

|  |   |
|--|---|
| <p><b>Borse DM 351/2022<br/>Scholaships DM 351/2022</b></p> <p>Vedi scheda del corso e art. 2 del bando.<br/><i>Refer to PhD Sheet and art. 2 of the Call.</i></p> | <p>Selezionare una sola opzione.<br/><i>Select only one option:</i></p> <p>[ ]PA      [ ]PC      [ X ]PNRR      [ ]TDA</p>  |
| <p><b>Borse DM 352/2022<br/>Scholaships DM 352/2022</b></p> <p>Vedi scheda del corso e art. 3 del bando.<br/><i>Refer to PhD Sheet and art. 3 of the Call.</i></p> | <p>Indicare il codice della borsa DM 352/2022 per la quale si intende partecipare.<br/><i>Insert the code of the DM 352/2022 scholarship to apply.</i></p> <p>[PNNR. _____]</p>                                 |
| <p><b>Borse di Ateneo su tema vincolato<br/>Scholarships on specific research topic</b></p> <p>Vedi scheda del corso.<br/><i>Refer to PhD sheet.</i></p>           | <p>Indicare il codice della borsa di ateneo con tema vincolato per la quale si intende partecipare.<br/><i>Insert the code of the University scholarship on specific research topic:</i></p> <p>[BA. _____]</p> |

|   |   |
|---|---|
| <b>Cognome / Surname</b>                          |   |
| <b>Nome / Name</b>                                |   |
| <b>Titolo del progetto / Project title</b>        | Rischio post-estrattivo di osteonecrosi delle ossa mascellari associata a farmaci: studio caso controllo randomizzato split mouth su modello murino |
| <b>Corso di dottorato / PhD</b>                   | Oncologia e Chirurgia Sperimentali  |
| <b>Firma del candidato/ Applicant's signature</b> |   |

## 1 – Sommario/Abstract

L'osteonecrosi delle ossa mascellari (ONJ) associata a farmaci è una reazione avversa farmacocorrelata, caratterizzata dalla progressiva distruzione e necrosi dell'osso mascellare e/o mandibolare di soggetti esposti al trattamento con farmaci per cui sia accertato un aumentato rischio di malattia, in assenza di un pregresso trattamento radiante<sup>1</sup>, con ricadute importanti sulla qualità di vita del paziente.

L'ONJ è correlata all'uso di farmaci anti-riassorbitivi e/o anti-angiogenetici: i primi (e.g. bisfosfonati/BPs e denosumab) sono impiegati nel trattamento di patologie che coinvolgono il sistema scheletrico in pazienti affetti da patologia oncologica, ematologica e osteometabolica, i secondi sono impiegati principalmente nel trattamento di patologie oncologiche<sup>2</sup>.

I BPs, in particolare, inibiscono la capacità di migrazione degli osteoblasti e la guarigione delle ferite della mucosa orale influenzando negativamente la vascolarizzazione e la rigenerazione dei tessuti (i.e. influenze inibitorie sulla proliferazione delle cellule endoteliali e riduzione dei livelli di VEGF).

Sono state sperimentate delle strategie di riduzione del rischio di ONJ, che includono: sospensione dell'anti-riassorbitivo/anti-angiogenetico, terapia antibiotica pre-intervento e procedure chirurgiche mirate<sup>3,4</sup>. In questo contesto, da studi attuali, è stato dimostrato che il geranil-geraniolo (GG), un metabolita nel metabolismo del mevalonato, riduce l'effetto inibitorio sulle cellule endoteliali determinato dai BPs. Si è riscontrato, dopo applicazione di GG, un effetto citoprotettivo e un aumento della capacità migratoria degli osteoblasti e delle cellule coinvolte nella rigenerazione tissutale<sup>5</sup>.

La variabilità dell'ONJ dipende principalmente dai fattori di rischio legati alla patologia primaria dei pazienti, oncologici o osteometabolici. Sebbene non ci siano finora dati conclusivi sui fattori di rischio, quelli attualmente segnalati in letteratura si possono suddividere in: farmacologici (e.g., tipo di molecola, via di somministrazione, dose cumulativa, durata del trattamento); locali (e.g., chirurgia dento-alveolare, implantologia, patologia infiammatoria dento-parodontale o peri-implantare, protesi rimovibili incongrue, condizioni anatomiche) e sistemici (e.g., patologia di base, eventuali terapie di supporto, stile di vita, caratteristiche anagrafiche, patologie concomitanti)<sup>6</sup>.

La terapia medica prevede l'utilizzo di diversi presidi (e.g., antisettici, antibiotico terapie, ossigeno terapia, ozonoterapia e laser terapia) mentre le terapie chirurgiche prevedono l'asportazione dell'osso coinvolto dalla patologia (e.g. osteoplastica di superficie, curettage dento-alveolare, sequestrectomia). In passato si ricorreva a terapie chirurgiche solo per gli stadi avanzati di ONJ mentre recentemente le evidenze hanno dimostrato che le terapie chirurgiche sembrano essere più efficaci anche negli stadi precoci, poiché se la lesione da trattare ha un'area circoscritta, l'intervento sarà meno invasivo e consentirà una maggiore probabilità di successo.

La peculiarità dell'ONJ è la localizzazione quasi esclusiva a livello delle ossa mascellari e la letteratura dimostra che le procedure dentali come le estrazioni dentarie (principalmente di denti con patologia dento-parodontale) sono un importante fattore di rischio per l'insorgenza di ONJ<sup>7</sup>. Sebbene la chirurgia dento-alveolare sia considerata un evento predisponente comune per lo sviluppo di ONJ mancano studi controllati randomizzati (sia su umani sia su animali) per identificare strategie preventive efficaci in individui a rischio di chirurgia dento-alveolare<sup>7</sup>.

Una recente revisione sistematica ha suggerito che il rischio di sviluppare ONJ in pazienti oncologici esposti ad alte dosi di BPs e sottoposti ad estrazione dentaria può essere ridotto attraverso un protocollo chirurgico di alveolectomia/alveoloplastica eseguita al momento dell'estrazione dentaria<sup>8</sup>. Inoltre, studi recenti della letteratura ipotizzano che l'applicazione topica immediata nel sito postestrattivo di GG possa prevenire lo sviluppo di ONJ<sup>9</sup>.

L'obiettivo primario del progetto di dottorato ricerca è quello di indagare se l'alveolectomia/alveoloplastica intraoperatoria e la sutura del sito chirurgico possano ridurre il rischio di sviluppo di ONJ in topi sottoposti a terapia con acido zoledronico (BP) ed estrazione dentaria, rispetto a procedure operatorie standard (i.e., estrazione senza alveolectomia /alveoloplastica e sutura). I topi non sottoposti a somministrazione del farmaco e sottoposti ad estrazioni dentarie saranno utilizzati come controlli. L'obiettivo secondario è quello di indagare se l'ONJ possa verificarsi spontaneamente prima di un'estrazione dentaria (come conseguenza diretta della terapia con acido zoledronico). Un ulteriore obiettivo del progetto di ricerca è quello di valutare se l'applicazione topica immediata nel sito post-estrattivo di GG possa prevenire lo sviluppo di ONJ.

## **2 – Descrizione del progetto/Project**

Il presente studio sarà uno studio caso controllo randomizzato, con:

- un gruppo test (A1) formato da topi a cui verrà somministrato acido zoledronico e sottoposti a estrazione dentaria secondo procedura standard
- un gruppo test (A2) formato da topi a cui verrà somministrato acido zoledronico e sottoposti a estrazione dentaria secondo procedura standard con l'applicazione topica immediata nel sito post-estrattivo di GG (se lo stesso disponibile attraverso Dip. STeBICeF)
- un gruppo test (A3) formato da topi a cui verrà somministrato acido zoledronico, sottoposti a estrazione dentaria, e in seguito ad alveolectomia/alveoloplastica con sutura del sito chirurgico
- un gruppo controllo (B1) formato da topi a cui non verrà somministrato il farmaco sottoposti a estrazione dentaria secondo procedura standard
- un gruppo controllo (B2) formato da topi a cui non verrà somministrato il farmaco sottoposti a estrazione dentaria e ad alveolectomia/alveoloplastica con sutura del sito chirurgico.

Il campione di studio sarà composto da un totale di 60 topi maschi albini di Wistar (24 topi per ciascun gruppo). L'età media dei topi sarà di 80 giorni e il peso medio sarà di 450 g. Il progetto di

ricerca richiede l'approvazione dell'OPBA e verrà esaminato a garanzia del benessere degli animali. Gli animali saranno tenuti nell'unità sperimentale animale dell'Università di Palermo, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STeBiCeF) per l'intero periodo di studio, avendo libero accesso ai mangimi e all'acqua. I topi saranno divisi in 2 gruppi: A e B, rispettivamente BP e placebo.

Gruppo A: a 36 topi (o 24 topi in caso di mancato reperimento di GG) saranno somministrati per via endovenosa acido zoledronico 0,04 mg in soluzione salina (0,2 mg/ml) una volta alla settimana per 5 settimane. Secondo Biasotto et al<sup>10</sup>, questo dosaggio di acido zoledronico replica il dosaggio oncologico negli esseri umani ed è associato allo sviluppo di ONJ dopo l'estrazione dentaria nel 100% dei casi<sup>11</sup>. Due settimane dopo l'ultima dose di BP (alla fine della 7° settimana), i primi molari mandibolari saranno estratti in tutti i topi del gruppo A secondo il protocollo: estrazione dentaria con procedura standard (1° molare destro) ed estrazione dentaria con alveolectomia/alveoloplastica e sutura dei tessuti molli (1° molare sinistro). Saranno prelevati dei campioni di osso alveolare al momento dell'intervento chirurgico che saranno valutati istologicamente al fine di escludere la presenza di ONJ (spontanea e non chirurgicamente indotta).

Gruppo B: a 24 topi saranno somministrati per via endovenosa soluzione salina per 5 settimane. Due settimane dopo l'ultima dose di soluzione salina (alla fine della 7° settimana) i primi molari mandibolari (destra e sinistra) saranno estratti in tutti i topi del gruppo B secondo lo stesso protocollo. Saranno successivamente prelevati dei campioni di tessuto osseo alveolare.

I primi molari mandibolari saranno estratti usando un periotomo, una leva sottile e una pinza chirurgica. Un piccolo campione (2-3 mm) di tessuto osseo alveolare del sito di estrazione sarà prelevato e conservato in una soluzione di formaldeide al 4% per l'analisi istopatologica. L'alveolo del molare destro mandibolare sarà lasciato guarire per seconda intenzione, mentre l'estrazione del molare mandibolare sinistro sarà seguita da alveolectomia/alveoloplastica e sutura. Una fresa chirurgica rotonda in carburo di tungsteno n°8, sotto irrigazione con soluzione salina, sarà utilizzata per rimuovere parte dell'osso buccale e linguale della cavità alveolare e ottenere una guarigione per prima intenzione. Sarà utilizzata successivamente, una sutura 8-0 in Vicryl. Dopo l'intervento chirurgico, tutti i topi saranno valutati su base giornaliera per 8 settimane al fine di monitorare la guarigione e identificare potenziali segni clinici di ONJ. A 8 settimane dall'estrazione, i topi saranno sacrificati. La mandibola sarà rimossa e preparata per la valutazione istologica.

Lo sviluppo di ONJ dopo l'intervento chirurgico sarà valutato clinicamente e istologicamente.

Valutazione macroscopica/clinica: tutti i siti chirurgici saranno clinicamente (visivamente e con sonde dentali) ispezionati e fotografati ogni giorno per 8 settimane dopo l'intervento chirurgico. La valutazione visiva sarà focalizzata sulla guarigione della mucosa/esposizione ossea secondo una tabella di valutazione clinica (Appendice I).

Preparazione del campione osseo ed esame istopatologico (da eseguire previ accordi con l'istopatologia di UNIPA):

L'analisi istologica delle sezioni colorate con ematossilina-eosina sarà eseguita da un istopatologo (microscopia ottica, ingrandimento 40x). Saranno valutati diversi parametri istologici:

- Osteonecrosi o focolai necrotici: almeno 8 e 10 lacune vuote adiacenti nell'osso alveolare<sup>12,13</sup>
- Il grado di rigenerazione ossea alveolare sarà valutato in termini quantitativi<sup>14,15,16</sup>. Questo sarà valutato su una scala di quattro punti in base alla percentuale di osso di nuova formazione: 0 (assente; 0%); 1 (lieve; 1-30%); 2 (moderato; 30-60%); 3 (buono; >60%)
- La risposta infiammatoria sarà valutata sulla base della densità e della distribuzione delle cellule infiammatorie nel campione in<sup>17</sup>: 0 (assente; 0%); 1 (lieve; 1-30%); 2 (moderato; 30-60%); 3 (buono; >60%)

Lo sviluppo spontaneo di ONJ dopo 5 settimane di terapia con BP (o placebo) sarà valutato clinicamente e istologicamente.

Valutazione macroscopica/clinica: i mascellari saranno clinicamente (visivamente e con sonde dentali) ispezionati siti preselezionati per l'estrazione saranno fotografati prima dell'intervento chirurgico.

Preparazione del campione osseo ed esame istopatologico: verrà prelevato un piccolo campione di tessuto osseo alveolare da ciascuna sede chirurgica, conservato secondo le procedure operative standard e preparato per la valutazione istologica. L'analisi istologica delle sezioni colorate con ematossilina-eosina sarà eseguita da un istopatologo (microscopia ottica, ingrandimento 40x). Saranno valutati diversi parametri istologici:

- Osteonecrosi o focolai necrotici: almeno 8 e 10 lacune vuote adiacenti nell'osso alveolare<sup>12,13</sup>
- Il grado di rigenerazione ossea alveolare sarà valutato in termini quantitativi<sup>14,15,16</sup>. Questo sarà valutato su una scala di quattro punti in base alla percentuale di osso di nuova formazione: 0 (assente; 0%); 1 (lieve; 1-30%); 2 (moderato; 30-60%); 3 (buono; >60%)

L'Appendice I rappresenta le tabelle di valutazione clinica e istologica utile per la raccolta dei dati.

Appendice I: Valutazione clinica e istologica

| Caratteristiche cliniche           | Si | No |
|------------------------------------|----|----|
| Osso esposto                       |    |    |
| Copertura completa della mucosa    |    |    |
| Fistola                            |    |    |
| Mobilità dentale (dente adiacente) |    |    |
| Gonfiore osseo                     |    |    |
| Gonfiore della mucosa ed eritema   |    |    |
| Ascesso                            |    |    |
| Osso esposto e mobile (sequestro)  |    |    |

| Caratteristiche istologiche            | Score                | Gruppi   |  |  |  |  |
|--|----------------------|--|--|--|--|--|
|  |                      | Gruppo A<br>(sottoposti a somministrazione di acido zoledronico) |  |  | Gruppo B<br>(non sottoposti a somministrazione di acido zoledronico) |  |
|  |                      | Estrazione dentaria standard Gruppo A1 n° (%)                    | Estrazione dentaria standard con applicazione topica di geranil geraniolo Gruppo A2 n° (%) | Estrazione dentaria con alveolectomia/ alveoloplastica e sutura Gruppo A3 n° (%) | Estrazione dentaria standard Gruppo B1 n° (%)                        | Estrazione dentaria con alveolectomia/ alveoloplastica e sutura Gruppo B2 n° (%) |
| Osteonecrosi o foci osteonecrotici     | Si                   |  |  |  |  |  |
|  | No                   |  |  |  |  |  |
| Rimodellamento osseo alveolare (grado) | 0 (assente; 0%)      |  |  |  |  |  |
|  | 1 (lieve; 1-30%)     |  |  |  |  |  |
|  | 2 (moderato; 30-50%) |  |  |  |  |  |
|  | 3 (buono; >60%)      |  |  |  |  |  |
| Infiltrato Infiammatorio               | 0 (assente; 0%)      |  |  |  |  |  |
|  | 1 (lieve; 1-30%)     |  |  |  |  |  |
|  | 2 (moderato; 30-50%) |  |  |  |  |  |
|  | 3 (buono; >60%)      |  |  |  |  |  |

Sui dati verrà effettuata un'analisi descrittiva. Le variabili quantitative saranno riassunte con medie, mediane, deviazioni standard e range. Le variabili qualitative con distribuzioni di frequenza.

Il progetto di ricerca verrà diviso in 4 Work Packages, integrati funzionalmente e cronologicamente.

**Work Package 1: Coordinamento del progetto e continuo aggiornamento della letteratura**

- WP1/Task1: Coordinamento del progetto attraverso la redazione di diario giornaliero.



zoledronico. Inoltre, si valuterà (qualora reperito il GG) se l'applicazione topica di GG nel sito postestrattivo possa prevenire lo sviluppo di ONJ nei pazienti in trattamento con zoledronato<sup>5</sup>.

Grazie alla solidità scientifica di questo studio e al numero statisticamente significativo di modelli murini su cui verrà eseguita la sperimentazione si valuterà l'efficacia della terapia e di conseguenza si potrebbe standardizzare la tecnica dell'alveolectomia/alveoloplastica e integrarla al trattamento chirurgico dei pazienti in terapia con acido zoledronico nei protocolli nazionali ed internazionali.

La validazione di un protocollo in cui si dimostri l'efficienza dell'associazione della terapia medico-chirurgica con l'alveolectomia/alveoloplastica in seguito ad estrazione dentaria, consentirebbe l'introduzione e la divulgazione di un protocollo gold standard nella prevenzione delle ONJ farmaco relate.

Durante il progetto e alla fine dello stesso si effettuerà la divulgazione dei dati attraverso la pubblicazione di articoli su riviste indicizzate e la presentazione a congressi nazionali ed internazionali dei risultati della ricerca.

### 3 – Bibliografia/References

1. Bedogni A, Campisi G, Fusco, Raccomandazioni clinico-terapeutiche sull'osteonecrosi delle ossa mascellari (ONJ) farmaco-relata e sua prevenzione (2020)
2. Bansal H. Medication-related osteonecrosis of the jaw: An update. *Natl J Maxillofac Surg.* 2022 Jan-Apr;13(1):5-10. doi: 10.4103/njms.NJMS\_236\_20. Epub 2022 Apr 20. PMID: 35911799; PMCID: PMC9326203.
3. Saia G, Blandamura S, Bettini G, Tronchet A, Totola A, Bedogni G, et al: Occurrence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw after surgical tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2010, 68: 797e804
4. Fliefel R, et al: Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44: 568e585, 2015
5. Otto M, Lux C, Schlittenbauer T, Halling F, Ziebart T. Geranyl-geraniol addition affects potency of bisphosphonates-a comparison in vitro promising a therapeutic approach for bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw and oral wound healing. *Oral Maxillofac Surg.* 2022 Jun;26(2):321-332. doi: 10.1007/s10006-021-00982-8. Epub 2021 Aug 15. PMID: 34392434; PMCID: PMC9162996.
6. Soutome S, Otsuru M, Hayashida S, Murata M, Yanamoto S, Sawada S, Kojima Y, Funahara M, Iwai H, Umeda M, Saito T. Relationship between tooth extraction and development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients. *Sci Rep.* 2021 Aug 26;11(1):17226. doi: 10.1038/s41598-021-96480-8. PMID: 34446755; PMCID: PMC8390686.
7. Beth-Tasdogan NH, Mayer B, Hussein H, Zolk O. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Oct 6;10(10):CD012432. doi: 10.1002/14651858.CD012432.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2022 Jul 12;7:CD012432. PMID: 28983908; PMCID: PMC6485859.
8. Gaudin E, Seidel L et al. Occurrence and risk indicators of medication-related osteonecrosis of the jaw after dental extraction: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2015 Oct;42(10):922-32
9. Chin KY, Ekeuku SO, Trias A. The Role of Geranylgeraniol in Managing Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Front Pharmacol.* 2022 May 4;13:878556. doi:10.3389/fphar.2022.878556. PMID: 35600875; PMCID: PMC9114760.
10. Biasotto M et al. A novel animal model to study non spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010 May;39(5):390-6.
11. Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drugdiscovery. *Comp Med.* 2011 Feb;61(1):76-85
12. Basi DL, et al: Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of zoledronic acid-treated rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69: 2698e2707
13. Yamashita J et al: Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1405e1414
14. Pacheco VN, et al. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy—Part II: Assessment of alveolar bone tissue inflammatory response in rats— A blind randomized controlled trial. *Int J Exp Path.* 2018;99:258–263
15. Cankaya AB, Erdem MA, Isler SC, et al. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in an experimental rat model. *Int J Med Sci.* 2011;8:667-672.
16. Sonis S.T., Watkins B.A., Lyng G.D., Lerman M.A., Anderson K.C. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate- related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 2009; 45, 164–172.
17. Taylor T, Bryant C, Popat S. A study of 225 patients on bisphosphonates presenting to the bisphosphonate clinic at King's College Hospital. *Br Dent J.* 2013 Apr;214(7):E18.