inflammatory responses.¹⁹ It has been shown that the binding of

microbial products from Aa to TLR4 is important for the generation of reactive oxygen intermediates and, consequently, for the microbicidal activity of neutrophils.²⁰ The binding of microbial molecules to TLR2 induces the production of pro-inflammatory cytokines, but also of cytokine with anti-inflammatory activity, such as IL-10.²¹ A previous study showed that the expression of TLR2 and TLR4 by Aa-stimulated leukocytes varies according to time, with a significant increase in the first three hours, followed by a reduction in expression.²² The production of inflammatory cytokines induced by the binding of bacterial LPS to TLR4 contributes to tissue destruction in periodontal disease.²¹ Furthermore, intensities of expression of TLR2 in granulocytes were higher in patients with active periodontal disease when compared with individuals with periodontal health.²³ The modulation of TLRs expression by Ale on the surface of granulocytes could interfere in the processes of recognition of periodontopathogen products and in the activity of immunocompetent cells in the periodontal tissues.

In the present study, Ale treatment reduced the expression of IL-8, TNF and IL-10 by granulocytes not stimulated with Aa. TNF is one of the main pro-inflammatory cytokines, stimulating the expression of adhesion molecules in the vascular endothelium, the production of chemokines, the activation of leukocytes and the microbicidal activity of phagocytes.²⁴ IL-8 is a pro-inflammatory chemokine responsible for the recruitment of neutrophils to sites of infection. Another important role of IL-8 is the ability to stimulate the production of reactive oxygen intermediates, potentiating the microbicidal activity of neutrophils. The inhibition caused by alendronate of the expression of these important cytokines involved in periodontal disease may reinforce the inhibitory effect of alendronate on unstimulated granulocytes, corroborating the results obtained in relation to the expression of CD66b, DHR123 and TLR4. IL-10 is a cytokine with anti-inflammatory action, inhibiting the expression of several pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 and TNF, the expression of costimulatory molecules in cells presenting antigens and phagocyte activity.²⁵ The reduction in the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines by Ale may represent an inhibitory effect on granulocyte activity. Although the inhibition of neutrophil activity by alendronate may contribute to the reduction of the periodontal inflammatory process, the activity of these cells is fundamental in the fight against periodontopathogenic bacteria. Thus, the significant reduction of bacterial colonization in periodontal tissues by supportive periodontal therapy would be an important condition for the use of Ale as an adjuvant in the treatment.

In the present study, stimulation with *A. actinomycetemcomitans* modulated the expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines by granulocytes. Previous studies have shown the effect of this periodontopathogen on cytokine production in patients with periodontitis and the importance of cytokines in microbial combat.¹⁸ Treatment with Ale reversed the effects of Aa on the expression of IL-8, TNF and IL-10 cytokines by granulocytes, suggesting the ability to modulate the immunoinflammatory response by alendronate in periodontal tissues. Studies have shown the

immunomodulatory effect of alendronate in an experimental model, with a reduction in myeloperoxidase activity and neutrophil recruitment in periodontal tissues.²⁶

Analysis of the monocyte population showed that treatment with Ale reduced the expression of DHR123 in cells stimulated with Aa, suggesting the potential of alendronate to inhibit the production of ROS, important molecules in the microbicidal activity against periodontopathogenic bacteria.

TLR2 and TLR4 expression was significantly reduced by alendronate treatment in unstimulated monocytes. In cells stimulated with Aa, Ale reduced the expression of TLR4. The early encounter of monocytes with TLR agonists can result in differentiation in the macrophage lineage, being important for the fight against bacteria.²⁷ The presence of a balance between activation and inactivation of these receptors was shown to be necessary to avoid an excessive inflammatory or immune response, as occurs in chronic inflammatory diseases.²⁸ TLRs proved to be important in the study cited for their regulation to maintain a balance between health and disease, from intra and extracellular regulatory receptors. The expression of these receptors can also be negatively modulated by the cellular activation state. Our data suggest that alendronate may reduce the recognition of microbial products via TLR by monocytes in periodontal tissues, which would reduce cytokine production. Thus, this reduction would contribute to the reduction of inflammation in periodontal tissues. Exposure of bacterial-stimulated cells to alendronate further reduced the expression of TLR4. Other study²⁹ demonstrated that TLR signaling regulates macrophage cytokine production in response to *A. actinomycetemcomitans*, corroborating our results.

When we analyzed the production of cytokines considering the population of monocytes not stimulated with bacteria, alendronate inhibited the expression of all evaluated cytokines IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF, TGF- β 1, suggesting an inhibitory effect of alendronate on human monocytes, with the effect previously observed in TLR being similar. It is not yet known whether there is a direct effect of alendronate on the intracellular signaling pathways involved in cytokine production. In contrast, the stimulation of monocytes with Aa increased in the expression of IL-1 β , IL-8, TNF and IL-10. It has been shown that Aa stimulates the production of TNF, IL-1 β and IL-8 by monocytes after 6h of bacterial challenge³⁰. Interestingly, exposure to Aa significantly reduced TGF- β 1 expression in monocytes in the present study. TGF- β is a growth factor involved in inhibiting inflammation and stimulating tissue repair in fibrous connective tissue, as seen in other studies³¹. Treatment with Ale reduced both the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by Aa-stimulated monocytes, indicating an inhibitory effect on the activity of these cells in response to periodontopathogen products.

The data obtained in this study showed that alendronate inhibits the expression of several molecules involved in the activity of human granulocytes and monocytes. This suggests that alendronate has clinically an effect of inhibiting the activation of the inflammatory process, contributing to the reduction of the destruction process of the periodontal tissue structures and

consequent improvement of the periodontal clinical parameters observed in different studies already published in the literature.

REFERENCES

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.
2. Ata-Ali J, Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Ata-Ali F, Palacio J, Peñarrocha-Diago M. Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015 Apr 1;15:43. doi: 10.1186/s12903-015-0031-9.
3. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol Oral Microbiol*. 2016 Jun;31(3):207-27. doi: 10.1111/omi.12119.
4. Almubarak A, Tanagala KKK, Papapanou PN, Lalla E, Momen-Heravi F. Disruption of Monocyte and Macrophage Homeostasis in Periodontitis. *Front Immunol*. 2020 Feb 26;11:330. doi: 10.3389/fimmu.2020.00330.
5. Liu YJ, Liu Y, Xu Y. [Developments of neutrophil function and the relationship between neutrophils dysfunction and periodontitis]. *Hua Xi Kou Qiang Yi XueZaZhi*. 2016 Apr;34(2):210-4. Chinese. doi: 10.7518/hxkq.2016.02.021.
6. Zeng MY, Miralda I, Armstrong CL, Uriarte SM, Bagaitkar J. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol Oral Microbiol*. 2019 Apr;34(2):27-38. doi: 10.1111/omi.12252.
7. Naiff PF, Carneiro VMA, Guimarães MDCM, Bezerra ACB, Oliveira MS, Couto SCP, et al. Mechanical Periodontal Therapy Recovered the Phagocytic Function of Monocytes in Periodontitis. *Int J Dent*. 2020 Feb 15;2020:8636795. doi: 10.1155/2020/8636795.
8. Akram Z, Abduljabbar T, Kellesarian SV, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Mar;83(3):444-454. doi: 10.1111/bcp.13147.
9. Gupta J, Gill AS, Sikri P. Evaluation of the relative efficacy of an alloplast used alone and in conjunction with an osteoclast inhibitor in the treatment of human periodontal infrabony defects: a clinical and radiological study. *Indian J Dent Res*. 2011 Mar-Apr;22(2):225-31. doi: 10.4103/0970-9290.84292
10. Kanoriya D, Pradeep AR, Singhal S, Garg V, Guruprasad CN. Synergistic Approach Using Platelet-Rich Fibrin and 1% Alendronate for Intrabony Defect Treatment in Chronic

- Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. J Periodontol. 2016 Dec;87(12):1427-1435. doi: 10.1902/jop.2016.150698.
11. Ipshita S, Kurian IG, Dileep P, Kumar S, Singh P, Pradeep AR. One percent alendronate and aloe vera gel local host modulating agents in chronic periodontitis patients with class II furcation defects: A randomized, controlled clinical trial. J Investig Clin Dent. 2018 Aug;9(3):e12334. doi: 10.1111/jicd.12334.
 12. Reszka AA, Rodan GA. Bisphosphonate mechanism of action. Curr Rheumatol Rep. 2003 Feb;5(1):65-74. doi: 10.1007/s11926-003-0085-6.
 13. Patntirapong S, Poolgesorn M. Alteration of macrophage viability, differentiation, and function by bisphosphonates. Oral Dis. 2018 Oct;24(7):1294-1302. doi: 10.1111/odi.12908
 14. Zhu W, Xu R, Du J, Fu Y, Li S, Zhang P, Liu L, Jiang H. Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. FASEB J. 2019 Apr;33(4):5208-5219. doi: 10.1096/fj.201801791RR.
 15. Kuiper JW, Forster C, Sun C, Peel S, Glogauer M. Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. Br J Pharmacol. 2012 Jan;165(2):532-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01592.x.
 16. Suprith SS, Setty S, Bhat K, Thakur S. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and assessment of leukotoxin in periodontal disease: A clinico-microbiological study. J Indian Soc Periodontol. 2018 May-Jun;22(3):201-208. doi: 10.4103/jisp.jisp_36_18.
 17. Kim D, Haynes CL. On-chip evaluation of neutrophil activation and neutrophil-endothelial cell interaction during neutrophil chemotaxis. Anal Chem. 2013 Nov 19;85(22):10787-96. doi: 10.1021/ac4020098.
 18. Okinaga T, Ariyoshi W, Nishihara T. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Invasion Induces Interleukin-1 β Production Through Reactive Oxygen Species and Cathepsin B. J Interferon Cytokine Res. 2015 Jun;35(6):431-40. doi: 10.1089/jir.2014.0127.
 19. Janciauskiene S, Vijayan V, Immenschuh S. TLR4 Signaling by Heme and the Role of Heme-Binding Blood Proteins. Front Immunol. 2020 Aug 27;11:1964. doi: 10.3389/fimmu.2020.01964.
 20. Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Torres SA, Santos CF, et al. The essential role of toll like receptor-4 in the control of Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection in mice. J Clin Periodontol. 2010 Mar;37(3):248-54. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01531.x.
 21. Ferraz EG, Silveira BBB, Sarmento VA, Santos JN. Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. RGO, Rev. Gaúch. Odontol. [Internet] Jul./Set. 2011. vol.59 no.3 . Availabe from: http://revodontobvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-86372011000400019.

22. Ando-Suguimoto ES, Benakanakere MR, Mayer MPA, Kinane DF. Distinct Signaling Pathways Between Human Macrophages and Primary Gingival Epithelial Cells by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*. 2020 Mar 27;9(4):248. doi: 10.3390/pathogens9040248.
23. Raffray L, Giry C, Vandroux D, Kuli B, Randrianjohany A, Pequín AM, et al. Major Neutrophilia Observed in Acute Phase of Human Leptospirosis Is Not Associated with Increased Expression of Granulocyte Cell Activation Markers. *PLoS One*. 2016 Nov 1;11(11):e0165716. doi: 10.1371/journal.pone.0165716.
24. Raeburn CD, Dinarello CA, Zimmerman MA, Calkins CM, Pomerantz BJ, McIntyre RC Jr, et al. Neutralization of IL-18 attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Aug;283(2):H650-7. doi: 10.1152/ajpheart.00043.2002.
25. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5771-7. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.
26. Silva RAB, Sousa-Pereira AP, Lucisano MP, Romualdo PC, Paula-Silva FWG, Consolaro A, et al. Alendronate inhibits osteocyte apoptosis and inflammation via IL-6, inhibiting bone resorption in periapical lesions of ovariectomized rats. *Int Endod J*. 2020 Jan;53(1):84-96. doi: 10.1111/iej.13206.
27. Karlis GD, Schöningh E, Jansen IDC, Schoenmaker T, Hogervorst JMA, van Veen HA, et al. Chronic Exposure of Gingival Fibroblasts to TLR2 or TLR4 Agonist Inhibits Osteoclastogenesis but Does Not Affect Osteogenesis. *Front Immunol*. 2020 Jul 23;11:1693. doi: 10.3389/fimmu.2020.01693.
28. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*. 2007;40(2):97-112. doi: 10.4067/s0716-97602007000200001.
29. Park HJ, Stokes JA, Corr M, Yaksh TL. Toll-like receptor signaling regulates cisplatin-induced mechanical allodynia in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Jan;73(1):25-34. doi: 10.1007/s00280-013-2304-9.
30. Bostanci N, Akgül B, Tsakanika V, Allaker RP, Hughes FJ, McKay IJ. Effects of low-dose doxycycline on cytokine secretion in human monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Cytokine*. 2011 Dec;56(3):656-61. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.039.
31. Hall CL, Wells AR, Leung KP. Pirfenidone reduces profibrotic responses in human dermal myofibroblasts, in vitro. *Lab Invest*. 2018 May;98(5):640-655. doi: 10.1038/s41374-017-0014-3.

FIGURES

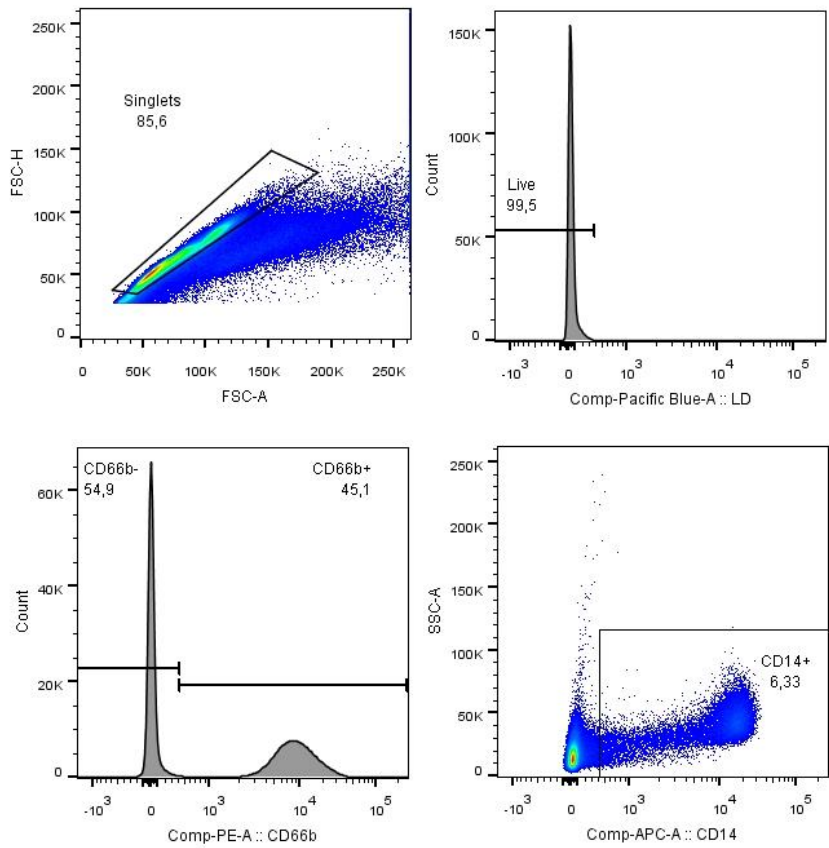


Figure 1 - Representative dot plot graphs showing the strategy of analysis and the selection of phenotypically identified granulocyte (CD66b⁺) and monocyte (CD14⁺)populations.

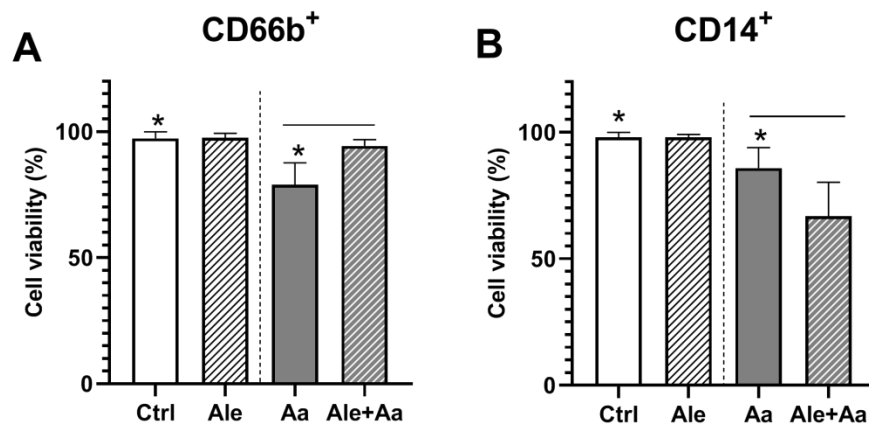


Figure 2 – Granulocyte (CD66b⁺) and monocyte (CD14⁺) viability assessed by Live and Dead method after experimental conditions. Results expressed as percentage of viable cells for Live and Dead method. Data from 10 donors are shown. Ale: sodium alendronate; Aa: *A. actinomycetemcomitans*. Error bars indicate standard deviation.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and the group stimulated with Aa (t test); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated and not treated with Ale (t test).

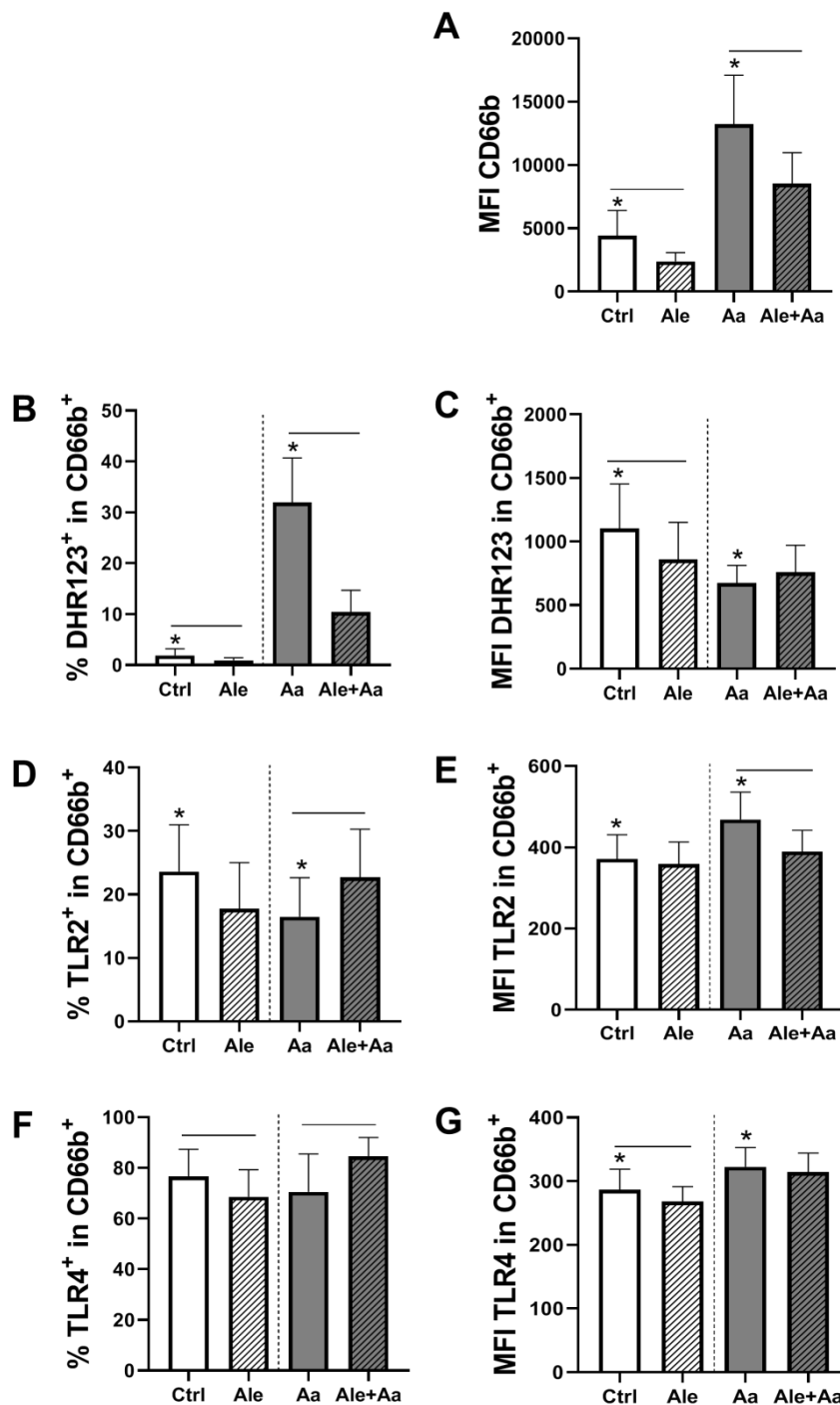


Figure 3 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of CD66b, DHR123, TLR2 and TLR4 in CD66b⁺ granulocytes stimulated or not with *A. actinomycetemcomitans*. Ale: sodium alendronate; Aa: *A. actinomycetemcomitans*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

*represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and cells stimulated with Aa (t test); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated or not treated with Ale (t test).

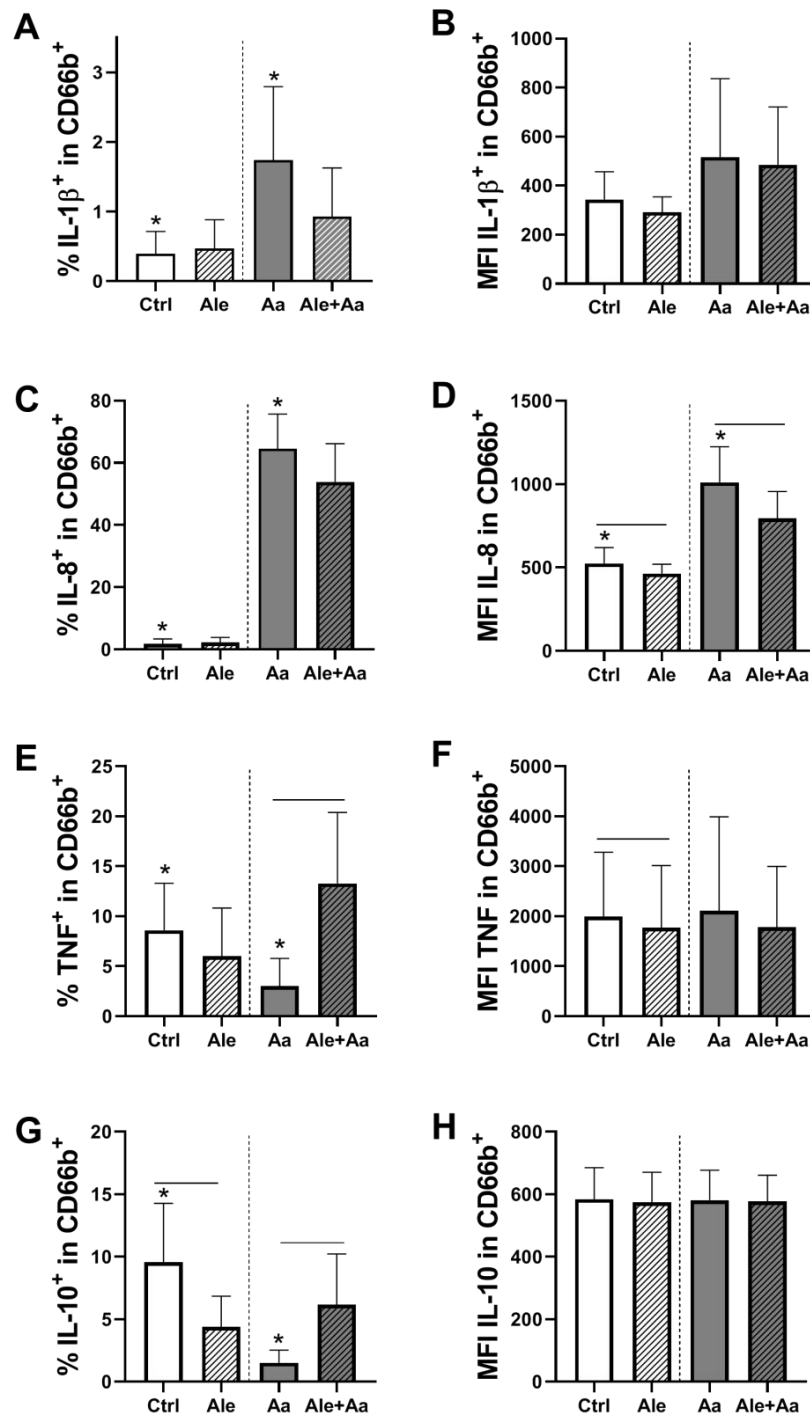


Figure 4 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD66b⁺ granulocytes stimulated or not with *A. actinomycetemcomitans*. Ale: sodium alendronate; Aa: *A. actinomycetemcomitans*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference (p<0.05) between the control group and cells stimulated with Aa (t test); connecting lines represent significant differences (p<0.05) between the groups treated or not treated with Ale (t test).

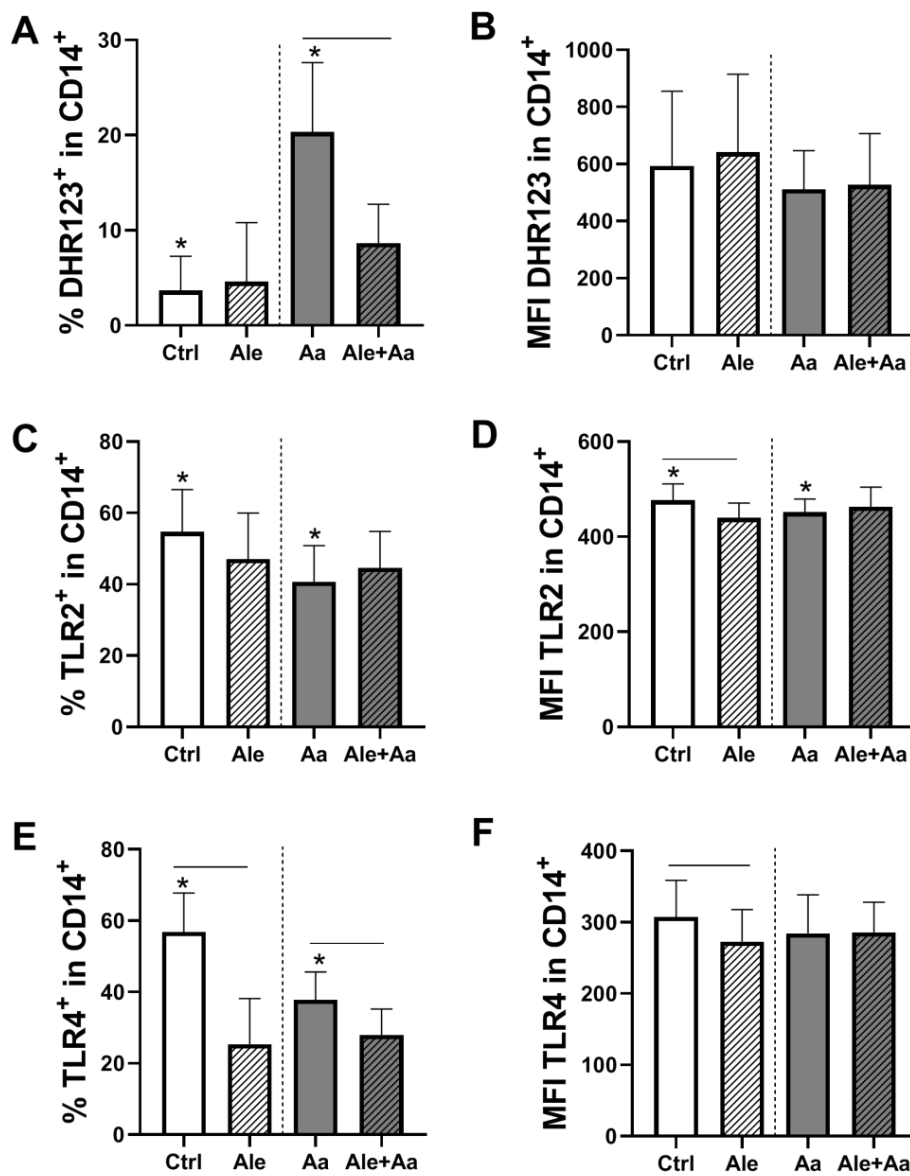


Figure 5 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of DHR123, TLR2 and TLR4 in CD14⁺ monocytes stimulated or not with *A. actinomycetemcomitans*. Ale: sodium alendronate; Aa: *A. actinomycetemcomitans*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference (p < 0.05) between the control group and cells stimulated with Aa (t test); connecting lines represent significant differences (p < 0.05) between the groups treated or not treated with Ale (t test).

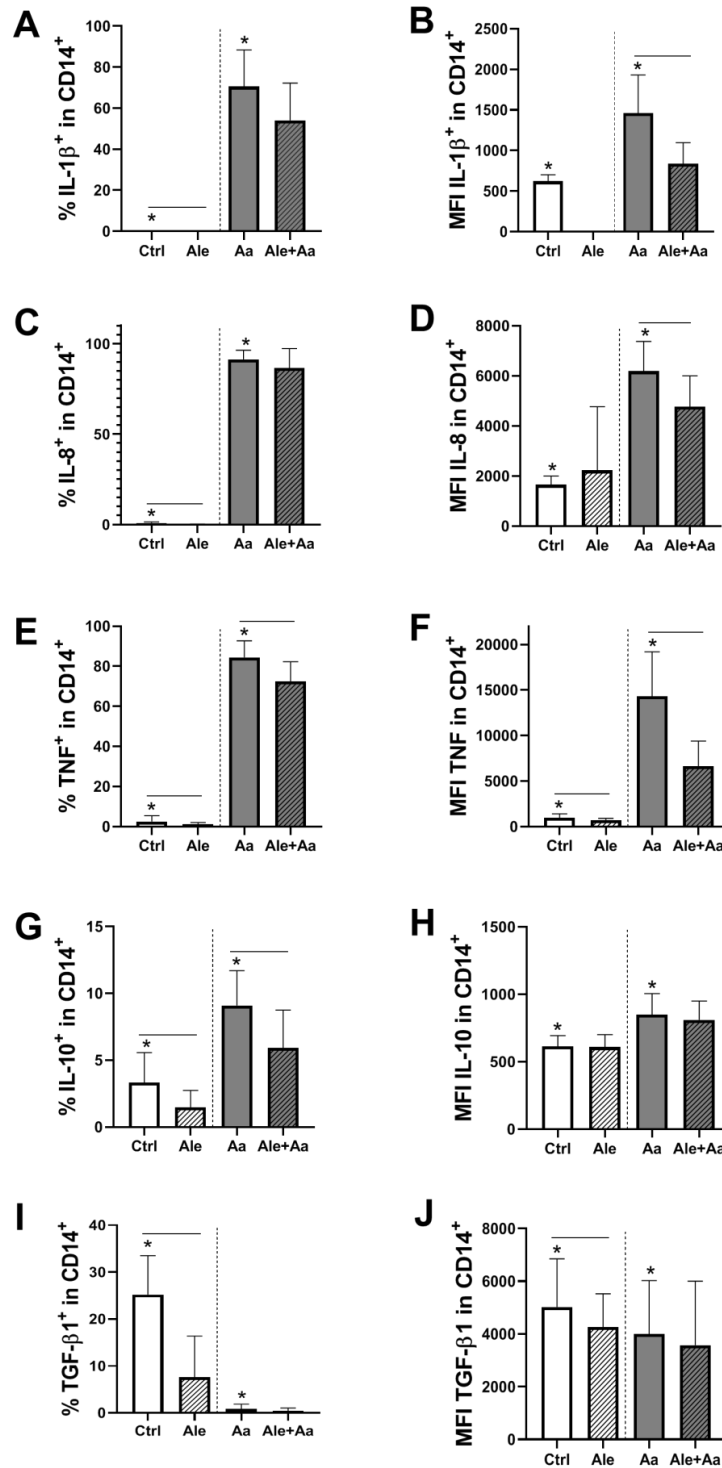


Figure 6 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD14⁺ monocytes stimulated or not with *A. actinomycetemcomitans*. Ale: sodium alendronate; Aa: *A. actinomycetemcomitans*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference (p<0.05) between the control group and cells stimulated with Aa (t test); connecting lines represent significant differences (p<0.05) between the groups treated or not treated with Ale (t test).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o presente estudo *in vitro* não consiga reproduzir todos os componentes presentes no microambiente periodontal, os resultados mostraram efeitos do alendronato de sódio em células que participam ativamente dos processos imunoinflamatórios nos tecidos periodontais.

As tabelas 1 e 2 resumizam os efeitos do alendronato de sódio na expressão dos marcadores avaliados em granulócitos e monócitos, respectivamente. Em ambas as tabelas são apresentados os resultados para células estimuladas ou não com Aa.

Tabela 1: Efeito do alendronato de sódio na expressão dos marcadores por granulócitos humanos estimulados ou não com Aa

	Células não estimuladas com Aa	Células estimuladas com Aa
CD66b	↓ MIF CD66b	↓ MIF CD66b
DHR123	↓ % e MIF DHR123	↓ % DHR123
TLR	↓ % e MIF TLR4	↑ % TLR2 e TLR4 ↓ MIF TLR2
Citocinas	↓ MIF IL-8 ↓ MIF TNF ↓ % IL-10	↓ MIF IL-8 ↑ % TNF ↑ % IL-10

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2: Efeito do alendronato de sódio na expressão dos marcadores por monócitos humanos estimulados ou não com Aa

	Células não estimuladas com Aa	Células estimuladas com Aa
DHR123	-	↓ % DHR123
	↓ MIF TLR2	
TLR	↓ % e MIF TLR4	↓ % TLR4
	↓ % IL-1 β	↓ MIF IL-1 β
	↓ % IL-8	↓ MIF IL-8
Citocinas	↓ % e MIF TNF	↓ % e MIF TNF
	↓ % IL-10	↓ % IL-10
	↓ % e MIF TGF- β 1	

Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados deste estudo mostraram que concentrações elevadas de alendronato de sódio utilizadas de forma tópica como adjuvante no tratamento periodontal afetam significativamente a expressão de diversas moléculas envolvidas no processo imunionflamatório, relacionadas ao combate microbiano e à destruição dos tecidos periodontais. Estudos clínicos e em modelos experimentais são necessários para confirmar os efeitos do alendronato na atividade celular durante o tratamento periodontal.

REFERÊNCIAS

- AKRAM, Z. *et al.* Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.83, n.3, p. 444-454, Mar. 2017.
- ALMUBARAK, A. *et al.* Disruption of Monocyte and Macrophage Homeostasis in Periodontitis. **Frontiers in immunology**, v.11, n.26, p. 330, Feb. 2020.
- ANDO-SUGUIMOTO, E.S. *et al.* Distinct Signaling Pathways Between Human Macrophages and Primary Gingival Epithelial Cells by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Pathogens**, v.9, n.4, p. 248, Mar. 2020.
- ARANCIBIA, S.A. *et al.* Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biological Research**, v.40, n.2, p. 97-112, Nov. 2007.
- ATA-ALI, J. *et al.* Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study. **BMC Oral Health**, v.15, n.1, p. 43, Apr. 2015.
- BELIBASAKIS, G.N. *et al.* Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Pathogens**, v.8, n.4, p. 222, Nov. 2019.
- BLACK, D.M. *et al.* Bisphosphonates and fractures of the subtrochanteric or diaphyseal femur. **New England Journal of Medicine**. v. 362, n. 19, p. 1761-1771, May. 2010.
- BOSTANCI, N. *et al.* Effects of low-dose doxycycline on cytokine secretion in human monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Cytokine**. v.56, n.3, p. 656-661, Dec. 2011.
- CASTRO, L.F. *et al.* Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Química Nova**, v.27, n.3, p. 456-460, jun. 2004.
- CHAPPLE, I.L.; MATTHEWS, J.B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontology 2000**, v.43, p. 160-232. 2007.
- COUPER, K.N.; BLOUNT, D.G.; RILEY, E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **The Journal of Immunology**, v.180, n.9, p. 5771-5777, May 2008.
- DE ALMEIDA, J. *et al.* Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v.86, n.10, p. 1166-1175, Oct.2015.
- DELIMA, A.J.; VAN DYKE, T.E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. **Periodontology 2000**, v.31, p. 55-76. 2003.
- DING, Q.; QUAH, S.Y.; TAN, K.S. Secreted adenosine triphosphate from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers chemokine response. **Molecular Oral Microbiology**, v.31, n.5, p. 423-34, Oct. 2016.

DOLCI, L.S. *et al.* Spray-congealed solid lipid microparticles as a new tool for the controlled release of bisphosphonates from a calcium phosphate bone cement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.12, n.2, p. 6-16, Jan. 2017.

DONG, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. **Nature Reviews Immunology**, v.6, n.4, p. 329-33, Apr. 2006.

DRAKE, M.T.; CLARKE, B.L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v.83, n.9, p. 1032-1045, Sept. 2008.

DUTRA, B.C. *et al.* Effect of 1% sodium alendronate in the non-surgical treatment of periodontal intraosseous defects: a 6-month clinical trial. **Journal of Applied Oral Science**, v.25, n.3, p. 310-317, May 2017.

EKE, P.I. *et al.* Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **Journal of Dental Research**, v.91, n.10, p. 914-920, Oct. 2012.

ENDO, Y. *et al.* Underlying Mechanisms and Therapeutic Strategies for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.40, n.6, p. 739-750, 2017.

ESKAN, M.A. *et al.* The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. **Nature Immunology**, v13, n. 5, p. 465-473, Mar. 2012.

FARIAS, B.C. *et al.* Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p. 909-916, July 2012.

FERRAZ, E.G. *et al.* Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v.59, n.3, July/Sept. 2011.

FINE, N. *et al.* Distinct Oral Neutrophil Subsets Define Health and Periodontal Disease States. **Journal of Dental Research**. v. 95, n. 8, p. 931-938, July. 2016.

FISCHER, K.J. *et al.* Mechanical evaluation of bone samples following alendronate therapy in healthy male dogs. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.76, n.1, p. 143-148, Jan. 2006.

GAJARDO, M. *et al.* Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. **Journal of Periodontology**, v.76, n.2, p.289-94, Feb. 2005.

GARLET, G.P. *et al.* The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. **Microbes and Infection**, v.10, n.5, p. 489-496, Apr. 2008.

GHOLIZADEH, P. *et al.* Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Microbial Pathogenesis**, v.11, n.3, p. 303-311, Dec. 2017.

GIRARD, S. *et al.* Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate. **International Endodontic Journal**, v.38, n.11, p. 810-816, Nov. 2005.

GRAVES, D.T.; LI, J.; COCHRAN, D.L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of Dental Research**, v.90, n.2, p. 143-153, Feb. 2011.

GRAZIANI, F. *et al.* Non surgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? **Periodontology** 2000, v.75, n.1, p. 152-188, Oct. 2017.

GUPTA, J.; GILL, A.S.; SIKRI, P. Evaluation of the relative efficacy of an alloplast used alone and in conjunction with an osteoclast inhibitor in the treatment of human periodontal infrabony defects: a clinical and radiological study. **Indian Journal of Dental Research**, v.22, n.2, p. 225-231, Mar. 2011.

GURSOY, U.K.; MARAKOGLU, I.; OZTOP, A.Y. Relationship between neutrophil functions and severity of periodontitis in obese and type 2 diabetic chronic periodontitis patients. **Quintessence International**; v.39, n.6, p. 485-489, June 2008.

HAJISHENGALLIS, G.; KOROSTOFF, J.M. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontology** 2000, v.75, n.1, p. 116-151, Oct. 2017.

HALL, C.L.; WELLS, A.R.; LEUNG, K.P. Pirfenidone reduces profibrotic responses in human dermal myofibroblasts, in vitro. **Laboratory Investigation**, v.98, n.5, p. 640-655, May 2018.

HERBERT, B.A.; NOVINC, C.M.; KIRKWOOD, K.L. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. **Molecular Oral Microbiology**, v.31, n.3, p. 207-27, Sept. 2016.

HIYOSHI, T. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces detachment and death of human gingival epithelial cells and fibroblasts via elastase release following leukotoxin-dependent neutrophil lysis. **Microbiology and Immunology**, v.63, n.3-4, p. 100-110, Mar. 2019.

HØGLUND, R.A.; MAGHAZACHI, A.A. Multiple sclerosis and the role of immune cells. **World Journal of Experimental Medicine**. v.4, n.3, p. 27-37, Aug. 2014.

IPSHITA, S. *et al.* One percent alendronate and aloe vera gel local host modulating agents in chronic periodontitis patients with class II furcation defects: A randomized, controlled clinical trial. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v.9, n.3, p. 123-134, Aug. 2018.

JANCIAUSKIENE, S.; VIJAYAN, V.; IMMENSCHUH, S. TLR4 Signaling by Heme and the Role of Heme-Binding Blood Proteins. **Frontiers in Immunology**, v.27, n.11, p. 1964, Aug. 2020.

JOHANSSON, A. *et al.* Systemic Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin-Neutralizing Antibodies in Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.88, n.1, p. 122-129, Jan. 2017.

KANORIYA, D. *et al.* Synergistic Approach Using Platelet-Rich Fibrin and 1% Alendronate for Intrabony Defect Treatment in Chronic Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, v.87, n.12, p. 1427-1435, Dec. 2016.

KARLIS, G.D. *et al.* Chronic exposure of gingival fibroblasts to TLR2 or TLR4 agonist inhibits osteoclastogenesis but does not affect osteogenesis. **Frontiers in Immunology**, v.23, n.11, p. 1693, July 2020.

KHOSLA, S. *et al.* Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.22, n.10, p. 1479-1491, Oct. 2007.

KORKMAZ, B. *et al.* Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. **Pharmacological Reviews**, v.62, n.4, p. 726-759, Dec. 2010.

KUIPER, J.W. *et al.* Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.165, n.2, p. 532-539, Jan. 2012.

KURGAN, S. *et al.* Strain-Specific Impact of *Fusobacterium nucleatum* on Neutrophil Function. **Journal of Periodontology**, v.88, n.4, p. 380-389, Apr. 2017.

LAMONT, R.J.; HAJISHENGALLIS, G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.21, n.3, p. 172-183, 2015.

LIMA, H.R. *et al.* The essential role of toll like receptor-4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. **Journal of Clinical Periodontology**, v.37, n.3, p. 248-254, Mar. 2010.

LIU, Y.C. *et al.* Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v.10, n.5, p. 520-529, May 2014.

LIU, Y.J.; LIU, Y.; XU, Y. Developments of neutrophil function and the relationship between neutrophils dysfunction and periodontitis. **Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi**, v.34, n.2, p. 210-214, Apr. 2016.

LUJAN, S.A. *et al.* Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.104, n.30, p. 82-87, July 2007.

MALANDRINO, M.I. *et al.* Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.308, n.9, p. 756-769, May 2015.

MOMBELLI, A. *et al.* Microbiologic Response to Periodontal Therapy and Multivariable Prediction of Clinical Outcome. **Journal of Periodontology**, v.88, n.12, p. 1253-1262, Dec. 2017.

MOREIRA, M.M. *et al.* Ultrastructural and immune histochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. **Microscopy Research and Technique**, v.77, n.11, p. 902-909, Nov. 2014.

NAIFF, P.F. *et al.* Mechanical Periodontal Therapy Recovered the Phagocytic Function of Monocytes in Periodontitis. **International Journal of Dentistry**, v.2020, n.15, p. 863, Feb. 2020.

NICU, E.A.; LOOS, B.G. Polymorphonuclear neutrophils in periodontitis and their possible modulation as a therapeutic approach. **Periodontology 2000**, v.71, n.1, p. 140-163, June 2016.

NORTON, J.T. *et al.* Role of IL-1 receptor-associated kinase-M (IRAK-M) in priming of immune and inflammatory responses by nitrogen bisphosphonates. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.108, n.27, p. 11163-11168, July 2011.

OCHIUZ, L. *et al.* Alendronate-loaded modified drug delivery lipid particles intended for improved oral and topical administration. **Molecules**, v.21, n.7, p. 858, June 2016.

OKINAGA, T.; ARIYOSHI, W.; NISHIHARA, T. Aggregatibacter actinomycetemcomitans invasion induces interleukin-1 β production through reactive oxygen species and cathepsin B. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v.35, n.6, p. 431-440, June 2015.

OVEISI, M. *et al.* Novel assay to characterize neutrophil responses to oral biofilms. **Infection and Immunity**, v.24, p. 82-87, Jan. 2019.

PAPAPANOU, P.N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, v.45, n.20, p. 162-170, 2018.

PARK, H.J. *et al.* Toll-like receptor signaling regulates cisplatin-induced mechanical allodynia in mice. **Cancer Chemother Pharmacology**, v.73, n.1, p. 25-34, Jan. 2014.

PATNTIRAPONG, S.; POOLGESORN, M. Alteration of macrophage viability, differentiation, and function by bisphosphonates. **Oral Diseases**, v.24, n.7, p. 1294-1302, Oct. 2018.

RABIN, S.D.; FLITTON, J.G.; DEMUTH, D.R. Aggregatibacter actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. **Infection and Immunity**, v.77, n.8, p. 3161-3169, Aug. 2009.

RAEBURN, C.D. *et al.* Neutralization of IL-18 attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v.283, n.2, p. 650-657, Aug. 2002.

RAFFRAY, L. *et al.* Major Neutrophilia Observed in Acute Phase of Human Leptospirosis Is Not Associated with Increased Expression of Granulocyte Cell Activation Markers. **PLoS One**, v.11, n.11, p. 716, Nov. 2016.

RODAN, G.A.; RESZKA, A.A. Bisphosphonate mechanism of action. **Current Molecular Medicine**, v.2, n.6, p. 571-577, Sept. 2002.

- RÜCKERL, D.; ALLEN, J.E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. **Immunological Reviews**, v.262, n.1, p. 113-133, Nov. 2014.
- RUSSELL, R.G. Bisphosphonates: from bench to bedside. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.68, n.10, p. 367-401, Apr. 2006.
- SILVA, I.C. Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory functions. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.7, n. único, p. 35-46, 2015.
- SILVA, R.A.B. *et al.* Alendronate inhibits osteocyte apoptosis and inflammation via IL-6, inhibiting bone resorption in periapical lesions of ovariectomized rats. **International Endodontic Journal**, v.53, n.1, p. 84-96, Jan. 2020.
- SMITH, J.L.; BAYLES, D.O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v.32, n.4, p. 227-248, Oct./Dec. 2006.
- STORRER, C.L.M. *et al.* Effect of alendronate on the progression of periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: a study in rats. **Clinical Oral Investigations**, v.20, n.9, p. 2565-2573, Dec. 2016.
- SUPRITH, S.S. *et al.* Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and assessment of leukotoxin in periodontal disease: A clinico-microbiological study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.22, n.3, p. 201-208, May/June 2018.
- VARANAT, M. *et al.* Activation of the TREM-1 pathway in human monocytes by periodontal pathogens and oral commensal bacteria. **Molecular Oral Microbiology**, v.32, n.4, p. 275-287, Aug. 2017.
- ZENG, M.Y. *et al.* The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. **Molecular Oral Microbiology**, v.34, n.2, p. 27-38, Apr. 2019.
- ZENOBIA, C.; HAJISHENGALLIS, G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. **Periodontology 2000**, v.69, n.1, p. 142-159, Oct. 2015.
- ZHU, W. *et al.* Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **The FASEB Journal**, v.33, n.4, p. 5208-5219, Apr. 2019.
- YANG, X. *et al.* Deregulation of T cell response in sepsis. **Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)**, v.19, n.1, p. 1370-1376, June 2014.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de bisfosfonatos na atividade de leucócitos humanos estimulados por periodontopatógenos

Pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61550216.0.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.866.655

Apresentação do Projeto:

Embora os principais alvos farmacológicos dos bisfosfonatos sejam os osteoclastos, com consequente inibição da reabsorção óssea, outras células podem ser afetadas por essas drogas. A utilização de bisfosfonatos pode afetar as respostas biológicas nos tecidos periodontais e periimplantares relacionadas à doença periodontal e periimplantite. Serão coletados 20 mL de sangue de 20 doadores saudáveis (realizada por uma enfermeira). Os leucócitos serão incubados com bisfosfonatos nitrogenados e bisfosfonatos não nitrogenados em diferentes concentrações para se determinar a curva de citotoxicidade.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito de diferentes tipos de bisfosfonatos na expressão de citocinas e moléculas de superfície por leucócitos humanos estimuladas ou não por periodontopatógenos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: É possível que durante a coleta de sangue o indivíduo sinta pequeno desconforto. Posteriormente, é possível que ocorra um hematoma na área, o que é minimizado por meio de compressão com dedo no local.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos indivíduos participantes. Os resultados obtidos e

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.propg@pucminas.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG**



Continuação do Parecer: 1.866.655

analisados em conjunto poderão contribuir para conhecimento sobre os efeitos dos bisfosfonatos nos processos imunoinflamatórios relacionados à doença periodontal e periimplantite.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_818066.pdf	01/11/2016 10:11:09		Aceito
Folha de Rosto	folha_rostoassinada.pdf	01/11/2016 10:09:37	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_bisfosfonatos.doc	30/10/2016 01:16:43	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_bisfosfonatos_CEP.doc	30/10/2016 01:11:34	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 14 de Dezembro de 2016

Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br