

MARIANA MATHEUS MOREIRA

**Efeito do alendronato sódico sobre a atividade clástica na periodontite
experimental em ratos**

São Paulo

2014

MARIANA MATHEUS MOREIRA

**Efeito do alendronato sódico sobre a atividade clástica na periodontite
experimental em ratos**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Biomateriais e Biologia Oral.

Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Moreira, Mariana Matheus.

Efeito do alendronato sódico sobre a atividade clástica na periodontite experimental em ratos / Mariana Matheus Moreira ; orientador Victor Elias Arana-Chavez. -- São Paulo, 2014.

91 p. :20 fig., 3 tab., 2 graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Biomateriais e Biologia Oral. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Periodontite. 2. Osteoclasto. 3. Reabsorção óssea alveolar. 4. Osteonecrose. I. Arana-Chavez, Victor Elias. II. Título.

Moreira MM. Efeito do alendronato sódico sobre a atividade clástica na periodontite experimental em ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a...

*Deus, que me concedeu a vida, me ilumina e me guia em todos os meus passos,
obrigada por me guiar pelos caminhos certos durante todo trabalho,*

*Meus pais, Denise e Luiz, que nunca mediram esforços para que todos os meus
sonhos se realizassem*

Ao meu querido Alberto, que esteve ao meu, com muita paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Prof. Victor Elias Arana-Chavez, primeiramente por acreditar na minha capacidade, pela orientação, amizade e exemplo profissional. Obrigada por me apresentar e me deixar fazer parte do seu trabalho, que contagia e inspira.

A Professora Ruth, que me forneceu ferramentas para exercer a profissão de cirurgiã dentista e me deu a oportunidade de conhecer o ambiente acadêmico. Sem a sua ajuda, não poderia dar esse importante passo na minha formação.

À Vivian Bradaschia Corrêa, minha amiga e co-orientadora, que desde o início não mediu esforços para me ajudar, foi paciente, me ensinou, inspirou, além de ter se tornado uma grande amiga.

Agradeço a Universidade de São Paulo, que possibilitou a realização desse trabalho. A entrada para essa universidade agregou muito em meus conhecimentos e carreira profissional.

À CAPES, pelo auxílio financeiro, o qual foi muito importante para o desenvolvimento desse trabalho.

À todos os professores do departamento de Biologia Oral e Biomateriais pelos ensinamentos na área de materiais dentários. E a todos os funcionários, ao Douglas, técnico de laboratório de Bioquímica, Elis, técnica do laboratório de Biologia Oral, Antonio, técnico de Materiais e as secretárias Edeleine, Elidamar e Rosa.

As grandes amigas que fiz no laboratório de Biologia Oral, Lorraine, Luana, Natasha que ajudaram, apoiaram, em todos os momentos difíceis, e fizeram com que esses se tornassem mais fáceis e divertidos.

À minha colega Érika de Paula, por todas aflições, e alegrias divididas desde o início.

Aos meus colegas de pós-graduação, Giovanna de Castro, Cláudia Pires, Cíntia Yuki, Bernar Benites, Juliana Castro, Gabriela Magliano, Filipi Pereira, Érik de Lima, Pedro Albuquerque, Alexander Nishida, Lucas Hian, Suzana Slazar, Ana Carolina Romero, Ana Carolina Freitas, Flávia Ibuki, Ricardo Sgura, Simone Peixe, Marcelo Sirolli, Ranulfo Miranda.

À todos os meus amigos, especialmente, Marina, Amanda, Anna Luiza, Cami, Dani, Nati, que fazem parte da minha a vida, a muitos anos, e se tornam cada vez mais especiais. Obrigada por estarem presentes em mais uma conquista.

Aos meus amigos, Luis e Vanessa, que sempre me apoiaram e foram muito compreensivos nos momentos mais difíceis.

Aos meus sogros, e cunhada pelo apoio, torcida e compreensão, durante esses dois anos.

Aos meus avós, Roberto, Ignês, Iracema e Leonildo. Obrigada, por estarem sempre ao meu lado, por cuidarem tanto de mim, me dedicarem tanto amor. Essa conquista se torna ainda mias especial, por ter tido vocês ao meu lado.

À minha irmã, Juliana Moreira, com quem eu sempre pude dividir tudo na minha vida, gostaria de dividir mais um momento tão especial.

Ao meu querido namorado Alberto, que foi um porto seguro durante esses dois anos, sempre paciente, prestativo, dedicando muito amor, carinho, compreensão e respeito. Muito obrigada pelos finais de semana de companhia, durante experimentos. Eu te amo!

E finalmente, mas não menos importante os meus pais, Luiz e Denise, que não sei como agradecer tanta dedicação, amor, carinho, paciência, incentivo e o mais importante, o grande exemplo que sempre foram para mim. Obrigada por tudo!

"A persistência é o caminho do êxito"

Charles Chaplin

RESUMO

Moreira MM. Efeito do alendronato sódico sobre a atividade clástica na periodontite experimental em ratos [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Original.

A periodontite é uma doença de natureza multifatorial e infecciosa, que resulta na inflamação e perda dos tecidos de suporte dos dentes. Essa inflamação é causada por bactérias associadas ao biofilme, causando a perda progressiva de inserção. Os bisfosfonatos são fármacos com capacidade de inibir a reabsorção óssea, atuando nas células clásticas. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do alendronato, um bisfosfonato nitrogenado com grande potência antireabsorptiva, na evolução da doença periodontal induzida em ratos, bem como a possível presença de necrose óssea no processo alveolar. Foram utilizados 48 ratos Wistar albinos, do sexo masculino, com 3 meses de vida e peso médio de 250g. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Alendronato (ALN) e Controle (CON). A periodontite foi induzida com a inserção de um fio de seda 4.0 no sulco gengival do segundo molar superior. Os ratos do grupo ALN, receberam doses diárias de 2,5 mg/kg durante 7 dias antes e 7, 14, 21 e 30 dias após a indução da doença; o grupo CON recebeu solução salina estéril. Nos tempos citados as maxilas foram fixadas, descalcificadas e incluídas em parafina ou resina Spurr. Os cortes foram corados com HE, para análise morfológica, e histomorfométrica. Alguns cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de RANKL e OPG. Foi utilizado o método TRAP, marcador de osteoclastos e microscopia eletrônica de transmissão para análise ultraestrutural. O ALN inibiu a reabsorção da crista alveolar de todos os grupos tratados. As células clásticas apresentaram-se em estado latente. No grupo controle a crista alveolar foi reabsorvida e o TRAP revelou clastos ativos, achados confirmados pela microscopia eletrônica de transmissão. A expressão de RANKL, molécula ativadora da célula clástica, não foi inibida pela droga. A expressão de OPG foi aumentada nos animais tratados. Os animais do grupo tratado durante 21 e

30 dias, apresentaram sinais de osteonecrose na crista alveolar, como lacunas de osteócitos vazias e regiões exposta de osso. Os resultados demonstraram que o uso de alendronato durante a doença periodontal inibe a reabsorção óssea e que durante tempos prolongados pode gerar osteonecrose na região da crista óssea.

Palavras-chave: Alendronato. Bisfosfonatos. Periodontite. Osteoclastos.
Reabsorção. Osteonecrose.

ABSTRACT

Moreira MM Effect of alendronate on the clastic activity in induced periodontitis in rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. .
Versão Original.

Periodontitis is an infectious disease of multifactor nature that results in the inflammation of the tissues supporting the teeth. This inflammation is caused by accumulation of biofilm and causes progressive insertion and bone loss. The bisphosphonates are drugs with the capability to inhibit the activity of clastic cells. The aim of this study was to investigate the effects of alendronate, a nitrogenated bisphosphonate with high antiresorptive power on experimental periodontal disease, and to analyze the possible presence of osteonecrosis in the rat alveolar process. Forty-eight male Wistar rats, three months old, with 250g weight were used. The animals were randomly divided into two groups: Alendronate (ALN) and Control (CON). The periodontitis was induced with a 4.0 silk wire inserted into the gingival sulcus around the right upper second molar. The ALN rats, received daily doses of 2.5 mg/kg alendronate (ALN) for 7 days before the induction of periodontitis; the treatment continued for additional 7, 14, 21 or 30 days. The CON rats, received sterile saline solution. In the time points cited, the maxillae were fixed, decalcified and embedded in Spurr resin or paraffin. The specimens were morphologically analyzed in HE stained sections, after which histomorphometry was carried out. Some stained sections were used for immunolabeling for RANKL and OPG. The osteoclasts were marker by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) histochemistry. The ultrathin sections were examined in a transmission electron microscope. ALN reduced the activity of osteoclasts and significantly decreased the resorption of the alveolar crest. In the control group the alveolar crest appeared resorbed, while TRAP showed active osteoclasts, findings confirmed by transmission electron microscopy. The expression of RANKL, an osteoclast-activating molecule, was not inhibited by the drug. The expression of OPG was increased in the treated animals. The animals of the group treated for 21 and 30 days showed signs of osteonecrosis of the alveolar crest, as empty osteocyte lacunae in the exposed bone regions. The results showed that the

use of ALN for periodontal disease inhibited bone resorption; when it was administered for prolonged periods it can cause osteonecrosis in the bone crest area.

Keywords: Alendronate. Bisphosphonate. Periodontitis. Osteoclast.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALN	alendronato de sódio
ALN-L	alendronato de sódio com ligadura.
ALN	NLux alendronato de sódio sem ligadura.
CEUA/ICB	Comitê de Ética em Pesquisas com Animais de Experimentação
CON	controle
CON-	controle com ligadura
DAB	sigla em inglês para 3.3' <i>diaminobenzidine</i>
PBS	sigla em inglês para <i>phosphate buffered saline</i>
TRAP	sigla em inglês para <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>
°C	graus Celsius
BSP	sigla em inglês para <i>bone sialoprotein</i>
Ca ⁺	íons de cálcio
CO ₂	formula química do dióxido de carbono
MMP	sigla em inglês para <i>matrix metalloproteinase</i>
N-BPs	Bisfosfonatos contendo nitrogênio na composição
OMRB	Osteonecrose dos ossos maxilares relacionado a bisfosfonatos
OPG	do inglês <i>osteoprotegerin</i>
pH	potencial hidrogeniônico
RANK	sigla em inglês para <i>receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$</i>
RANKL	sigla em inglês para <i>receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ ligand</i>
M-CFS	fator estimulador de colônia de macrófagos
LPS	Lipopolissacarídeos
RER	Retículo endoplasmático rugoso

LISTA DE SÍMBOLOS

%	sinal matemático de porcentagem
mg	miligrama
ml	mililitro
g	grama
kg	quilograma
μl	microlitro
μm	micrômetros
M	molar
nm	nanômetros
mM	milimolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Periodonto	19
2.1.1 Periodonto de Proteção	19
2.1.2 Periodonto de Sustentação	20
2.1.2.1 Osteoblastos	23
2.1.2.2 Osteócito	24
2.1.2.3 Osteoclastos.....	25
2.2 Reabsorção óssea	25
2.3 Periodontite	27
2.4 Bisfosfonatos	28
2.5 Bisfosfonatos e incidência de OMRB	30
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais	34
4.2 Grupos experimentais	35
4.2.1 Grupo Controle (CON).....	35
4.2.2 Grupo tratado com alendronato sódico (ALN)	36
4.3 Administração do alendronato sódico	37
4.4 Indução da doença periodontal	38
4.5 Obtenção dos espécimes e fixação	39
4.6 Processamento dos espécimes	39
4.7 Microscopia de luz	40
4.8 Mensuração do nível da crista do processo alveolar	41
4.9 Análise estatística	41
4.10 Histoquímica para evidenciação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)	42
4.11 Imuno-histoquímica para as proteínas RANKL e OPG	43
4.12 Microscopia eletrônica de transmissão	44

5 RESULTADOS	45
5.1 Análise histológica e histoquímica TRAP	47
5.1.1 Grupo CON-L-7	47
5.1.2 Grupo ALN-L-7	48
5.1.3 Grupo CON-L-14	51
5.1.4 Grupo ALN-L-14	53
5.1.5 Grupo CON-L-21	54
5.1.6 Grupo ALN-L-21	56
5.1.7 Grupo CON-L-30	57
5.1.8 Grupo ALN-L-30	59
5.2 Análise histomorfométrica	61
5.2.1 Análise do nível da crista alveolar mesial.....	61
5.2.2 Análise do nível da crista alveolar	62
5.3 Imuno-histoquímica para RANKL e OPG	64
5.4 Análise Ultraestrutural	71
5.4.1 Grupo CON-L	71
5.4.2 Grupo ALN-L	72
5.4.3 CON-SL e ALN-SL	72
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de natureza multifatorial e infecciosa, que resulta na inflamação e perda dos tecidos de suporte dos dentes. Essa inflamação é causada por bactérias associadas ao biofilme, causando a perda progressiva de inserção. A formação de bolsas periodontais e recessão da gengiva ocorrem não só pelo efeito destrutivo das bactérias, mas também pela resposta imunológica dos hospedeiros. A formação de bolsa periodontal é resultante da reabsorção do osso alveolar devido à presença dos agentes infecciosos supracitados, além da degradação das fibras do ligamento periodontal. Esta condição tem maior incidência em indivíduos de idade avançada do que em jovens (Lindhe et al., 2010 Kalsi et al., 2011).

As células responsáveis pela reabsorção do osso alveolar e demais tecidos mineralizados são as células clásticas, que no tecido ósseo são chamadas de osteoclastos. Essas células se formam quando precursores mononucleares são atraídos para uma superfície mineralizada, se fundem e aderem sobre ela, exercendo assim sua atividade de reabsorção. Essas células podem estar presentes em fase latente ou ativa, ocorrendo ambas de forma fisiológica ou patológica. O principal sistema regulador da osteoclastogênese é o RANK/RANKL/OPG. O RANK (*receptor activator of NFκB*) está presente na membrana plasmática de células precursoras e também de osteoclastos diferenciados. Este receptor sinaliza a proliferação e fusão de precursores e ativa a função reabsortiva dos osteoclastos, o que é dependente do acoplamento de seu ligante, o RANKL (*receptor activator of NFκB ligand*). O RANKL é expresso na membrana ou secretado por células indiferenciadas, células de revestimento ósseo e osteoblastos. A OPG (osteoprotegerina) é também produzida por células indiferenciadas e osteoblastos e considerada outro receptor do RANKL. Quando a OPG se liga ao RANKL, impede a fusão e ativação dos osteoclastos (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

Os precursores das células clásticas, oriundos da linhagem monocítica e presentes na corrente sanguínea, respondem a moléculas sinalizadoras durante a periodontite e migram para o local. O RANKL, que estimula a reabsorção óssea, e a OPG, que bloqueia sua ação, formam um sistema bi-molecular que está envolvido

na reabsorção do osso alveolar que ocorre na periodontite. Durante a progressão da doença, ocorre liberação de citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores, que contribuem para a degradação óssea e destruição das fibras colágenas do ligamento periodontal (Wara-aswapat et al., 2007).

Um dos principais objetivos das terapias periodontais é eliminar os fatores determinantes desta patologia, de modo que os tecidos possam restabelecer as condições de saúde. Inúmeras estratégias para a regeneração periodontal têm sido buscadas, ainda sem completo sucesso. Além das terapias convencionais, alguns autores têm estudado terapias coadjuvantes como o uso de bisfosfonatos durante a doença (Duarte et al., 2004).

Os bisfosfonatos, fármacos com reconhecida capacidade de inibição da reabsorção óssea por osteoclastos, mostraram grande potencial como inibidores da perda óssea alveolar. Os bisfosfonatos são análogos ao pirofosfato endógeno, que é regulador fisiológico de calcificação. Estes fármacos se ligam à hidroxiapatita da superfície óssea e, uma vez internalizados pelos osteoclastos ao degradarem a matriz óssea, causam um efeito inibitório nessas células (Russell, 2011). O mecanismo inibitório sobre estas células ainda não foi totalmente elucidado. O mecanismo de ação dos diferentes tipos de bisfosfonatos e a potência antireabsortiva estão vinculados à composição de suas cadeias laterais; estes podem apresentar radical hidroxila na sua composição ou átomo de cloro. Os bisfosfonatos podem ser nitrogenados e não nitrogenados: Os chamados não-nitrogenados, como o etidronato e o clodronato apresentam baixa potencia antireabsortiva; já os nitrogenados como o pamidronato e o alendronato, apresentam grande aumento na potência antireabsortiva, por possuírem átomo de nitrogênio em sua molécula (Russell, 2011).

Estes fármacos são utilizados no tratamento de doenças como a doença de Paget e especialmente a osteoporose, patologia que irá aumentar substancialmente nas próximas décadas, devido ao envelhecimento da população a nível mundial (Brewer et al., 2011). Atualmente o bisfosfonato mais utilizado para a prevenção e tratamento da osteoporose é o alendronato sódico. Este fármaco tem despertado, cada vez mais, o interesse de profissionais da odontologia, devido aos numerosos relatos de complicações pós operatórias, tais como osteomielites, osteonecrose,

alterações no processo de osseointegração de implantes, na movimentação ortodôntica e no atendimento a pacientes idosos, uma vez que este é indicado a pacientes de idade avançada, na qual a incidência de doença periodontal é elevada. Os efeitos da droga sobre essa doença têm sido recentemente estudados tanto com abordagem terapêutica, na tentativa de modular a perda óssea alveolar, como para avaliar os potenciais riscos que o fármaco apresentaria se administrado nesta situação clínica (Samantaria, et al., 2010, Gupta et al., 2011).

Diante das evidências presentes na literatura, dos estudos relacionados ao emprego de bisfosfonatos favoráveis e desfavoráveis em casos de periodontite, ainda faz-se necessária uma análise detalhada do efeito destes fármacos no curso da periodontite induzida, especialmente dos aspectos estruturais e ultra-estruturais, bem como da presença de moléculas sinalizadoras da osteoclastogênese. Para tanto, será utilizado um modelo animal no qual será induzida a periodontite no segundo molar de ratos tratados e não tratados com alendronato e avaliados o grau de perda óssea, a ultra-estrutura e a imunomarcagem de RANKL e OPG nas estruturas periodontais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Periodonto

O periodonto é constituído pelas seguintes estruturas: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. Tais tecidos são divididos em dois grupos, de acordo com suas funções, periodonto de proteção ou marginal e periodonto de inserção ou sustentação.

2.1.1 Periodonto de Proteção

O periodonto de proteção é constituído pela gengiva e compreende três porções: gengiva marginal, gengiva inserida e gengiva papilar. Reveste a porção cervical dos dentes, recobre o processo alveolar e está presente nos espaços interdentários. A gengiva tem função protetora, e importante papel na resposta imunológica. Consiste em uma camada epitelial e um tecido conjuntivo subjacente, denominado lâmina própria (Lindhe et al., 2010, Katchburian; Arana-Chavez, 2012). A lâmina própria sinaliza funções importantes para progressão e sustentação normal do epitélio gengival. As principais células que a constituem são os fibroblastos, além de linfócitos, macrófagos, mastócitos e plasmócitos (Oliveira et al., 2005).

A gengiva marginal ou gengiva livre como também é denominada, contorna o colo do dente, com cerca de 0,5 a 2 milímetros de altura. É constituída por duas vertentes, a vertente externa chamada de sulco gengival e a interna chamada de epitélio juncional (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

O sulco gengival é uma pequena invaginação entre o dente e a gengiva, sendo o local onde se insere a sonda periodontal em direção a junção cemento-esmalte, durante exames periodontais. O epitélio juncional estabelece íntimo contato com a superfície dentária, formando a aderência epitelial, adesão entre suas células

e superfície dentária. Embora em dentes sadios a gengiva esteja em contato íntimo com a superfície do esmalte, em alguns casos essa adesão pode ocorrer com cimento ou até com materiais restauradores. É composto por dois estratos: estrato basal e o estrato suprabasal. O estrato basal é composto de células cúbicas que são responsáveis pela proliferação desse epitélio, que sofre renovação em períodos de quatro a seis dias. Já o estrato suprabasal é composto por células achatadas que ficam dispostas seguindo o longo eixo do dente. Essas células são ligadas por poucos desmosomas, permitindo a passagem de líquido tissular e de células inflamatórias da lâmina própria para o sulco gengival, formando assim um fluido sulcular ou crevicular. O inverso também ocorre com a passagem de bactérias e toxinas do meio bucal para a lâmina própria (Katchburian; Arana-Chavez, 2012). Essas passagens de substâncias entre os meios, como a passagem de interleucinas, atuam como fator de proteção do periodonto contra invasões bacterianas, como a que ocorre na gengivite e periodontite.

2.1.2 Periodonto de Sustentação

O periodonto de sustentação tem a função de ancoragem do dente no alvéolo. É composto por três elementos; cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, esses possuem características e desempenham papéis diferentes diante de uma mesma função (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

O cimento recobre a parte externa da dentina radicular, tem a principal função de inserção das fibras do ligamento periodontal com a raiz do dente. É um tecido conjuntivo mineralizado, depositado sobre a raiz, com forte adesão, podendo ser confundido como estrutura dentária (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

A composição do cimento é muito semelhante com a do tecido ósseo, possui aproximadamente 60% de mineral, a matriz orgânica é constituída em 90% de colágeno do tipo I, e por proteínas não colágenas como osteopontina, sialoproteína óssea entre outras. As células do cimento, cementoblastos e cementócitos, também são muito semelhantes às do tecido ósseo. A grande diferença entre esses tecidos é

que o cemento é um tecido avascular, e recebe nutrição por difusão do ligamento periodontal (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Existem dois tipos de cemento, o cemento acelular, que é encontrado no terço cervical de todos os dentes, cuja principal função é inserir as fibras do ligamento periodontal (fibras extrínsecas), que nessa região são chamadas de fibras de Sharpey, e o cemento celular, que contém lacunas com cementócitos, e seus prolongamentos e que pode ser composto de fibras mistas ou de fibras intrínsecas. A partir do terço médio da raiz e nas regiões de furca está presente o cemento celular de fibras mistas. As fibras de Sharpey no cemento celular não são completamente mineralizadas. O cemento celular de fibras intrínsecas se forma após o desenvolvimento de todos os tecidos periodontais, por isso é constituído por matriz liberada apenas pelos cementoblastos; é formado em casos de reparação (Nanci; Bosshardt, 2006, Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

O cemento não sofre remodelação constantemente, diferente do osso, por isso células clásticas não são geralmente vistas nessa região, porém, sob estímulo como movimentação ortodôntica, esse tecido pode ser reabsorvido (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

O ligamento periodontal localiza-se entre o cemento e osso alveolar, tem a função de articulação entre o dente e seu alvéolo e de absorver pressões mastigatórias. É um tecido conjuntivo não mineralizado, e sua espessura varia de acordo com a região e idade do indivíduo (Katchburian; Arana-Chavez, 2012). As principais células do ligamento periodontal são os fibroblastos, que se dispõem paralelos ao longo eixo das fibras; também há células mesenquimais indiferenciadas, restos epiteliais de Malassez, osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos, monócitos e macrófagos (Nanci; Bosshardt, 2006).

Os fibroblastos apresentam forma alongada e fusiforme. Por estarem envolvidos na formação e destruição das fibras colágenas apresenta características específicas como vacúolos citoplasmáticos, contendo fragmentos de fibrilas colágenas e enzimas hidrolíticas (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

As células indiferenciadas são células ectomesenquimais que permitem a diferenciação em novas células de natureza conjuntiva quando necessário. Sugere-

se que essas células continuem como precursores dos fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos quando o dente já está formado (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Os restos epiteliais de Malassez são remanescentes da bainha epitelial de Hertwig, que participa do desenvolvimento radicular. Esses remanescentes formam aglomerados de células unidas por desmossomos. Em 2005, Cerri e Katchburian comparam regiões do periodonto de ratos jovens com ratos adultos para avaliar a ocorrência de morte celular programada (apoptose) dessas células. Os autores concluíram que essas células sofrem apoptose tanto no periodonto em desenvolvimento quanto no periodonto de ratos adultos. Os restos epiteliais de Malassez podem ser ativados em processos inflamatórios no periodonto, podendo aumentar a proliferação e formarem cistos (Lindhe et al., 2010).

A parte fibrilar do ligamento periodontal tem como componente básico o colágeno tipo I. Fibrilas colágenas com 50 a 70 nm de diâmetro podem estar isoladas ou agrupadas, formando assim as fibras com 0,2 a 0,3 μm , ou, ainda, feixes, quando as fibras encontram-se agrupadas. As fibras principais são os componentes mais característicos do ligamento periodontal e são nomeadas de acordo com sua disposição. Assim, são separadas em cinco grupos; fibras da crista alveolar, fibras horizontais, fibras oblíquas, fibras apicais e fibras inter-radiculares (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Existem ainda as fibras secundárias, as quais, além de não se entrelaçarem, não apresentam orientação regular. São encontradas geralmente entre os elementos vasculares e nervosos. Outras fibras são as oxitalânicas, que são constituídas por fibrilas com 25nm de espessura que se distribuem entre as fibras colágenas e são encontradas adjacentes aos vasos sanguíneos (Nanci; Bosshardt, 2006; Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado, com estrutura rígida, que compõe a estrutura esquelética dos indivíduos. É um tecido de sofre remodelação ao longo de toda a vida.

O osso alveolar é parte dos maxilares (maxila e mandíbula) e constitui, juntamente com o cemento e ligamento periodontal, o sistema de ancoragem do dente no alvéolo. A estrutura básica do osso alveolar é semelhante à de todo tecido

ósseo do esqueleto; a diferença principal está na existência de inúmeros feixes de fibras colágenas inseridas, chamadas fibras de Sharpey, que lhe conferem aspecto fasciculado (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

A matriz extracelular do osso é composta por 85% de colágeno do tipo I, 5% de colágeno do tipo III e V, e 10% de moléculas não colágenas como osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina, osteocalcina, entre outras. As células que participam da formação, degradação, e estrutura do tecido ósseo, são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

2.1.2.1 Osteoblastos

Os osteoblastos derivam de células mesenquimais indiferenciadas, que se proliferam e respondem a complexos sistemas de sinalização. Quando os osteoblastos iniciam a sua diferenciação, formam grupos. Essas células são sintetizadoras e secretoras de matriz óssea, por isso possuem um citoplasma repleto de organelas de síntese e secreção, cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi e grânulos de secreção. Esses grânulos são direcionados para o lado em que a células está secretando, em direção a matriz óssea, o que caracteriza essas células como polarizadas. Quando em atividade essas células apresentam formato ovóide, globosas, com núcleo deslocado para lateral. Quando não estão em atividade, são reduzidas e chamadas de células de revestimento, podendo a qualquer momento tornarem à atividade de secreção novamente. Tais células também apresentam RANKL e OPG em suas membranas, que influenciam na atividade das células clásticas, ativando e inibindo respectivamente sua ação (Katchburian; Arana-Chavez, 2012; Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2012).

2.1.2.2 Osteócitos

Durante o período de secreção de matriz óssea, alguns osteoblastos ficam aprisionados no interior dessa matriz. Essas células são chamadas de osteócitos, ficam contidas em lacunas e se conectam por prolongamentos que possibilitam a difusão de nutrientes e outras substâncias. Entre o tecido mineralizado e o corpo celular existe uma camada orgânica não calcificada, denominada osteóide, que está presente também entre osteoblastos e matriz óssea.

Apesar dos osteócitos apresentarem característica como citoplasma com poucas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e sáculos de complexo de Golgi, sua atividade é indispensável para manutenção da homeostase óssea (Katchburian; Arana-Chavez, 2012), tornando-se assim um importante sinal de vitalidade do tecido ósseo. Por essa razão, a presença de grande número de lacunas de osteócitos vazias representa sinais de osteonecrose (Yamamoto-Silva et al., 2013).

Estudos afirmam que a atividade dessa célula não só é importante para a homeostase óssea como também sua função fisiológica inibindo a reabsorção desse tecido (Gu et al., 2005). Segundo Lotze e Tracey (2005) a necrose leva a ruptura da membrana citoplasmática e a maior parte do conteúdo intracelular é liberado no ambiente extracelular. Esse líquido engloba moléculas imunoestimulantes, que induzem a reabsorção óssea.

2.1.2.3 Osteoclastos

As células clásticas são responsáveis por reabsorver os tecidos mineralizados. Recebem sua denominação de acordo com o tecido a ser reabsorvido. No caso de reabsorção óssea são denominadas osteoclastos.

Essas células derivam de células precursoras mononucleares, que são derivadas de células da medula óssea. Esses precursores são atraídos para centros mineralizados, que ao se fundirem, formam células gigantes, de tamanhos variados, multinucleadas contendo entre três e 50 núcleos. (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009). Esse recrutamento depende dos osteoblastos, células de revestimento, células do estroma da medula óssea, e as células hematopoiéticas. As células hematopoiéticas liberam interleucina-3 e o fator estimulante de colônias da linhagem monocítica (M-CFS), assim os precursores de clastos respondem formando as células clásticas. Quando ativada, o citoesqueleto dessa células se reorganiza, estabelecendo a polarização da células, onde podossomos se aderem a matriz mineralizada (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2012).

Essas células apresentam um citoplasma com muitas mitocôndrias, vacúolos e vesículas. É dividida em duas estruturas típicas: a borda em escova e a zona clara. A borda em escova apresenta numerosas invaginações e corresponde a parte mais ativa do clásto, tem a função de reabsorver o tecido ósseo. A zona clara ou zona de selamento localiza-se na periferia da borda em escova, é assim denominada pois não apresenta organelas, possui em sua membrana plasmática integrinas que se ligam à sequência RGD de proteínas não colágenas presentes na matriz óssea, como sialoproteína óssea e osteopontina, é responsável pela adesão da célula durante a reabsorção, esse selamento periférico separa a borda em escova dos arredores da célula. (Katchburian; Arana-Chavez, 2012; Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2012).

2.2 Reabsorção óssea

A reabsorção do tecido ósseo pode ocorrer de forma fisiológica ou patológica. A reabsorção fisiológica faz parte da remodelação óssea, processo contínuo durante toda a vida do indivíduo, quando a matriz é reabsorvida por osteoclastos e substituída por matriz secretada por osteoblastos. As células que reabsorvem os tecidos mineralizados fisiologicamente são as mesmas células que atuam em alguma patologia ou injúria dos tecidos mineralizados, as células clásticas.

O M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) atua na regulação da proliferação das células progenitoras de osteoclastos e em sua diferenciação (Tanaka et al., 1993). Assim que os precursores são fundidos e ativados, essas células tornam-se polarizadas e forma-se a zona de adesão.

O principal sistema regulador da osteoclastogênese é o sistema RANK/RANKL/OPG. O RANK (*receptor activator of NFκB*) está presente na membrana plasmática de células precursoras e de osteoclastos diferenciados. Este receptor sinaliza a proliferação e fusão de precursores e ativa a função reabsortiva das células clásticas., o que depende do acoplamento de seu ligante, o RANKL (*receptor activator of NFκB ligand*). O RANKL é expresso na membrana ou secretado por células indiferenciadas, células de revestimento ósseo e osteoblastos. A OPG (osteoprotegerina) é também produzida por células indiferenciadas e osteoblastos, e é considerada outro receptor do RANKL. Quando a OPG se liga ao RANKL, impede a fusão e ativação dos osteoclastos (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009; Bradaschia-Correa, et al., 2013; Belibasakis et al., 2012).

Assim que os osteoclastos entram em contato com a superfície óssea, são ativados e ocorre um bombeamento de íons de hidrogênio por meio de uma bomba de prótons trifosfatase de adenosina (ATPase) e pelos canais de cloreto na membrana plasmática da borda em escova. Esses eventos levam à acidificação do meio que é inicialmente neutro, e a dissolução do mineral (Zuo et al., 2006; Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2012). Os componentes degradados são fagocitados pela própria células e levados para o lado oposto da mesma. A superfície óssea reabsorvida que fica adjacente aos osteoclastos é denominada lacuna de Howship (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2012).

A atração dos osteoclastos até o local de reabsorção depende da liberação de mediadores, chamados de FAOs (Fatores ativadores de osteoclastos) (Lins et al., 2006). No caso da periodontite, mediadores químicos são liberados pelas células devido à inflamação no local (Lindhe et al., 2010).

2.3 Periodontite

A Periodontite é uma doença de natureza multifatorial e infecciosa, que resulta na inflamação e perda dos tecidos de suporte dos dentes. Essa inflamação é causada por bactérias associadas ao biofilme, causando a perda progressiva de inserção (Jain et al., 2008; Kalsi et al., 2011). A formação de bolsas periodontais e recessão da gengiva ocorrem não só pelo efeito destrutivo das bactérias, mas também pela resposta imunológica dos hospedeiros (Kalsi et al., 2011). A formação de bolsa periodontal é resultante da reabsorção do osso alveolar devido à presença dos agentes infecciosos supracitados, além da degradação das fibras do ligamento periodontal. Esta condição tem maior incidência em indivíduos de idade avançada do que em jovens. No que diz respeito à epidemiologia da doença, estudos têm mostrado que a prevalência em todo mundo está entre 10% e 15% podendo chegar até 80%, com variações de acordo com os métodos de diagnóstico (Gomes-Filho et al., 2012).

A patogênese da doença periodontal ocorre em resposta a microorganismos presentes no biofilme. Bactérias como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* apresentam lipopolissacarídeos (LPS), moléculas que desempenham um papel chave no desenvolvimento da doença. Fibroblastos gengivais humanos são os principais constituintes do tecido conjuntivo gengival e podem interagir diretamente com as bactérias e os produtos bacterianos incluindo LPS (Belibasakis et al., 2007; Gutiérrez-Venegas et al., 2007). Estas moléculas componentes da membrana de bactérias Gram-negativas, aliadas a mediadores inflamatórios, podem de alguma maneira ativar o recrutamento e ativação de osteoclastos nos sítios em que há inflamação. (Belibasakis et al., 2007; Giannobile, 2008). Os precursores de osteoclastos, oriundos da linhagem monocítica e presentes na corrente sanguínea, respondem a moléculas sinalizadoras e migram para o local. O RANKL, que estimula a reabsorção óssea, e a OPG, que bloqueia sua ação, formam um sistema bi-molecular que está envolvido na periodontite induzida. Em estudo clínico, realizado com tecido gengival e biofilme subgengival de 15 pacientes demonstrou que as bactérias da espécie *P. gingivalis* aumentam a expressão de RANKL e reduzem a expressão de OPG (Wara-aswapat et al., 2007).

Durante a progressão da doença, ocorre liberação de citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores, que contribuem para a degradação óssea, e destruição das fibras colágenas do ligamento periodontal, levando assim à perda de inserção do dente (Jain et al., 2008).

Além dessas citocinas, quimiocinas e mediadores químicos, uma variedade de MMPs exercem papel importante durante a degradação da fase orgânica do tecido ósseo, tornando-se assim alvos interessantes para estudos sobre o tratamento periodontal (Giannobile, 2008).

Os eventos que envolvem a doença periodontal, bem como o tratamento e precaução, ainda não estão totalmente elucidados. Para maior esclarecimento a doença tem sido induzida em animais, mais freqüentemente em ratos pois a disposição das raízes, anatomia, bactérias e características da doença periodontal são muito similares com a dos humanos (Graves et al., 2008). Recentemente foi desenvolvido um estudo em que a periodontite foi induzida em ratos, a partir da dieta, com aumento de caseína, assim a periodontite foi generalizada em toda cavidade oral (Aguirre et al., 2012). Porém a indução da doença por meio da introdução de ligaduras no sulco gengival é a mais utilizada por ser a que mais se assemelha com a doença periodontal em humanos, pois a ligadura facilita a retenção de bactérias patogênicas no local (Graves et al., 2008).

2.4 Bisfosfonatos

O alendronato sódico faz parte de um grupo de fármacos com propriedade antireabsortiva, análogos ao pirofosfato endógeno, que é regulador fisiológico de calcificação e está naturalmente presente no soro e na urina. Estes fármacos se ligam à hidroxiapatita da superfície óssea e, uma vez internalizados pelos osteoclastos ao degradarem a matriz óssea, causam um efeito inibitório nessas células (Russell et al., 2008; Samantaria, et al., 2010; Russell, 2011). Estes fármacos são utilizados no tratamento de doenças como a doença de Paget e

especialmente a osteoporose, patologia que irá aumentar substancialmente nas próximas décadas, devido ao envelhecimento da população a nível mundial (Brewer et al., 2011). Além disso, os bisfosfonatos são indicados na prevenção de metástases ósseas de tumores malignos (Samantaria et al., 2010; Russell, 2011).

O mecanismo de ação dos diferentes tipos de bisfosfonatos está vinculado à composição de suas cadeias laterais, assim como o potencial antireabsortivo. São divididos em dois grupos com diferentes ações molecular. Os nitrogenados e os não nitrogenados.

O bisfosfonatos não nitrogenados como etidronato e clodronato, apresentam o radical hidroxila (OH) ou um átomo de cloro (Cl) em uma das cadeias laterias, atuam no metabolismo de ATP dos osteoclastos resultando em produtos não hidrolisáveis que acumulam em seu citoplasma, conseqüentemente, inibem varias enzimas, comprometendo essas células. Essa classe de bisfosfonatos apresenta menor potencial antireabsortivo (Russell, 2011). Os bisfosfonatos nitrogenados como o alendronato sódico e ácido zoledrônico, possuem um radica $-NH_2$, e atuam na via do mevalonato, inibindo a enzima farnesil difosfato sintase. A inibição dessa enzima inibe a síntese de farnesil pirofosfatase. A via do mevalonato inibida, a síntese de colesterol e lipídios isoprenóides, também é inibida. Essas são moléculas essenciais para diversas funções celulares, como evitar a prenilação de GTPases, que exercem funções importantes como formação de podosomos, tráfego de vesículas pelo citoplasma e formação de borda em escova, inibindo assim a função de reabsorção (Russell et al., 2008; Russell, 2011; Taylor et al., 2011).

Atualmente o fármaco mais utilizado para a prevenção e tratamento da osteoporose é o alendronato sódico (Ruggiero et al., 2009). Uma vez que esse fármaco é indicado a pacientes de idade avançada, no qual a incidência de doença periodontal é elevada, torna-se interessante o estudo dos efeitos desta droga na progressão da doença periodontal. O uso de bisfosfonatos tem cada vez mais despertado o interesse de profissionais da odontologia, devido aos numerosos relatos de complicações pós operatórias tais como osteomielites, osteonecrose, alterações no processo de osseointegração de implantes, na movimentação dentária e no atendimento a pacientes idosos. Com isso tem sido estudado em diferentes contextos.

Foi demonstrado que o alendronato sódico e o etidronato administrados a ratos neonatos interferem na formação da via eruptiva através do impedimento da ativação de osteoclastos pelo alendronato e a diminuição do número destas células pelo etidronato (Bradaschia-Correa et al., 2007) Ainda, os mesmos autores descrevem que o alendronato diminui a expressão de RANKL na região oclusal da cripta óssea, impedindo a ativação dos osteoclastos, que permanecem latentes e então sofrem apoptose (Bradaschia-Correa et al., 2013).

Outras pesquisas ainda foram realizadas para estabelecer a reação do alendronato com a doença periodontal. Inicialmente os relatos foram sobre a diminuição da reabsorção da crista alveolar, levando a preservação dos dentes no arco dentário (Duarte et al., 2004).

Devido ao aparecimento de muitos casos clínico, recentemente estudos tem sido feitos para esclarecer melhor a relação dos bisfosfonatos e osteonecrose nos maxilares (OMRB).

2.5 Bisfosfonatos e incidência de OMRB

A osteonecrose dos maxilares vinculada ao uso de bisfosfonatos (OMRB) foi relatada pela primeira vez por Marx, em 2003. Foi definida sendo uma alteração vinculada ao uso de bisfosfonato, por tempo prolongado, sendo clinicamente caracterizada por uma área de osso necrótico exposto à cavidade oral, seguido de exodontia. É considerada por alguns autores como um tipo de osteomielite, uma vez que é necessária a presença de bactérias no sítio necrótico para que haja necrose (Kumar et al., 2010).

Desde então estudos vem sendo publicados relacionando esses fatores em diferentes contextos. Yamamoto-Silva et al. (2013), realizaram um estudo no qual sinais de osteonecrose foram achados na mandíbula de ratos que tiveram o segundo molar inferior extraídos e haviam recebido doses de alendronato sódico previamente e posteriormente à extração.

Outro grupo também realizou um estudo de coorte em humanos, para avaliar a relação da osteonecrose nos maxilares e o uso de bisfosfonatos. Obtiveram como resultado uma significativa associação entre os bisfosfonatos e a osteonecrose a qual foi definida como osso exposto a cavidade oral durante o período observado. Além de apontar a periodontite como fator de risco para a osteonecrose (Yamazaki et al., 2012).

O alendronato sódico administrado a ratos sem indução de periodontite mostrou que esse bisfosfonato não alterou morfológicamente a estrutura do osso alveolar, mantendo-a com características normais dos tecidos de animais saudáveis (Samantaria, et al., 2010). Pesquisas em modelos de periodontite experimental em ratos tratados com bisfosfonatos mostraram que a aplicação de risedronato em curta duração pode ser útil para inibição da reabsorção óssea em periodontite, e que as doses excessivas do fármaco administrado em mais sessões pode levar ao comprometimento da formação óssea e na angiogênese (Cetinkaya et al., 2008). Quando empregado ácido zoledrônico a ratos com periodontite induzida por ligadura, foi observada perda difusa de osteócitos no osso alveolar, o qual se apresentou clinicamente exposto à cavidade oral (Aghaloo et al., 2011).

Aguirre et al. (2010) relataram sobre a toxicidade dos bisfosfonatos nos tecidos moles, o que seria uma justificativa para o aparecimento espontâneo da OMRB. Em 2012, o mesmo grupo demonstrou que o ácido zoledrônico e o alendronato em baixas doses em um modelo de periodontite induzida através de alimentação rica em caseína e sacarose diminuíram a reabsorção óssea e não provocaram osteonecrose; porém, em dose elevada, o ácido zoledrônico aumentou a inflamação periodontal e induziu osteonecrose (Aguirre et al., 2012).

Estudo com humanos também foram recentemente realizados com o objetivo de avaliar a periodontite e outros fatores bucais como fator de risco para OMRB. Tsao et al. (2013) desenvolveram um estudo transversal e concluíram que sugerindo que a periodontite e bactérias associadas são potencialmente importantes no aparecimento da OMRB.

Thumbigere-Math et al. (2013), publicaram um estudo de caso controle afim de esclarecer e melhor relacionar OMRB com a periodontite em pacientes. Concluíram que pacientes com maior perda óssea vertical apresentaram OMRB.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar se o alendronato sódico interfere na evolução da periodontite induzida por ligadura em molares de ratos, agindo no mecanismo de reabsorção óssea por osteoclastos. Além disso, verificar a possível presença de necrose óssea no processo alveolar. Assim, foram analisados os seguintes aspectos:

1. Bloqueio ou retardamento dos efeitos da ligadura para evolução da doença e perda de inserção óssea.
2. Presença e atividade das células clásticas nas superfícies de tecidos mineralizados.
3. Análise morfológica e ultra-estrutural dos tecidos periodontais
4. Imunomarcagem das proteínas RANKL e OPG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos de uso de animais em pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de São Paulo-FOUSP, (Protocolo nº 002/2013). (Anexo A).

Foram utilizados 48 ratos Wistar albinos, todos do sexo masculino, com 3 meses de vida e peso médio de 250g. Durante os experimentos foram mantidos em salas com temperatura e umidade controladas, e ciclos de luz de 12 em 12 horas, recebendo água e ração.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Alendronato (ALN) e Grupo Controle Sham (CTL). Em um deles, os ratos foram tratados com alendronato sódico e receberam a ligadura para indução da periodontite apenas no segundo molar superior direito; no outro grupo, os animais foram tratados com solução salina estéril e receberam a ligadura como no outro grupo. O lado esquerdo da maxila, não recebeu nenhuma intervenção e foi usado como controle de ambos os grupos.

4.2 Grupos experimentais

4.2.1 Grupo Controle (CON)

CON–SL-7: hemimaxilas esquerdas, 7 dias após o experimento.

CON–SL-14: hemimaxilas esquerdas, 14 dias após o experimento.

CON–SL-21: hemimaxilas esquerdas, 21 dias após o experimento.

CON–SL-30: hemimaxilas esquerdas, 30 dias após o experimento.

CON-L-7: hemimaxilas direitas, 7 dias após o experimento.

CON-L-14: hemimaxilas direitas, 14 dias após o experimento.

CON-L-21: hemimaxilas direitas, 21 dias após o experimento.

CON-L-30: hemimaxilas direitas, 30 dias após o experimento.

4.2.2 Grupo tratado com alendronato sódico (ALN)

ALN-SL-7: hemimaxilas esquerdas, 7 dias após o experimento.

ALN-SL-14: hemimaxilas esquerdas, 14 dias após o experimento.

ALN-SL-21: hemimaxilas esquerdas, 21 dias após o experimento.

ALN-SL-30: hemimaxilas esquerdas, 30 dias após o experimento.

ALN-L-7: hemimaxilas direitas, 7 dias após experimento.

ALN-L-14: hemimaxilas direitas, 14 dias após experimento.

ALN-L-21: hemimaxilas direitas, 21 dias após experimento.

ALN-L-30: hemimaxilas dieritas, 30 dias após experimento.

4.3 Administração do alendronato sódico

Foram administradas diariamente, por via subcutânea, doses de 2,5 mg/kg/dia de alendronato sódico (Bradaschia-Correa et al., 2007) diluído em tampão PBS. O tratamento foi iniciado 7 dias antes da indução da doença periodontal e o tratamento persistiu durante 7, 14, 21 e 30 dias, Já os animais do grupo controle, foram injetados diariamente com 100 µl de PBS. A tabela 4.1. mostra a distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais.

Tabela 4.1- Divisão dos grupos experimentais de acordo com tempo de tratamento

	Controle	Alendronato
7 dias	6	6
14 dias	6	6
21 dias	6	6
30 dias	6	6

4.4 Indução da doença periodontal

A doença periodontal experimental foi induzida em todos os ratos. Fios de seda estéreis (4-0) foram inseridos no sulco gengival do segundo molar superior direito, favorecendo o acúmulo de biofilme. No segundo molar superior esquerdo não foi colocada a ligadura; portanto, foi usado como lado controle. Para a inserção das ligaduras, os animais foram anestesiados com 1 ml/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan) e 1 ml/kg de cloridrato de ketamina (Donaren®). As ligaduras não foram removidas até o momento da eutanásia dos animais.

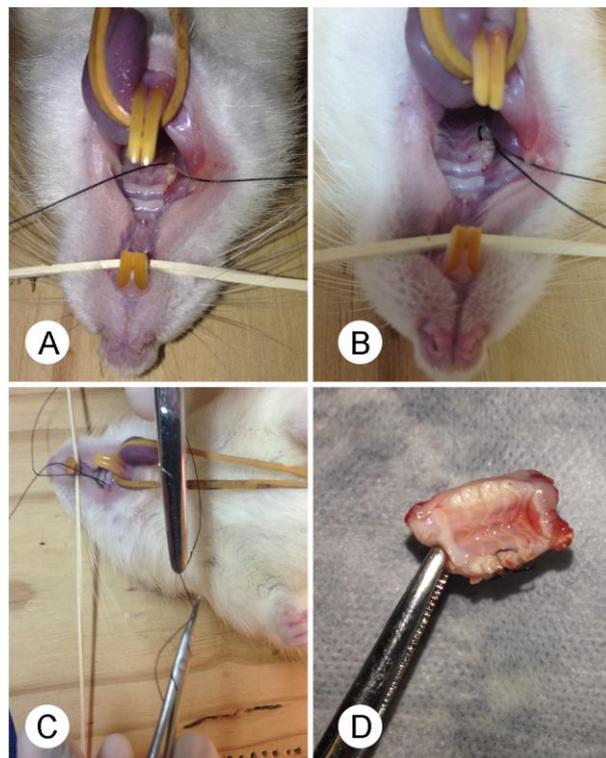


Figura 4.1 - Em A, fio 4-0 introduzido na mesial do segundo molar superior direito. Em B, nota-se o fio posicionado na mesial e distal do segundo molar superior. Em C, nó feito com o auxílio de porta-agulhas, para estabilização do fio no sulco gengival. Em E, maxila dissecada para processamento, de um espécime vinte e um dias após a introdução do fio, mostrando este em posição no sulco gengival

4.5 Obtenção dos espécimes e fixação

No dia da eutanásia, os animais foram anestesiados como previamente descrito, decapitados e as maxilas retiradas foram imersas em solução fixadora contendo glutaraldeído a 0,1% + formaldeído a 4% (preparado do paraformaldeído). O béquer contendo os espécimes foi imerso na solução fixadora e posicionado no centro de uma forma de vidro contendo gelo picado; o conjunto foi posicionado no interior de um forno de microondas Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, CA. USA). Um termômetro foi imerso na solução fixadora durante a operação do forno, a fim de monitorar a temperatura da mesma, a qual não ultrapassou 37 °C. Os espécimes foram expostos a 3 ciclos de 5 minutos a 100% de potência. Após a irradiação de microondas, foram imersos em nova solução fixadora e deixados *overnight* a 4°C (Massa; Arana-Chavez, 2000).

4.6 Processamento dos espécimes

Após a fixação, os espécimes foram lavados durante uma hora em tampão cacodilato de sódio a 0,05M, pH 7,2 e, em seguida, imersos em solução de EDTA a 4,13%, pH 7,2, onde permaneceram por aproximadamente 30 dias para descalcificação (Warshawsky; Moore, 1967). Depois de descalcificadas, as hemimaxilas foram divididas ao meio no sentido longitudinal (Figura 4.2), sendo que uma parte do material seguiu para processamento de inclusão em parafina (análise histológica, histométrica, histoquímica e imuno-histoquímica) enquanto a outra parte do material seguiu para processamento em inclusão em resina Spurr (análise ultra-estrutural).

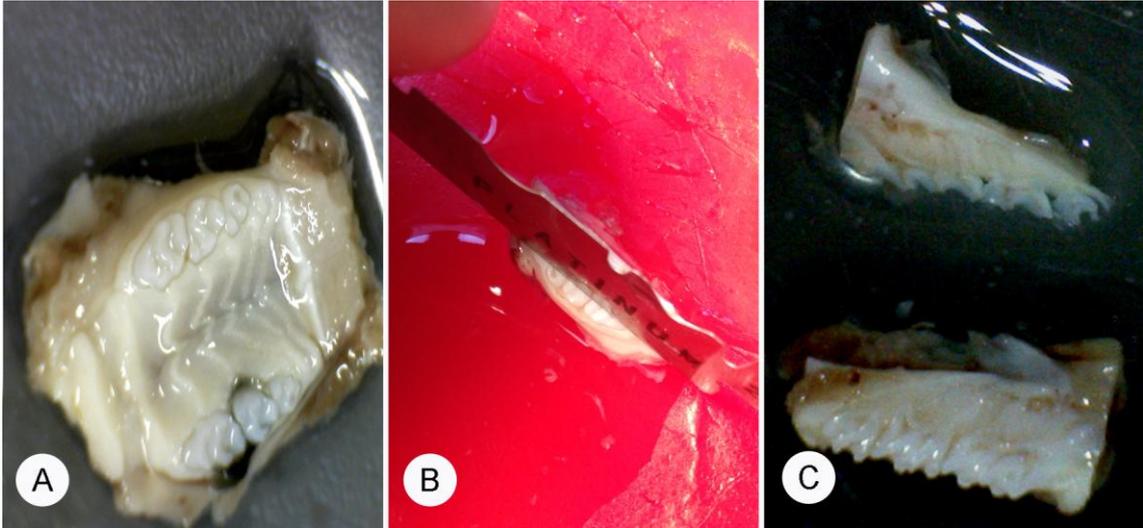


Figura 4.2 - Em A, maxila após a descalcificação. Em B, divisão das hemi-maxílas no sentido mesio-distal. Em C, espécime dividido para inclusão em parafina ou resina Spurr

4.7 Microscopia de luz

Os espécimes destinados para esta análise foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Cortes de 4 μ m feitos no micrótomo Microm HM 360 e posteriormente corados em hematoxilina e eosina para análise histológica e histomorfométrica. As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus BX-60 equipado com sistema de captura de imagem Cell F.

4.8 Mensuração do nível da crista do processo alveolar

Realizou-se a obtenção dos dados dos 06 (seis) animais de cada grupo, apenas do lado onde a periodontite havia sido induzida, em todos os tempos. A mensuração na altura do processo alveolar foi realizada a partir da distância da junção cimento-esmalte até a região da crista óssea. Em cada grupo foram utilizados três cortes/animal; as mensurações foram realizadas com cortes corados com H&E, no aumento de 40x, na região distal e mesial do segundo molar. As medidas foram realizadas utilizando o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

4.9 Análise estatística

Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística, que foi feita inicialmente com análise de variância (ANOVA), e posteriormente foram submetidos ao teste T de Student, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Calif., USA), para análise entre os grupos. Foram considerados estatisticamente relevantes valores inferiores a 5%.

4.10 Histoquímica para evidenciação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

Parte dos cortes foram submetidas à histoquímica TRAP, com o objetivo de identificar células clásticas e seus precursores. Cortes de 4µm foram desparafinizados em 2 banhos de xilol por 30 minutos, e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida foram incubados no meio de Burstone, que foi preparado dissolvendo-se 4 mg de “naphotol AS-BI phosphate substrate” em 0,25 ml de N,N–dimetil-formamida, foi adicionado 25 mL de tampão acetato 0,2M pH5,0, 35mg de Fast Red Violet LB ou Fast Garner GBC, e 60 L de MgCl a 10%. Em seguida, 25 mL da solução foi filtrada e aquecida a 37°C, adicionando, à mesma, D(-) ácido tartárico 50 mM. As lâminas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos e, em seguida, lavadas por 30 minutos em água corrente e contra-coradas com solução alcoólica de hematoxilina de Harris a 3% por 3 minutos. Após a contra-coloração, realizou-se a desidratação dos cortes em concentrações crescentes de etanol, seguida de etanol/xilol e diafanização em xilol. Todas as lâminas contendo os cortes foram cobertas com lamínula utilizando Entellan e observadas em microscópio de luz Olympus BX-60.

4.11 Imuno-histoquímica para as proteínas RANKL e OPG

Cortes de parafina foram submetidos a imuno-histoquímica para marcação de RANKL e OPG. Para tanto, os cortes de 4µm foram coletados sobre lâminas de vidro previamente silanizadas pela solução de 3-aminopropytriethoxy-silane (Sigma Chemical CO, St Louis, Mo/USA) a 10% em etanol absoluto. Foram desparafinizados em dois banhos de xilol, um a 60°C por 15 minutos, e outro em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto seguido por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada. Posteriormente, foram lavados em água corrente por 10 minutos e passados por dois banhos de

água destilada de 5 minutos cada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com dois banhos de quinze minutos cada um em solução peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1v/v). Os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, imersos em três banhos de solução de Tris ph 7,4, por cinco minutos cada.

Os cortes foram incubados durante 60 minutos em soro suíno (Sigma) e posteriormente incubados durante 18 horas, com os anticorpos. Para identificação da proteína osteoprotegerina, foi utilizado o anticorpo anti-osteoprotegerina (Santa Cruz Biotechnology- SC 11383) e para identificação da RANK L foi utilizado o anticorpo cabra anti-rankl (Santa Cruz Biotechnology – SC 7627). A revelação foi realizada com o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, CA, USA) segundo as orientações do fabricante. Após a lavagem, foi feita a contra coloração com hematoxilina de Mayer previamente filtrada.

Após a coloração, os cortes foram desidratados em concentrações de etanol seguindo a seqüência crescente de 70% à 100% durante 2 minutos cada banho e diafanização em xilol (2 banhos de 5 minutos cada). As lâminas foram montadas em Entellan (EMS, Hatfield, PA, USA) para exame em microscópio de luz Olympus BX-60.

4.12 Microscopia eletrônica de transmissão

Dois ratos de cada grupo foram destinados para análise ultra-estrutural. Após o período de descalcificação, os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em concentrações crescentes de etanol e em acetona, infiltrados e incluídos em resina Spurr.

Os blocos de resina Spurr foram cortados em sentido méso-distal, inicialmente em micrótomo Microm HM 360- 1µm de espessura- corados com azul de toluidina e analisados em microscópio de luz, nos quais foram selecionadas áreas para cortes ultrafinos.

Os cortes ultrafinos de 60 nm de espessura foram feitos no aparelho Leica Ultracut-R, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As análises foram feitas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010 equipado com dispositivo de captura de imagem digital, Gatan, com câmera SC1000 Orius acoplada.

5 RESULTADOS

O periodonto dos molares sem ligadura (CON-SL e ALN-SL) exibiu papila interdentária triangular e epitélio juncional no limite cimento-esmalte, sem presença de inflamação e aspecto saudável (Figura 5.1 A e B). As células clásticas foram evidenciadas através do método de histoquímica para TRAP, os cortes dos grupos CON-SL apresentaram essas células multinucleadas e em pequena quantidade (Figura 5.2 A), exercendo reabsorção fisiológica de algumas regiões do tecido ósseo. O grupo ALN-SL apresentou as células clásticas em estado latente, arredondadas e sem borda em escova (Figura 5.2 B). As análises foram semelhantes para todos os tempos. Já os molares que receberam ligadura (CON-L e ALN-L) exibiram intenso processo inflamatório em todos os tempos na região interdentária, papila interdentária com aspecto côncavo, epitélio juncional localizado apicalmente em relação ao limite cimento-esmalte. O processo alveolar encontrou-se com grande reabsorção no grupo controle em todos os tempos (CON-L) (Figura 5.1 C). Diferentemente, o grupo tratado (ALN-L) (Figura 5.1 D) apresentou osso alveolar pouco reabsorvido, porém, com áreas de osso expostas à cavidade oral ou cobertas por fina camada epitelial, nos grupos ALN-L-21 e ALN-L-30. As células clásticas também foram evidenciadas na técnica histoquímica TRAP.

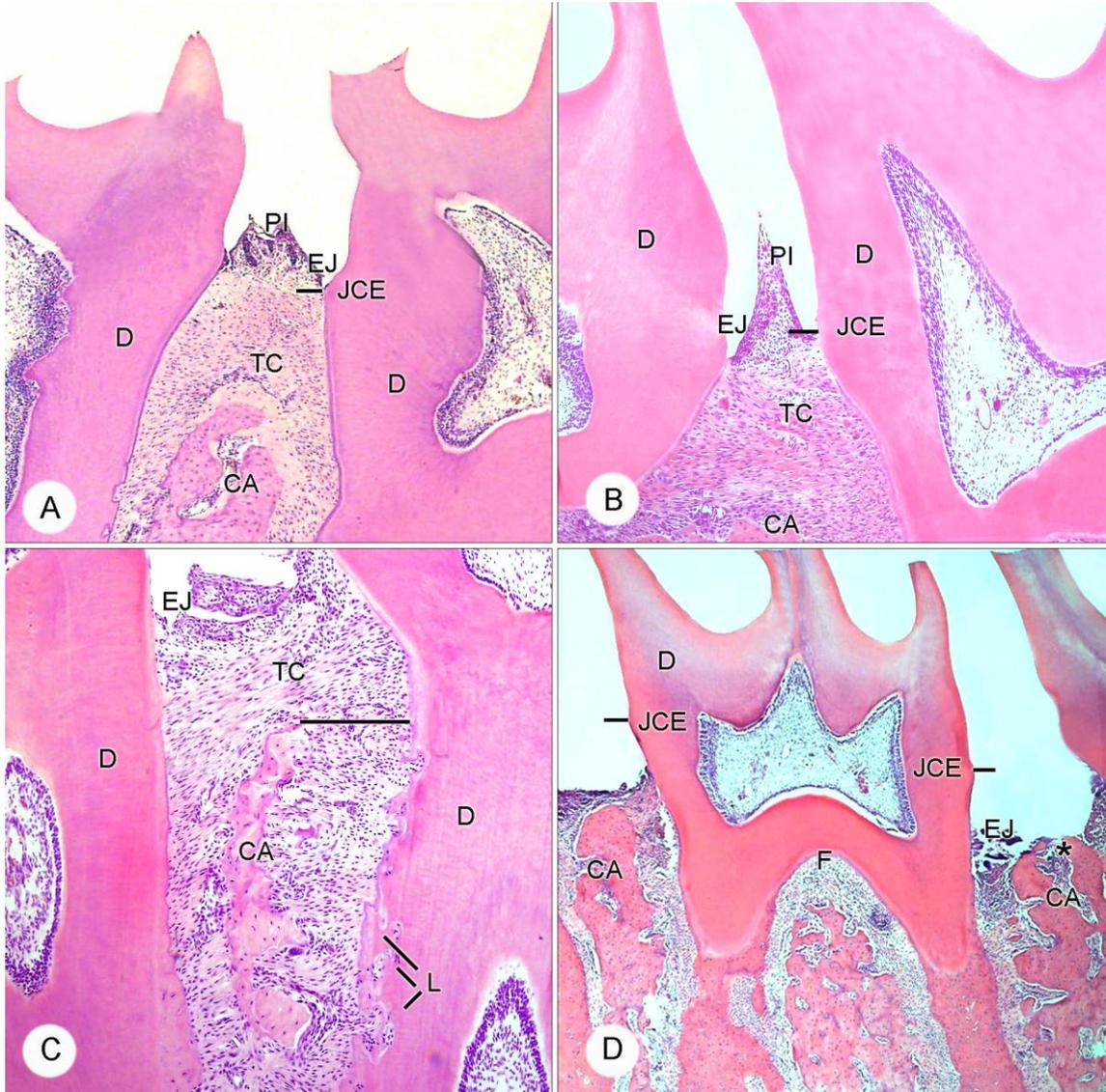


Figura 5.1 - Em A e B fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas mostrando a papila interdentária e a crista alveolar (CA), situadas entre 1º e 2º (em A) e 2º e 3º molares (em B) dos grupos CON-SL-7 (em A) e ALN-SL-7 (em B). Ambos apresentam aspecto de normalidade, com papila interdentária (PI) com aspecto triangular, e o término do epitélio juncional (EJ) na altura da junção cemento esmalte (JCE). A crista alveolar (CA) aparece sem sinais de reabsorção, recoberta por tecido conjuntivo (TC). D, dentina. Em C, corte sagital de maxila da região interdentária do segundo molar do grupo CON-L-14. A papila interdentária apresenta aspecto côncavo e a crista alveolar (CA) extremamente reabsorvida; o término do epitélio juncional (EJ) está localizado apicalmente à junção cemento esmalte (JCE). Observa-se infiltrado inflamatório presente. D, dentina; P, polpa; TC, tecido conjuntivo. Em D, espécime do grupo ALN-L-21, apresentando papila interdentária com aspecto côncavo, crista alveolar (CA), exposta a cavidade oral (*). Presença de infiltrado inflamatório. D, dentina; P, polpa; TC, tecido conjuntivo; F, furca. (Figuras A e D aumento original 40x. Figuras B e C 100x)

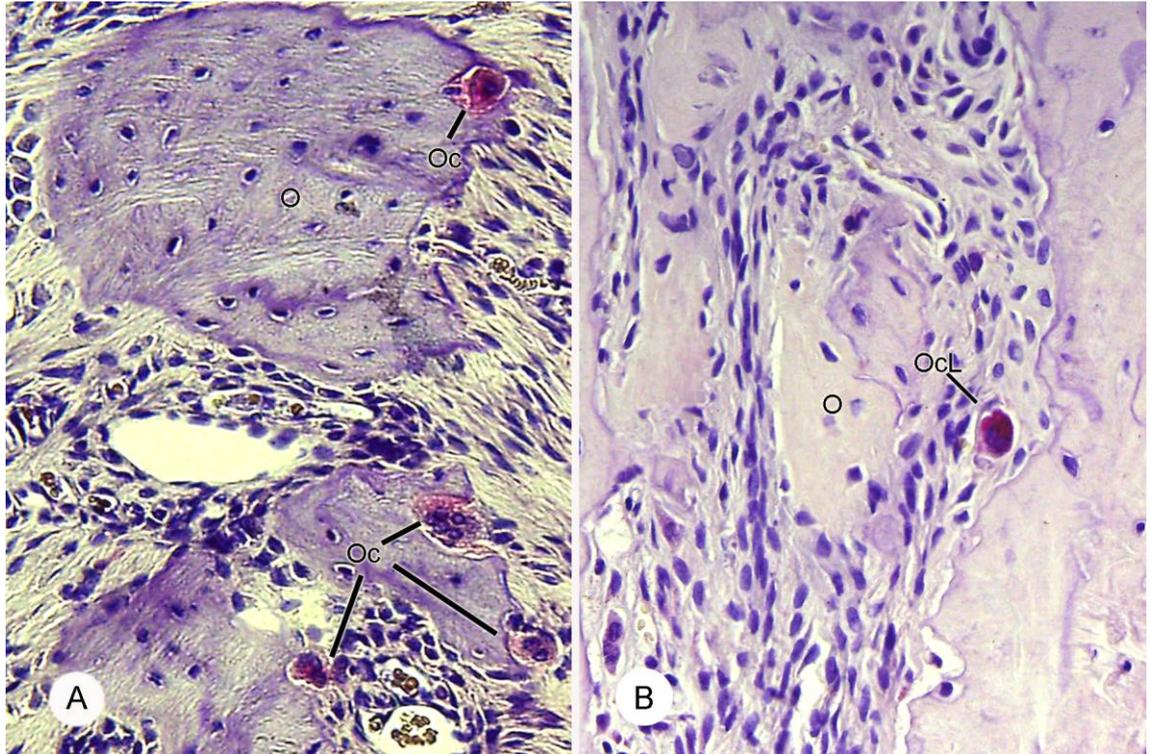


Figura 5.2 - Fotomicrografias mostrando histoquímica para TRAP dos grupos CON-SL-7 (A) e ALN-SL-7 (B). Em A, crista alveolar mesial do segundo molar superior esquerdo, onde são observados osteoclastos ativos, aderidos ao trabeculado do osso (O). Em B um osteoclastos em estado latente, distante da superfície óssea (O). (Figura A aumento original 100x. Figura B aumento original 200x)

5.1 Análise histológica e histoquímica TRAP

5.1.1 Grupo CON-L-7

Nos cortes histológicos de todos os animais desse grupo observou-se o início da instalação da doença periodontal. A papila interdentária apresentou-se com aspecto côncavo, devido à colocação do fio. Houve regiões com inflamação (Figuras 5.3 A e B) e início de reabsorção do osso alveolar, caracterizada pela presença de osteoclastos multinucleados, ativos formando lacunas de Howship, evidenciados através do método de histoquímica para TRAP (Figuras 5.3 C e D). As células TRAP-positivas ocorreram em número reduzido quando comparado aos grupos

tratados de todos os tempos. O processo alveolar era completamente recoberto por tecido conjuntivo e por fibras do ligamento periodontal (Figuras 5.3 A e B).

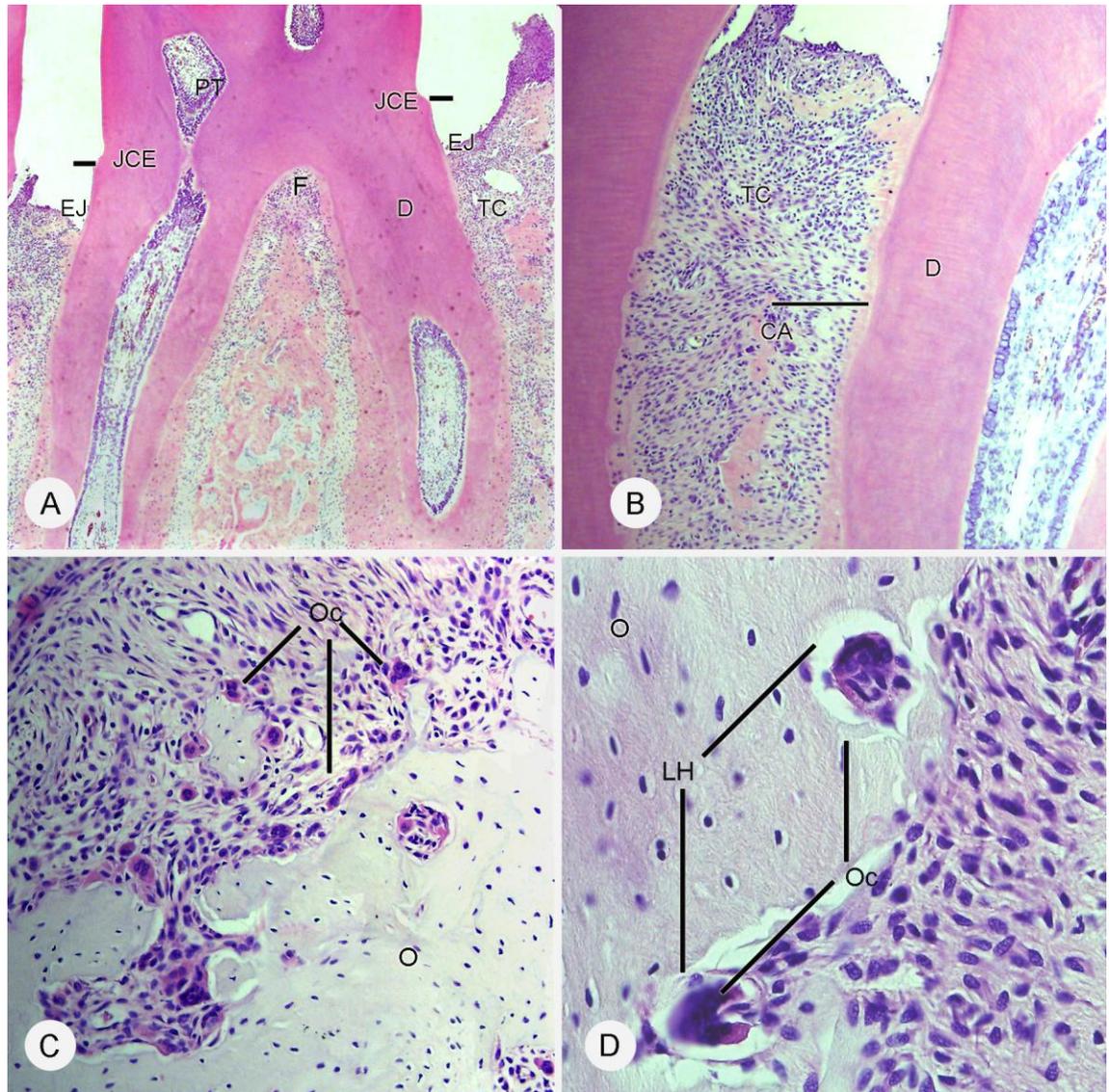


Figura 5.3 - Fotomicrografias do Grupo CON-L-7. Em A, papilas interdentárias do segundo molar com aspecto côncavo e epitélio juncional (EJ) terminando apicalmente à junção cimento esmalte (JCE). D, dentina, TC, tecido conjuntivo; F, furca. Em B, crista alveolar (CA) reabsorvida, recoberta por espessa camada de tecido conjuntivo (TC). Em C, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos na região de osso alveolar (O). Em D pode-se observar em maior aumento dois osteoclastos ativos, adjacentes a lacunas de Howship (LH). (Figura A, aumento original 40x. Figura B, aumento original 100x. Figura C, aumento original 200x. Figura D, aumento original 400x)

5.1.2 Grupo ALN-L-7

Em todos os cortes histológicos notou-se que a crista alveolar não apresentou o mesmo grau de reabsorção do grupo CON-L foram observados alguns pequenos pontos de reabsorção, apesar da evidente presença de inflamação. A crista alveolar estava recoberta por tecido conjuntivo e fibras do ligamento periodontal, porém esses tecidos encontraram-se em menor espessura do que no grupo CON-L. As papilas interdentárias apresentavam formato côncavo, um pouco abaixo da junção cimento esmalte, devido à sua forma (Figura 5.4 A e B). As células clásticas, em sua maioria, estavam em estado latente, com forma arredondada, distantes das superfícies ósseas, onde não foram vistas lacunas de Howship. Os clastos latentes foram evidenciados pela técnica histoquímica TRAP (Figura 5.4 C e D).

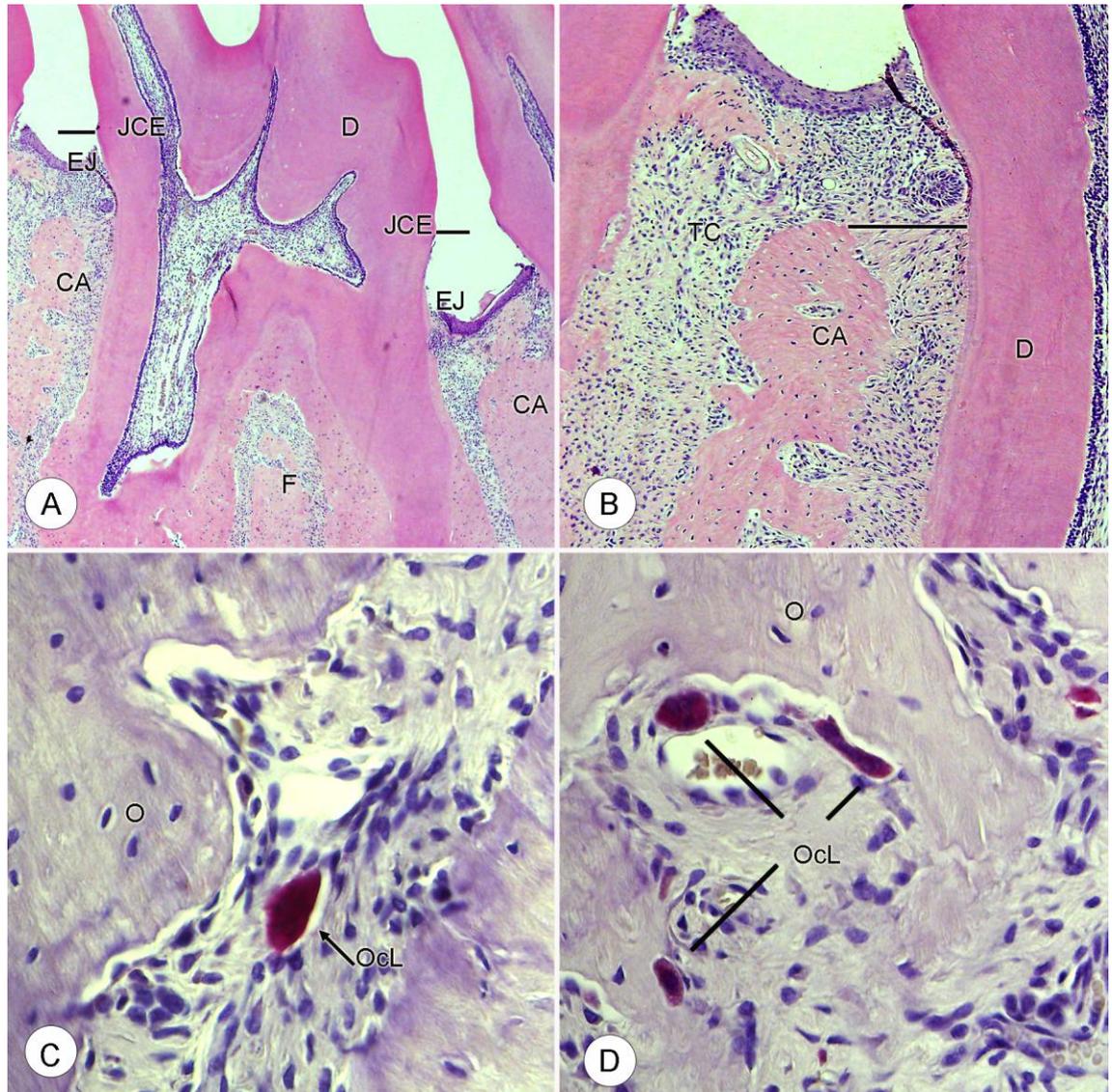


Figura 5.4 - Fotomicrografias do Grupo ALN-L-7- Em A, papilas interdentárias do segundo molar com aspecto côncavo. D, dentina, EJ, epitélio juncional, TC, tecido conjuntivo. Em B, crista alveolar (CA), não reabsorvida. Em C, osteoclasto (Ocl) TRAP-positivo com aspecto latente afastado da superfície óssea (O),. Em D, osteoclastos próximos, porém, não aderidos à superfície óssea (O), portanto, também com aspecto latente.(Figura A, aumento original 40x. Figura B, aumento original 100x. Figuras C e D, aumento original 400x)

5.1.3 Grupo CON-L-14

A partir dos cortes histológicos foi possível observar a evolução da doença periodontal, com maior reabsorção da crista alveolar e presença de inflamação neste tempo experimental. Foi possível observar também o início de reabsorção de furca (Figura 5.5 A e B). O cimento e dentina também apresentaram algumas regiões de reabsorção com lacunas de Howship (Figura 5.5 C). As células clásticas na forma ativa, aderidas à superfície óssea, puderam ser vistas em histoquímica para TRAP (Figura 5.5 D).

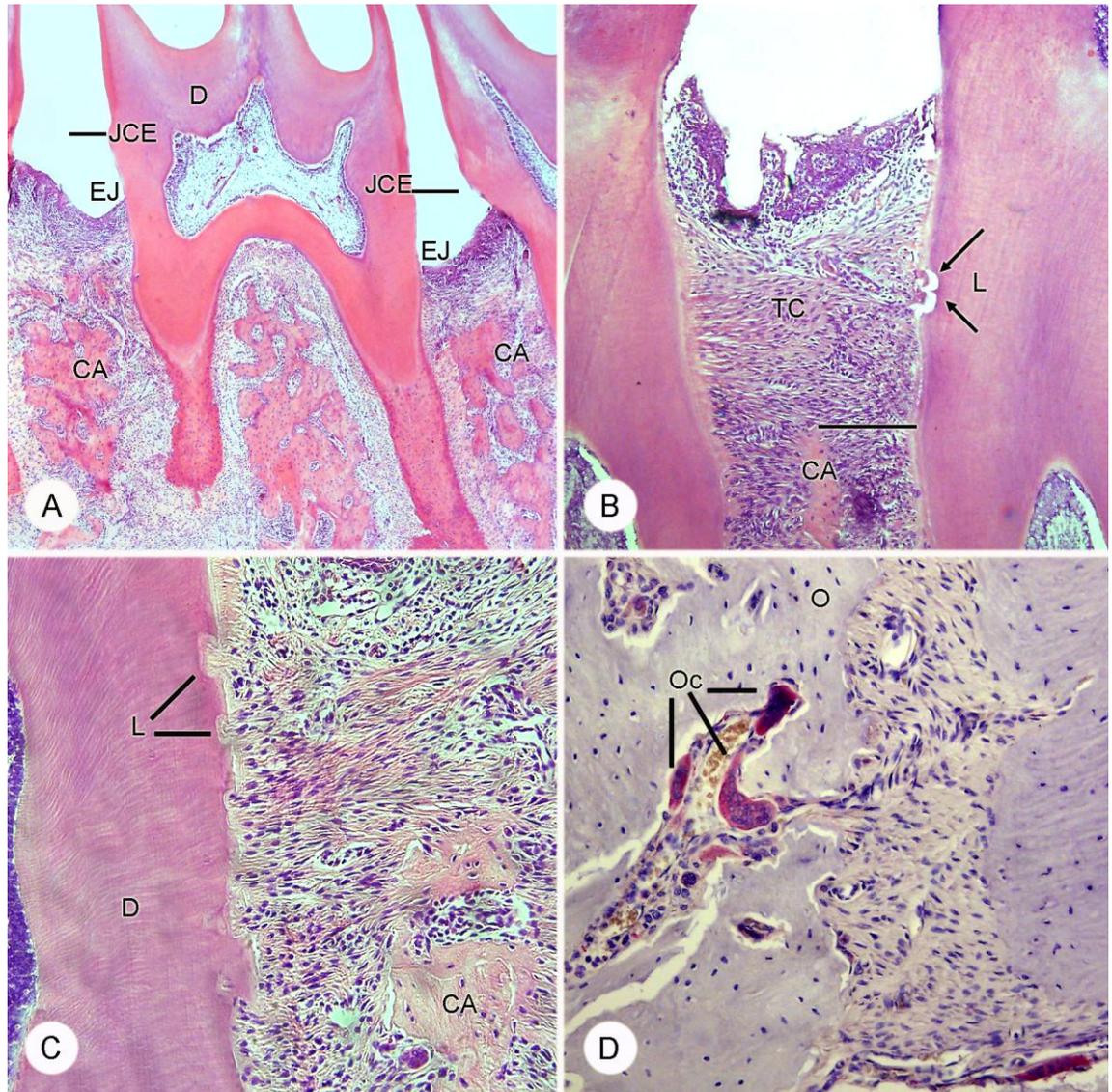


Figura 5.5 - Fotomicrografias do Grupo CON-L-14 mostrando, em A, papilas interdentárias do segundo molar com aspecto côncavo e epitélio juncional (EJ) terminando apicalmente à junção cimento esmalte (JCE). Em B, crista alveolar (CA) entre o primeiro e segundo molar, reabsorvida, coberta por tecido conjuntivo (TC) do periodonto. Observar lacuna de reabsorção (L) na superfície radicular, atingindo dentina. Na figura C é possível observar, em maior aumento, várias áreas de reabsorção (L) na dentina (D), deixando a superfície radicular com aspecto irregular. Em D, osteoclastos TRAP-positivos (Oc) aderidos à superfície óssea com aspecto ativo. (Figura A, aumento original 40x. Figura B, aumento original 100x. Figura C, aumento original 200x. Figura D, aumento original 400x).

5.1.4 Grupo ALN-L-14

O cimento e dentina dos molares desse grupo não foram reabsorvidos, assim como a crista alveolar. Porém, ainda foi possível observar áreas de inflamação. Uma fina camada de tecido conjuntivo e epitelial recobriram a região coronária da crista alveolar, sem deixá-la exposta à cavidade oral (Figura 5.6 A e B). Os osteoclastos encontraram-se em estado latente, mesmo que próximos às trabéculas ósseas, não apresentando borda em escova nem zona clara (Figura 5.6 C).

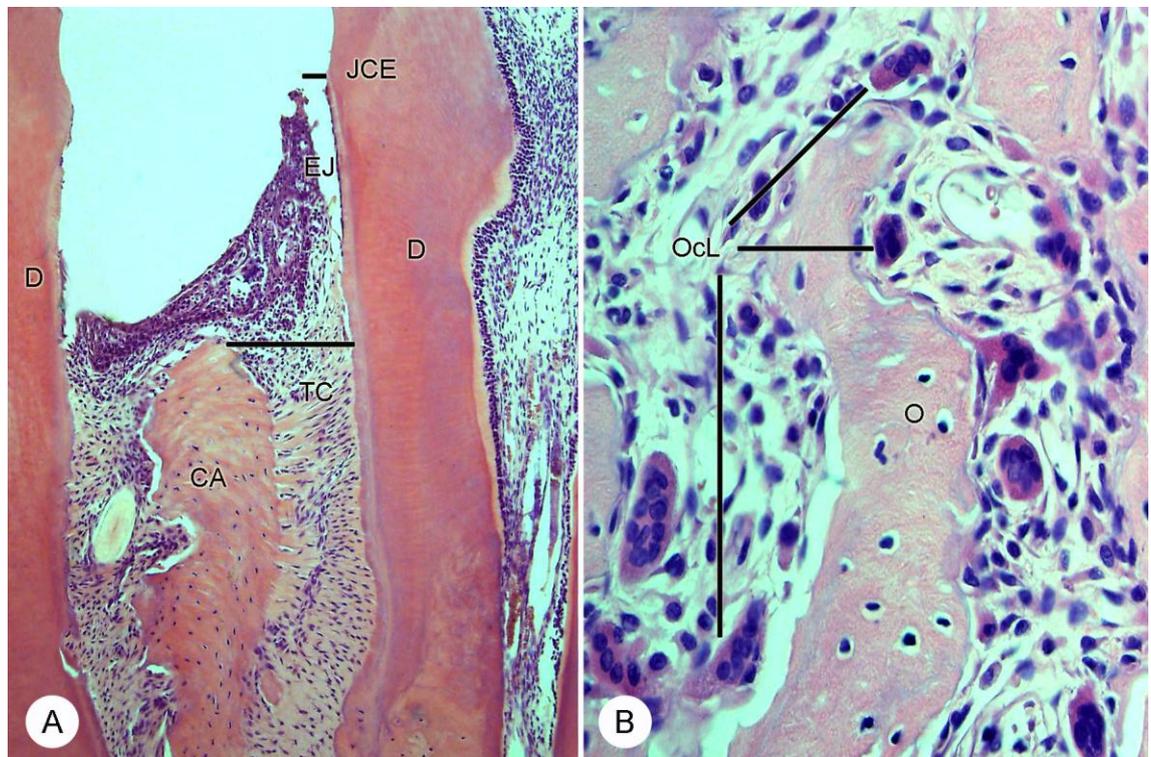


Figura 5.6 - Fotomicrografias do Grupo ALN-L-14- Mostrando em A, crista alveolar (CA) entre o 2º. e o 3º. molares, recoberta por fina camada de tecido conjuntivo e pelo epitélio da papila interdentária com aspecto côncavo, e epitélio juncional (EJ) terminando apicalmente à junção cimento esmalte (JCE). Observa-se também a dentina radicular (D) e cimento sem reabsorção e aspecto de normalidade. Em B, fotomicrografia de histoquímica TRAP, mostrando muitos osteoclastos (OcL) multinucleados, com aspecto latente, próximos mas não aderidos à superfície óssea (O). (Figura A, aumento original 100x. Figura B, aumento original 200x)

5.1.5 Grupo CON-L-21

Vinte e um dias após a colocação do fio, a avaliação dos cortes histológicos mostrou a evolução da doença periodontal, com maior reabsorção de crista alveolar, furca, cemento e dentina, deixando a superfície radicular externa irregular (Figura 5.7 A, B e C). A histoquímica para TRAP evidenciou células clásticas, aderidas e próximas de lacunas de Howship no osso, no cemento e na dentina radicular. Essas células estavam mais evidentes do que nos grupos de 7 e 14 dias. Algumas dessas células apresentaram-se em forma ativa, multinucleadas, mas distantes dos tecidos mineralizados (Figura 5.7 D e E). Apesar do tecido ósseo ter sofrido grande reabsorção, os osteócitos apresentaram aspecto vital. Infiltrado inflamatório ainda esteve presente nas áreas adjacentes.

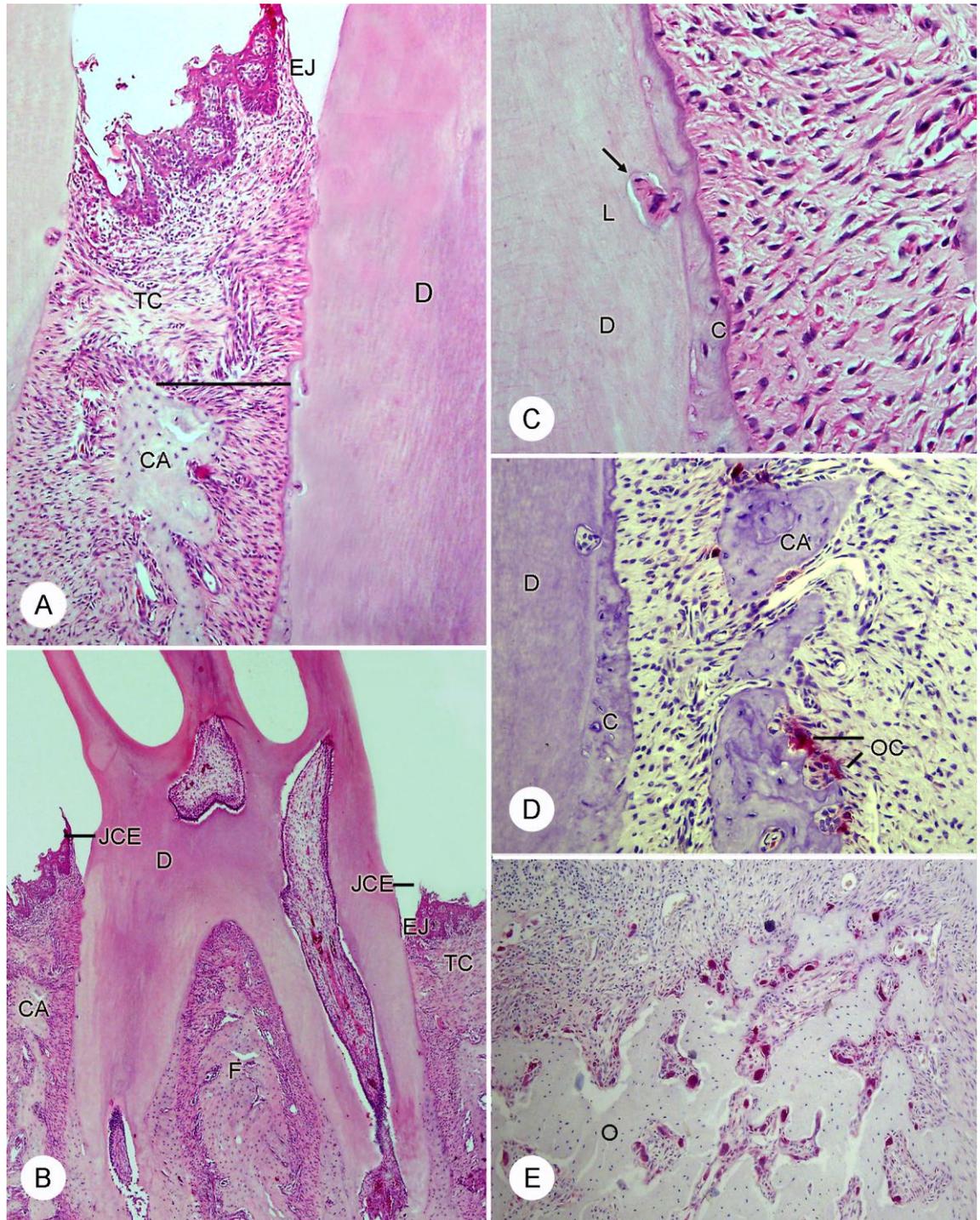


Figura 5.7 - Fotomicrografias do Grupo CON-L-21- Em A, papila interdentária com aspecto côncavo e epitélio juncional (EJ) terminando apicalmente à junção cimento esmalte (JCE). A crista alveolar com sinais de reabsorção. Em B observa-se, em menor aumento, o mesmo segundo molar de A, mostrando a crista alveolar (CA) distal, bastante reabsorvida e recoberta por espessa camada de tecido conjuntivo (TC). Em C, reabsorção de cimento (C) e dentina radicular (D). Em D e E, osteoclastos TRAP-positivos adjacentes a trabéculas ósseas, formando lacunas de Howship, na região de crista (em D), e do osso interradicular (em E). (Figura A e E, aumento original 100x. Figura B aumento original 40x. Figura C, aumento original 400x. Figura D aumento original 200x)

5.1.6 Grupo ALN-L-21

Neste tempo experimental, tanto o cimento como a dentina, assim como a crista alveolar, continuaram sem reabsorção (Figura 5.8 A). Uma camada ainda mais fina de epitélio e conjuntivo que no grupo de 14 dias, recobria a crista alveolar de alguns animais, enquanto outros tiveram pequena região de tecido ósseo exposto à cavidade oral, caracterizando necrose óssea (Figura 5.8 B). Quando essas áreas foram examinadas em aumentos maiores, pode ser constatada lacunas de osteócitos vazias na região mais coronária da crista de todos os animais (Figura 5.8 C). O método histoquímico do TRAP evidenciou células clásticas latentes afastadas, ou próximas, mas não aderidas às superfícies ósseas, bem como dos outros tecidos mineralizados, padrão semelhante ao encontrado nos grupos anteriores (Figura 5.8 D e E).

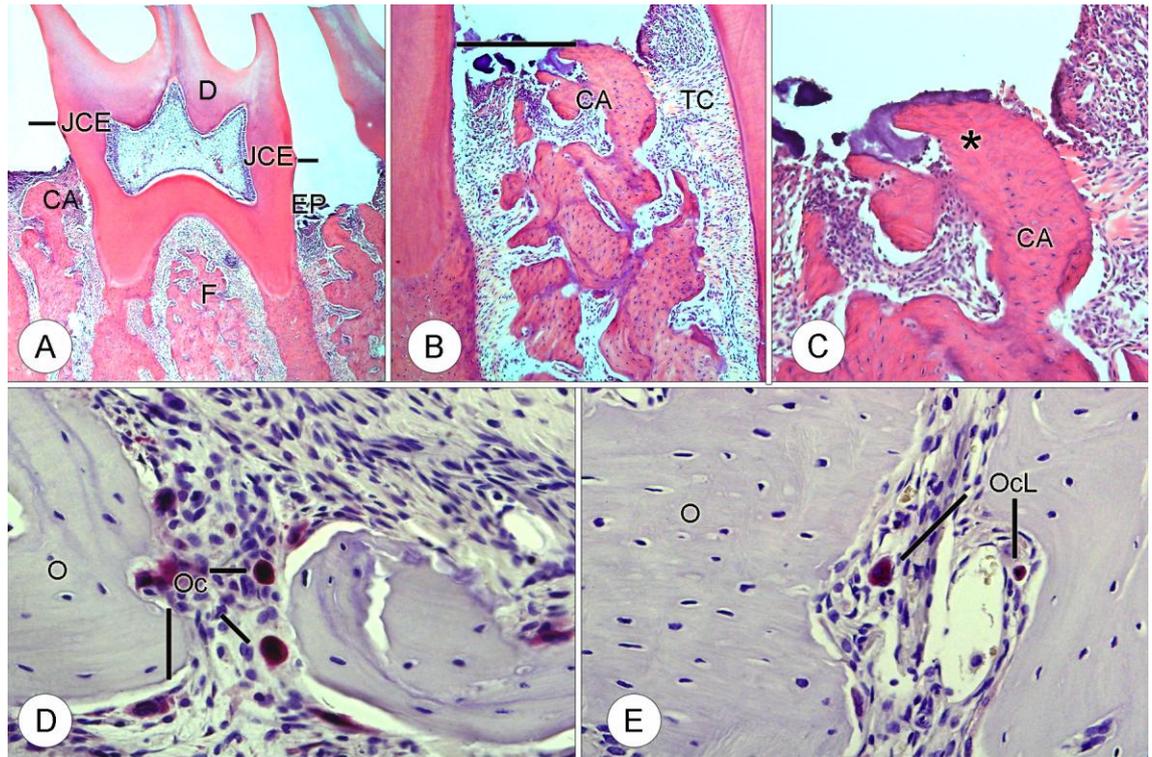


Figura 5.8 - Fotomicrografias do grupo ALN-L-21. Em A, segundo molar superior, com as papilas interdentárias com aspecto côncavo e o epitélio juncional (EJ) terminando apicalmente à junção cimento esmalte (JCE). Em B crista alveolar (CA), dentina (D) e cimento (C), sem sinais de reabsorção. Não há mais presença de tecido conjuntivo (TC) na superfície da crista, a qual encontra-se exposta ao meio bucal. Em C, em maior aumento, maiores detalhes da região da crista alveolar (CA), que encontra-se exposta à cavidade oral e outras cobertas por uma fina e delicada camada de epitélio. (*), região acelular. Em D e E, fotomicrografias de histoquímica TRAP, mostrando osteoclastos (OcL) multinucleados, com aspecto latente, próximos mas não aderidos à superfície óssea, da região de crista alveolar. (Figura A, aumento original 40x. Figura B aumento original 100x. Figura C, aumento original 400x. Figuras D e E, aumento original 400x)

5.1.7 Grupo CON-L-30

Com 30 dias após a indução da periodontite, a doença pareceu ter atingido um estágio crônico, apresentando características bem semelhantes aos espécimes do grupo CON-L-21. A crista alveolar sofreu muita reabsorção, assim como a raiz, onde foram frequentes as áreas de reabsorção do cimento (Figura 5.9 A e B). Com o método histoquímico para TRAP foi possível observar alguns osteoclastos aderidos às trabéculas ósseas e aos outros tecidos mineralizados, enquanto outros

apresentavam-se distantes dos tecidos mineralizados reabsorvidos, (Figura 5.9 C e D).

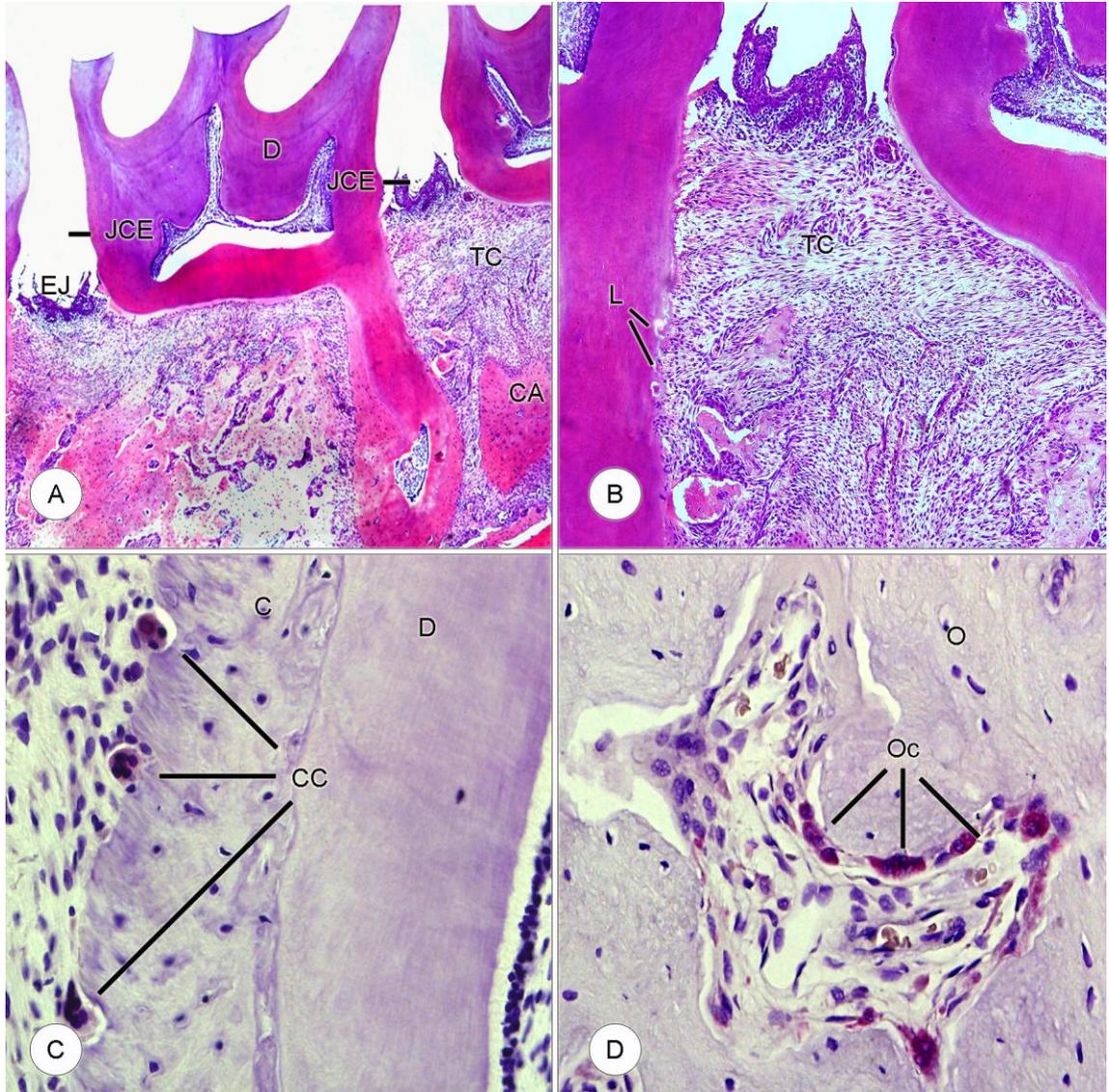


Figura 5.9 - Fotomicrografias do grupo CON-L-30. Em A é possível observar a crista alveolar (CA) localizada no terço médio da raiz, devido à severa reabsorção. Em B região de total reabsorção da crista, estando a região completamente preenchida por tecido conjuntivo (TC). A superfície radicular apresenta lacunas de reabsorção (L). Em C, células clásticas (CC) em atividade, reabsorvendo cimento celular. Em D osteoclastos em atividade, aderidos à superfície óssea (O). (Figura A, aumento original 40x. Figura B, aumento original 100x. Figuras C e D, aumento original 400x)

5.1.8 Grupo ALN-L-30

Este grupo também apresentou características muito semelhantes ao grupo ALN-L-21. Alguns animais apresentaram a crista óssea exposta, enquanto outros ainda apresentaram uma fina camada de epitélio recobrimdo a região (Figura 5.10 A e B). O número de lacunas de osteócitos vazias aumentou, caracterizando necrose óssea (Figura 5.10 C). Os osteoclastos latentes foram evidenciados na técnica histoquímica TRAP, adjacentes tanto às superfícies radiculares como às trabéculas ósseas (Figura 5.10 C).

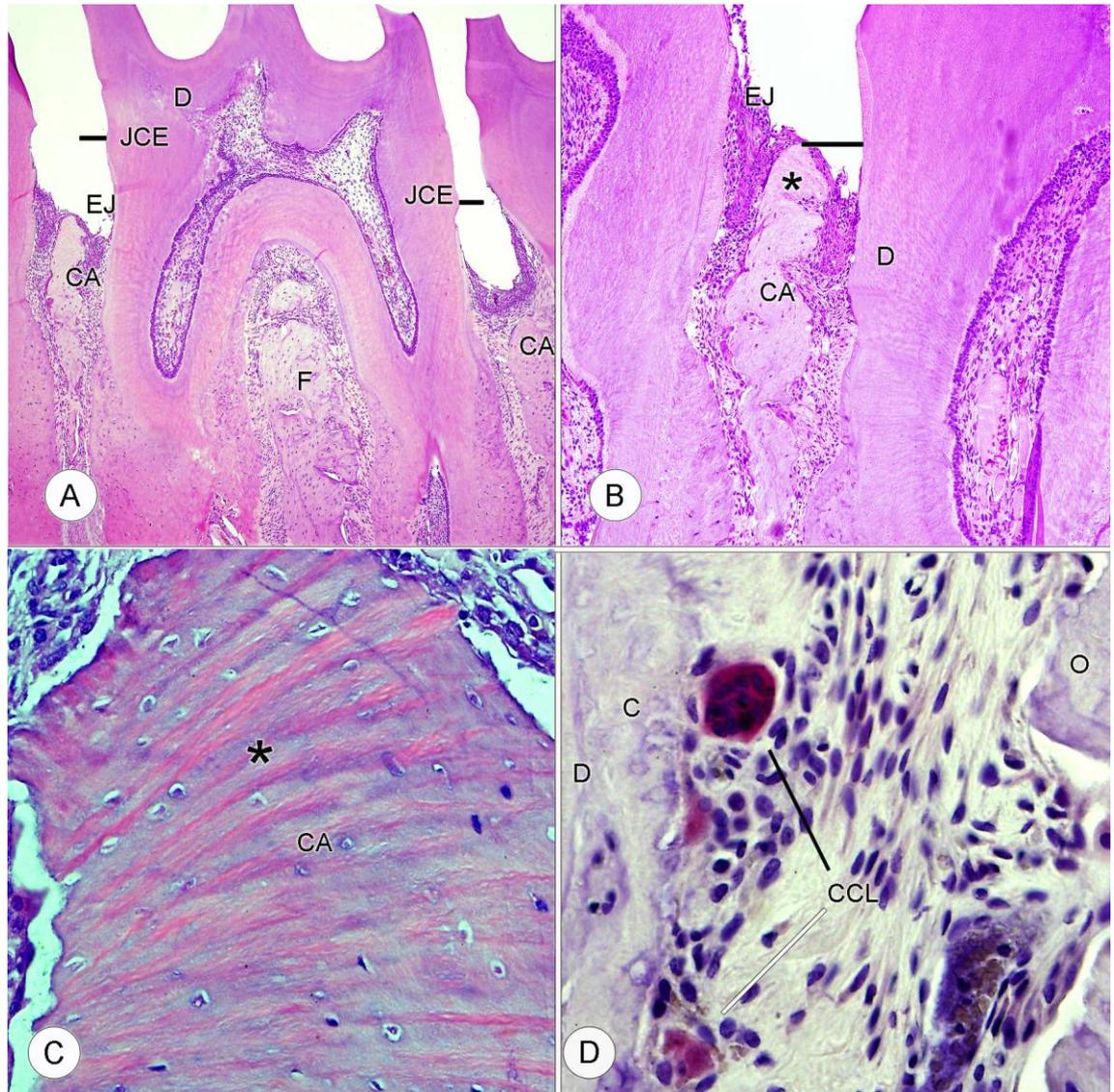


Figura 5.10 - Fotomicrografias do grupo ALN-L-30. Em A segundo molar superior com epitélio juncional (EJ) terminando apicalmente à junção cimento esmalte (JCE). Em B é possível observar, em maior aumento, detalhe da crista alveolar (CA) que encontra-se recoberta apenas por uma fina camada de epitélio. Em C, detalhes da crista alveolar, onde é possível observar região apical acelular com presença de lacunas de osteocitos preenchidas apenas por restos celulares (*). Em D células clásticas (CCL) TRAP-positivas próximas à superfície do cimento (C), porém em estado latente. D, dentina; O, osso. (Figura A, aumento original 40 x. Figura B, aumento original 100x. Figuras C e D, aumento original 400x)

5.2 Análise histomorfométrica

5.2.1 Análise do nível da crista alveolar mesial.

As distâncias da JCE à crista mesial dos segundos molares superiores não foram estatisticamente significantes quando comparadas no grupo ALN-L, nos diferentes tempos. Já quando comparadas no grupo CON-L, essas distâncias apresentaram diferença estatística entre o período de 7 e 30 dias. Na comparação entre os grupos CON-L e ALN-L, foram estatisticamente significantes em todos os tempos.

Tabela 5.1 - Médias das distancias do limites cimento-esmalte do segundo molar superior à crista alveolar mesial. Os números diferentes sobrescritos nas colunas indicam que houve diferença estatística no mesmo grupo nos diferentes tempos. As letras diferentes significam que houve diferença estatística entre os diferentes grupos no mesmo tempo

Colunas1	Colunas2	Colunas3
	CON-L	ALN-L
Dias	Média	Média
7	618,11 ^{1 a}	412,52 ^b
14	696,74 ^a	412,49 ^b
21	844,23 ^a	369,33 ^b
30	885,57 ^{2 a}	410,14 ^b

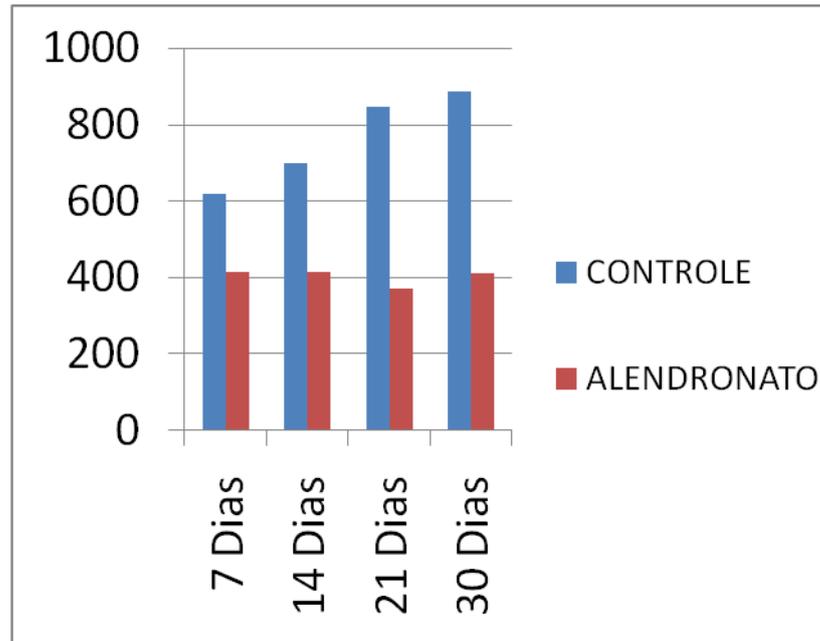


Gráfico 5.1 - Distância do limite cemento-esmalte dos segundos molares superiores até a crista alveolar mesial em micrômetros (μm). (7 dias $p=0,0077$; 14 dias $p=0,0001$; 21 dias $p=0,0001$; 30 dias $p=0,0029$)

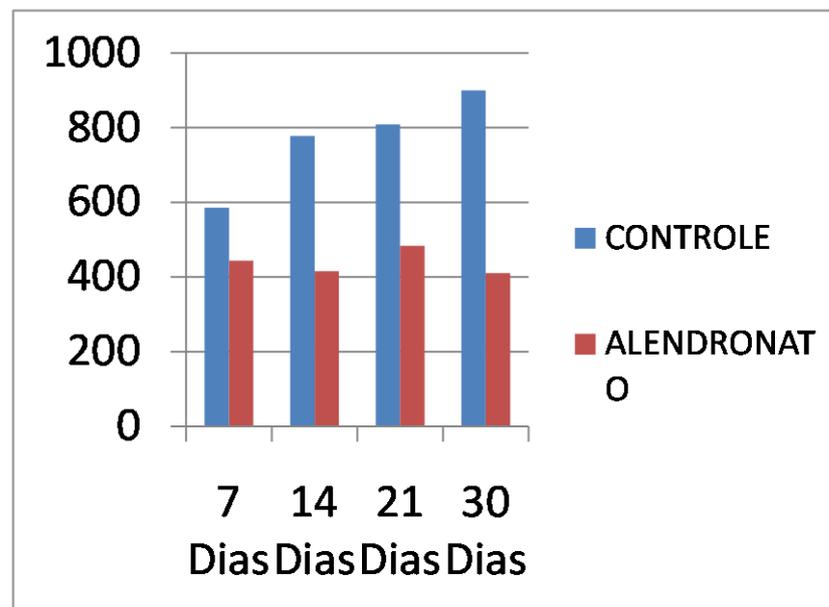
5.2.2 Análise do nível da crista alveolar distal

As distâncias da JCE à crista distal dos segundos molares superiores, não foram estatisticamente significantes quando comparadas no grupo ALN-L, nos diferentes tempos. Já quando compradas no grupo CON-L, apresentaram diferença estatística entre os períodos de 7 e 21 dias e entre os períodos de 7 e 30 dias. Na comparação entre os grupos, CON-L e ALN-L foram estatisticamente significantes em todos os tempos.

Tabela 5.2 - Médias das distancias do limites cimento-esmalte do segundo molar superior à crista alveolar distal. Os números diferentes sobrescritos nas colunas indicam que houve diferença estatística no mesmo grupo nos diferentes tempos. As letras diferentes significam que houve diferença estatística entre os diferentes grupos no mesmo tempo

Colunas1	Colunas2	Colunas3
	CON-L	ALN-L
Dias	Média	Média
7	585,58 ^{1 a}	443,71 ^b
14	777,51 ^a	415,62 ^b
21	808,25 ^{3 a}	484,02 ^b
30	900,33 ^{2 a}	454,73 ^b

Gráfico 5.1- Distância do limite cimento-esmalte dos segundos molares superiores até a crista alveolar distal em micrômetros (μm). (7 dias $p=0,0189$; 14 dias $p=0,0075$; 21 dias $p=0,0126$; 30 dias $p=0,0003$)



5.3 Imuno-histoquímica para RANKL e OPG

A expressão das proteínas RANKL e OPG foi evidenciada pela coloração acastanhada e avaliada seguindo o padrão de distribuição nos diferentes grupos experimentais.

A expressão da proteína RANKL nos grupos CON-SL e ALN-SL, mostrou-se similar em todos os tempos, por isso será aqui representada apenas pelo grupo de 7 dias. O tecido epitelial exibiu algumas células imunomarcadas com cor mais intensa que as células do tecido conjuntivo periodontal (Figura 5.11). Já os grupos CON-L e ALN-L, exibiram uma marcação muito mais intensa na região de ligamento periodontal, nas células no tecido epitelial e nos odontoblastos. A marcação pareceu progredir em direção apical nos tempos mais avançados. Nos animais tratados com ALN a marcação se mostrou homogênea no tecido conjuntivo frouxo; já nos animais CON-L, a expressão foi mais intensa nas regiões adjacentes às lacunas de reabsorção, tanto do tecido ósseo quando de cimento e dentina (Figura 5.12).

A expressão de OPG, nos grupos CON-SL e ALN-SL, também apresentou-se similar em todos os tempos, portanto também será representada pelo grupo de 7 dias. Células do tecido epitelial também foram imunomarcadas, bem como células do tecido conjuntivo (Figura 5.13). O grupo CON-L-7 apresentou marcação no tecido epitelial, no tecido conjuntivo, nos osteócitos e canalículos da crista alveolar (Figura 5.14-B). Com 14, 21 e 30 dias, a reabsorção prosseguiu de forma intensa, e a marcação para OPG apresentou-se menos intensa, com apenas alguns osteócitos marcados, porém esses não se encontraram apenas na crista, mas em todo o processo alveolar (Figuras 5.14-D, F, G). Já os espécimes do grupo ALN-L apresentaram marcação mais forte, principalmente na região das lacunas de Howship, e nos osteócitos. A marcação pareceu progredir levemente com o tempo, e estabilizar no período de 21 dias (Figuras 5.14-A, C, E, G).

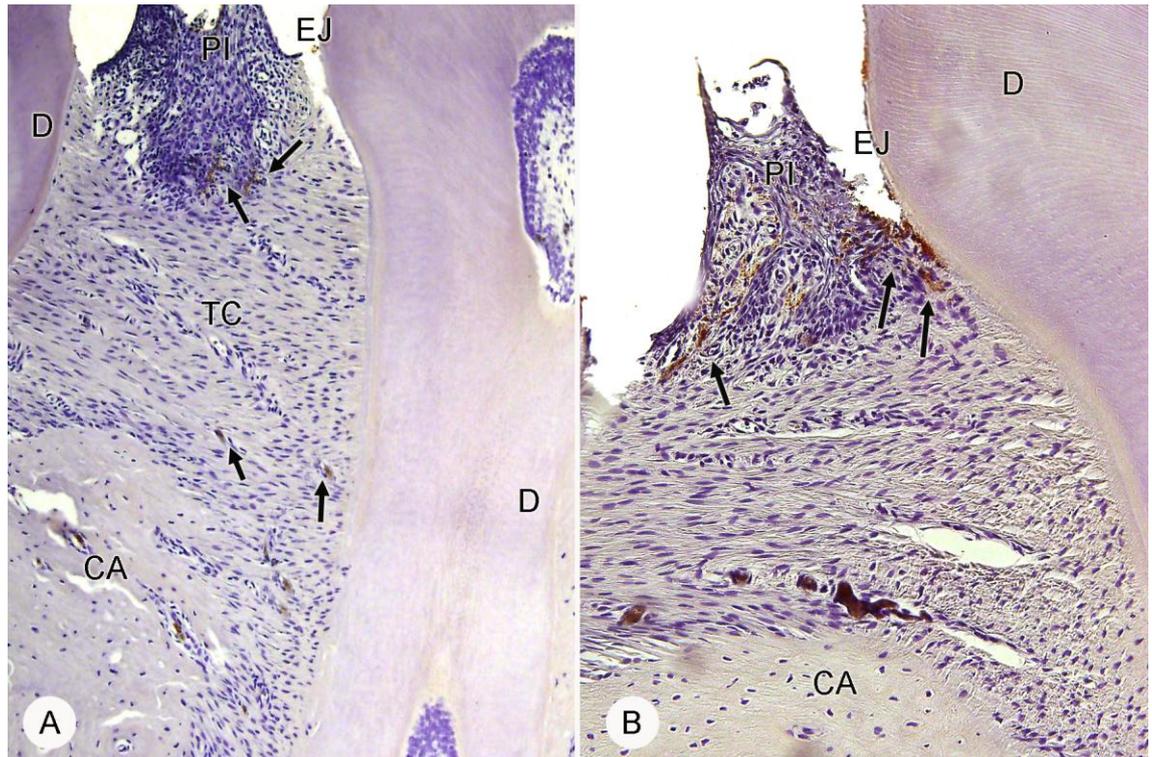
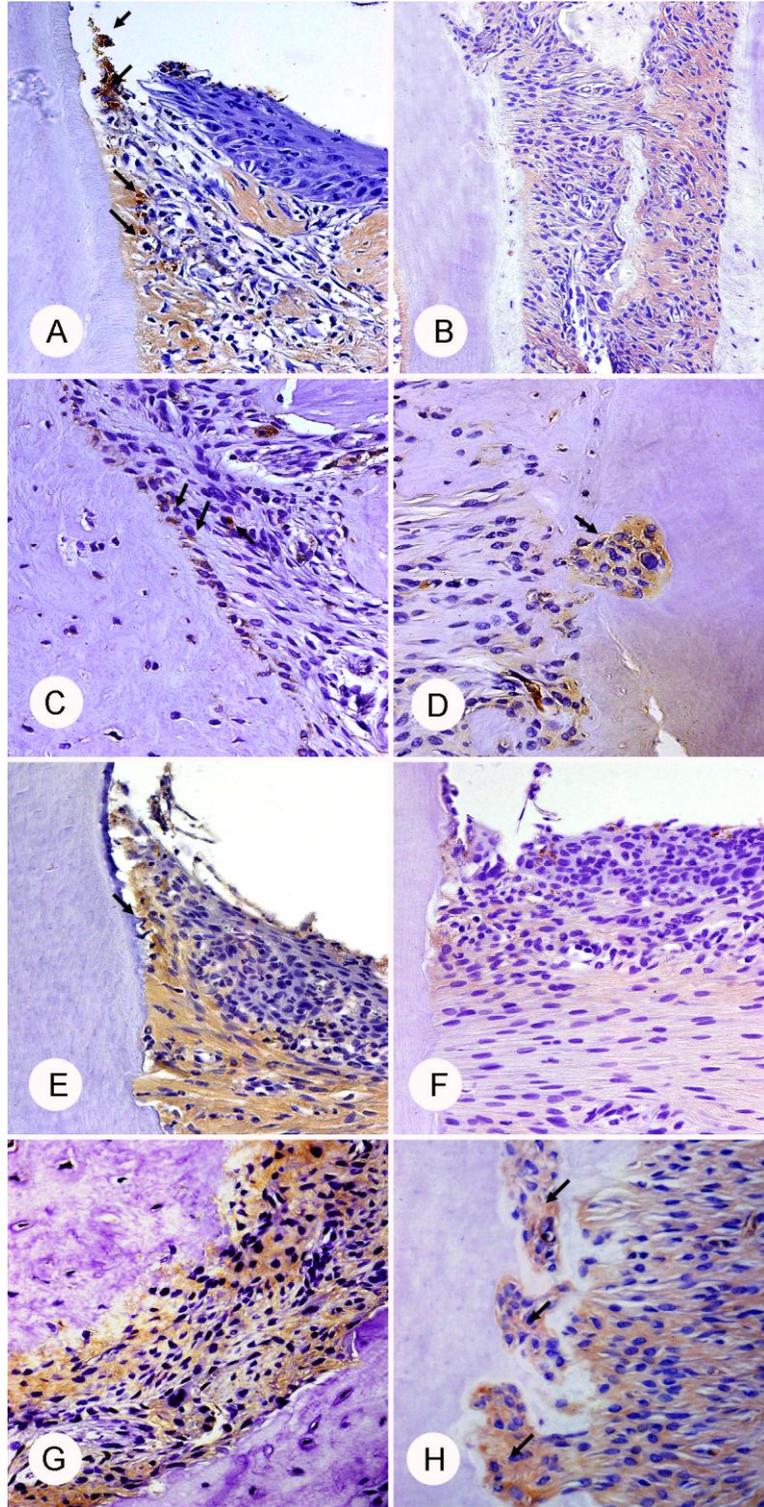


Figura 5.11 - Imunomarcção para RANKL. Em A, espécime do grupo ALN-S-7, mostrando leve marcação em células do tecido epitelial e conjuntivo (setas). Em B, espécime do grupo CON-S-7, mostrando marcação em células do tecido conjuntivo e epitelial (setas). D, dentina; CA, crista alveolar; TC, tecido conjuntivo; PI, papila interdentária; EJ, epitélio juncional. (Figuras A e B, aumento original 200x)

Figura 5.12 - Imunomarcção para RANKL. Em A, espécime do grupo ALN-L-7, mostrando a região de mucosa gengival da gengiva interdentária. Notar células imuno positivas presentes na região epitelial (setas). Em B, espécime do grupo CON-L-7, mostrando região da crista alveolar (CA), e tecido conjuntivo (TC) marcado uniformemente. Em C, grupo ALN-L-14, mostrando marcação específica em cementoblastos (setas) ao longo do cimento (C). Em C, grupo CON-L-14, mostrando marcação na região de reabsorção de dentina (D). (setas). Em D, espécime do grupo ALN-L-21, mostrando a região de mucosa gengival da gengiva interdentária, com células epiteliais e do tecido conjuntivo (TC) marcadas. Em E, espécime do grupo CON-L-21, região de mucosa gengival da gengiva interdentária, mostrando marcação mais leve. Em G, espécime do grupo ALN-L-30, mostrando região de ápice, marcação em cementoblastos e células do tecido conjuntivo (TC). Em H, espécime do grupo CON-L-30, região apical da raiz do segundo molar superior direito, com marcação na região de reabsorção (setas); D, dentina. (Figuras A, C, E, F, G e H, aumento original 200x. Figura B, aumento original 100x. Figura D, aumento original 400x)



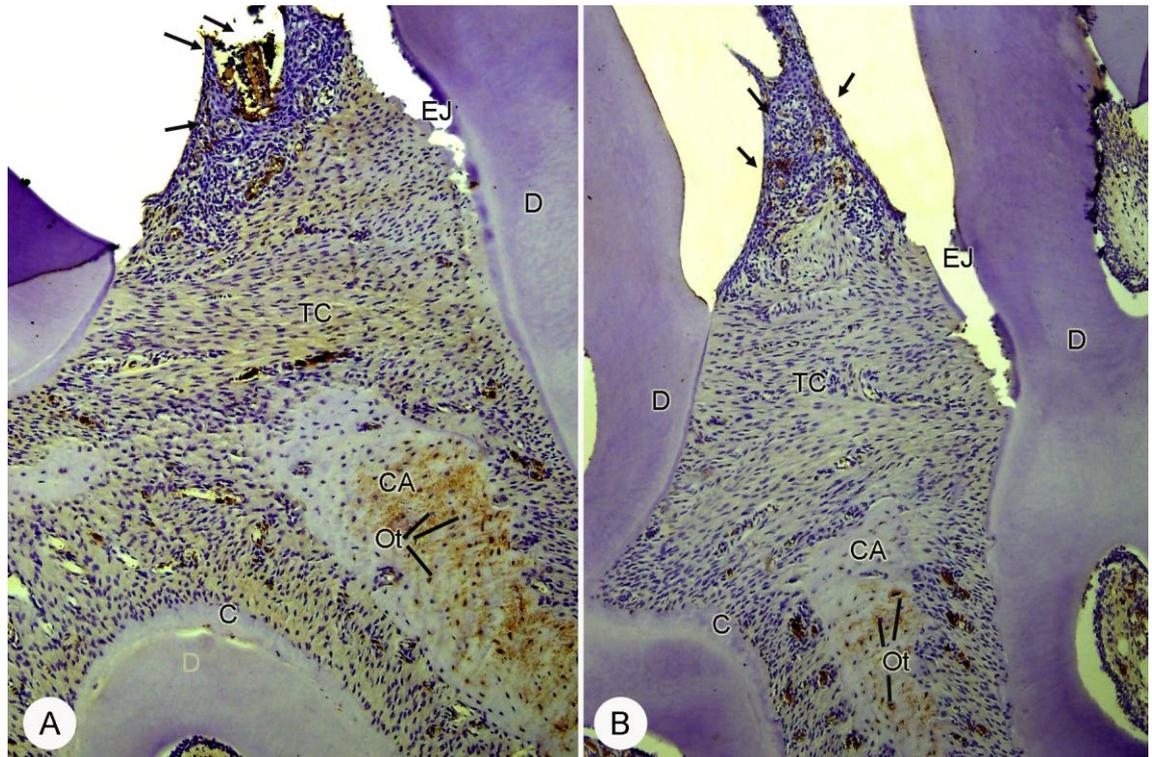
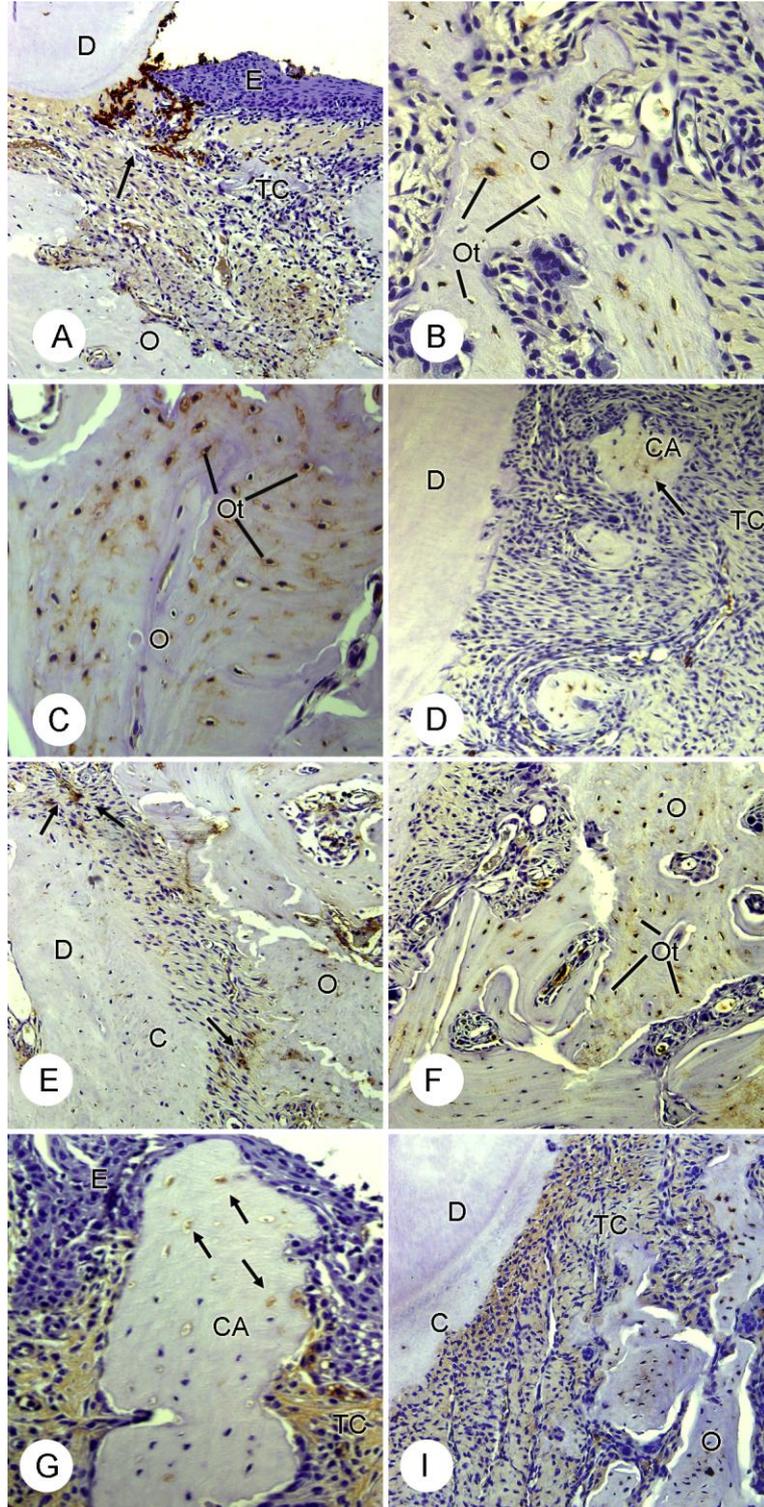


Figura 5.13 - Imunomarcção para OPG. Em A, espécime do grupo ALN-S-7, mostrando marcação em células do tecido epitelial (setas), tecido conjuntivo, osteócitos e canalículos na região da crista alveolar. Em B, grupo CON-S-7, mostrando marcação menos intensa nas células epiteliais (setas), tecido conjuntivo, osteócitos e canalículos da região cervical da crista alveolar. D, dentina; C, cimento; TC, tecido conjuntivo; CA, crista alveolar; EJ, epitélio juncional; Ot, osteócitos. (Figura A, aumento original 200x. Figura B, aumento original 100x)

Figura 5.14 - Imunomarcção para OPG. Em A, espécime do grupo ALN-L-7, mostrando a região de mucosa gengival da papila interdentária. Notar células imuno positivas presentes na região epitelial (seta) e no tecido conjuntivo (TC). Em B, espécime do grupo CON-L-7, mostrando região da crista alveolar (CA) com marcação nos osteócitos (Ot). Em C, grupo ALN-L-14, mostrando marcação em osteócitos (Ot), na região de crista alveolar (setas). Em D, grupo CON-L-14, mostrando marcação na região de crista alveolar com grande reabsorção. Observar que apenas alguns osteócitos estão marcados. Em E, espécime do grupo ALN-L-21, mostrando a região da crista alveolar, com marcação em células do tecido conjuntivo (TC) da mucosa da papila interdentária e nos osteócitos e canalículos. Em F, espécime do grupo CON-L-21, região de osso cortical, com marcação em osteócitos e canalículos. Em G, espécime do grupo ALN-L-30, mostrando região de cervical da crista alveolar (CA) e intensa marcação em tecido conjuntivo, osteócitos, e no interior de algumas lacunas (setas). Em H, espécime do grupo CON-L-30, região apical da raiz do segundo molar superior direito e crista alveolar, com marcação mais leve na região de tecido conjuntivo (TC) e osteócitos. D, dentina; C, cimento; O, osso. (Figuras A, D, E, F, H, aumento original 200x. Figuras B, C e G, aumento original 400x)



5.4 Análise Ultraestrutural

Os espécimes destinados para análise em microscopia eletrônica de transmissão foram previamente analisado em microscopia óptica e escolhidos de acordo com as áreas que se fazia necessária uma análise em maior aumento para melhor entendimento dos tecidos.

5.4.1 Grupo CON-L

Nos animais controle de todos os tempos, notou-se a presença de áreas com numerosas bactérias, localizadas na superfície do cimento e na mucosa (Figura 5.15-D). Nos tempos mais avançados (CON-L 21 e CON-L-30), foi possível observar a presença dessas bactérias no interior de vasos sanguíneos, juntamente com hemácias (Figura 5.15-C). Notou-se também intenso processo inflamatório na mucosa gengival, com presença de neutrófilos e macrófagos (Figura 5.16-A). No processo alveolar notou-se progressiva reabsorção de acordo com o tempo, lacunas de reabsorção em cimento, dentina e osso com células clásticas aderidas (Figura 5.17-C e D). Em análise cuidadosa dessas células notou-se a presença de zonas de adesão, borda em escova bem desenvolvidas e núcleos na região basal, bem como o citoplasma contendo muitas vesículas e vacúolos (Figura 5.17-C e D). No osso alveolar, os osteócitos, mesmo que na parte mais cervical, não apresentara alteração no aspecto morfológico (Figura 5.18-A).

5.4.2 Grupo ALN-L

Nos animais tratados de todos os tempos foi possível observar presença de grandes áreas de bactérias (Figura 5.15-B) e infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos e macrófagos (Figura 5.16-A). Porém, o osso não encontrou-se com grandes reabsorções, e as células clásticas apresentaram aspecto latente, encontrando-se, em sua maioria, distantes das superfícies mineralizadas. Mesmo as células clásticas mais próximas aos tecidos mineralizados, não apresentaram zona de selamento nem borda em escova (Figura 5.17-A), apresentando forma arredondada, núcleos dispersos e citoplasma com poucas organelas e poucos vacúolos. Desde o tempo inicial, de 7 dias, detectaram-se lacunas de osteócitos vazias (Figura 5.18-B), que foram se tornando cada vez mais freqüentes nos tempos avançados, caracterizando sinal de necrose óssea.

5.4.3 CON-SL e ALN-SL

Os animais desses grupos apresentaram aspecto ultra estrutural de normalidade. O grupo ALN-SL apresentou os osteoclastos com aspecto latente.

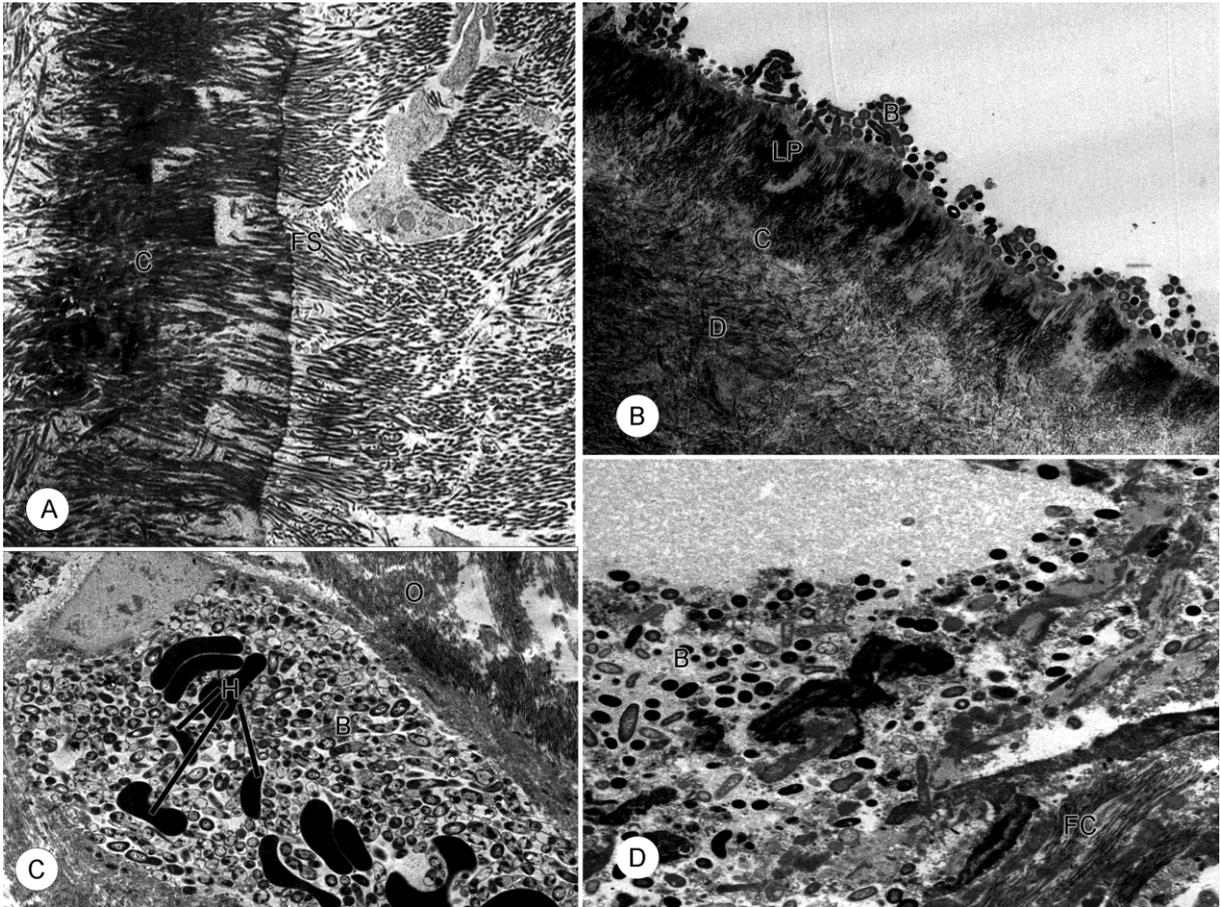


Figura 5.15 - Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando, em A, espécime do grupo CON-SL-7, onde se observa estrutura periodontal do animal, com aspecto de normalidade, sem presença de inflamação. C, cimento; FS, fibras de Sharpey. Em B, espécime do grupo ALN-L-14, região de dentina (D), recoberta de cimento (C), ligamento periodontal (LP), e bactérias (B) em toda a superfície. Em C, vaso sanguíneo preenchido de bactérias, no espécime do grupo ALN-L-21. H, hemácias. Em D, grupo CON-L-14, onde observa-se bactérias (B) na região de ligamento periodontal. FC, fibrilas colágenas. (Figura A, aumento original 7.500x. Figuras B e C, aumento original 4.000x. Figura D, aumento original 5.000x)

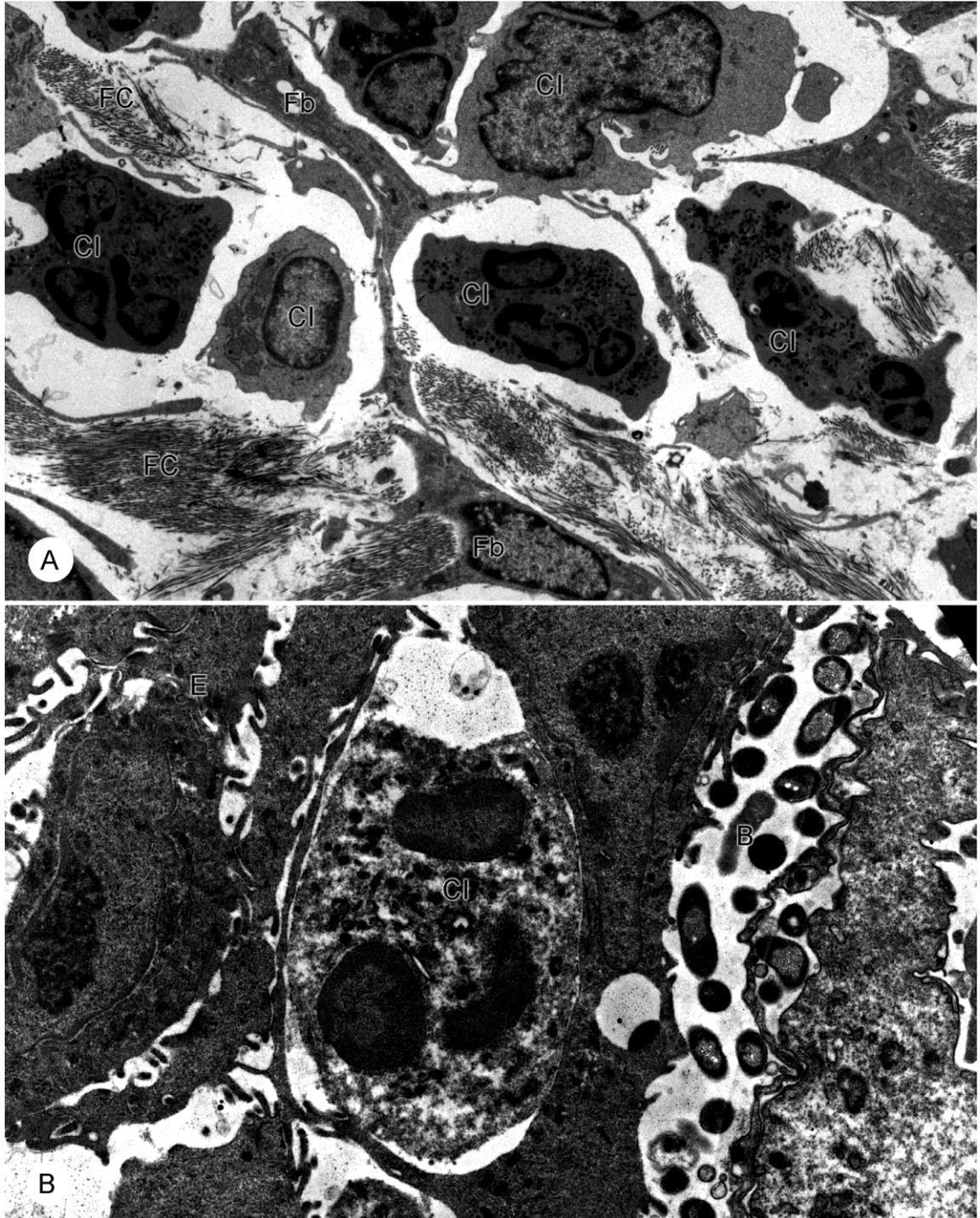


Figura 5.16 - Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando infiltrado inflamatório. Em A, espécime do grupo CON-L-21, células inflamatórias (CI), espalhadas pelo tecido conjuntivo, entre fibrilas colágenas (FC), e fibroblastos (Fb). Em B, espécime do grupo ALN-L-21, mostrando célula inflamatória (CI) infiltrada no tecido epitelial (E), e presença de bactérias (B). (Figura A, aumento original 6.000x. Figura B, aumento original 8.000x)

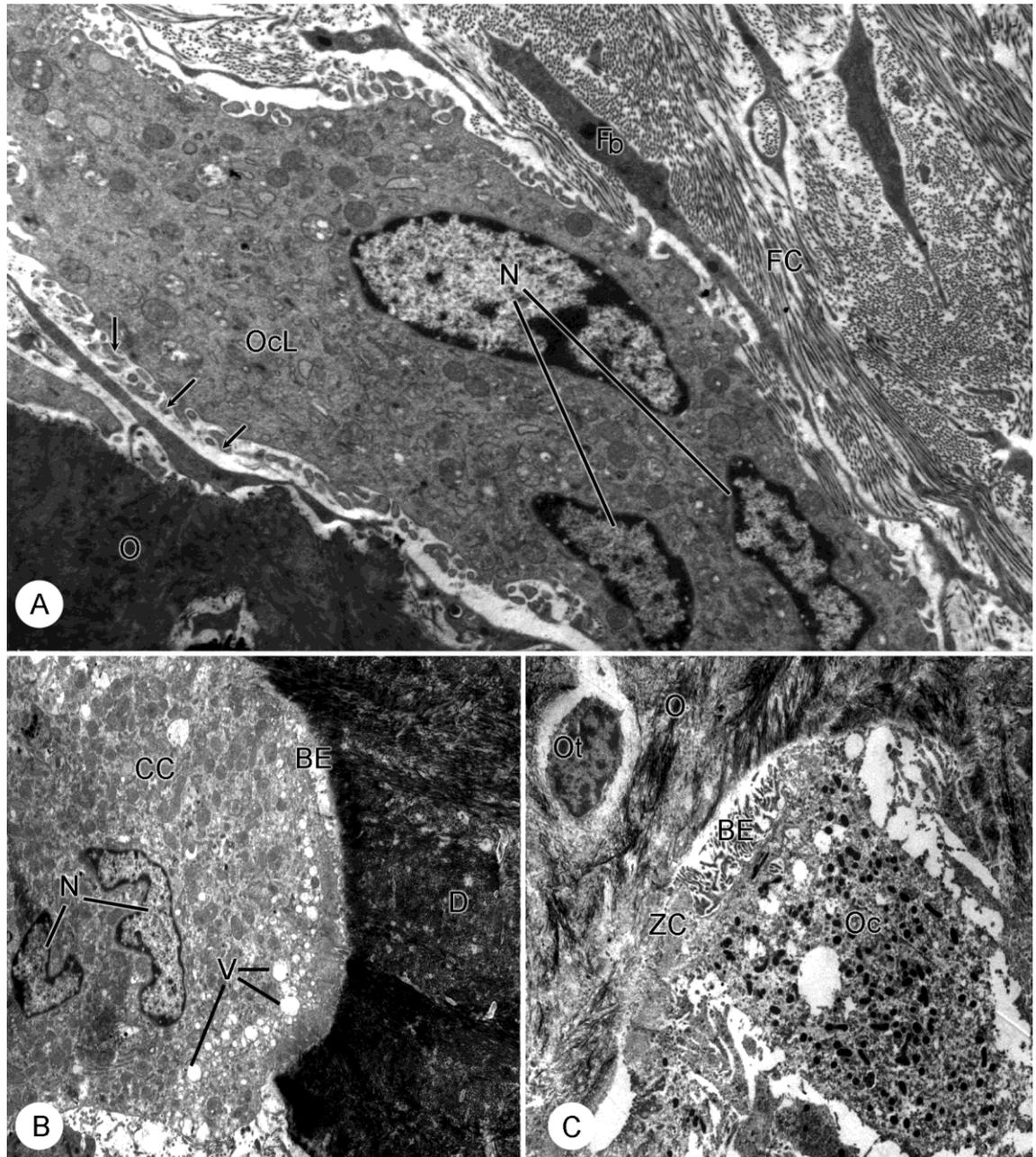


Figura 5.17 - Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando em A, espécime do grupo ALN-L-14, onde observa-se um osteoclasto latente (OcL), com três núcleos, sem formação de borda em escova, distante da superfície óssea (O). Entre o osteoclasto e o osso é possível observar parte de uma célula (setas). Fb, fibroblastos; FC, fibrilas colágenas. Em B, espécime do grupo ALN-L-21, se observa célula clástica (CC), aderida à dentina (D), contendo dois núcleos (N), vacúolos (V) e borda em escova (BE). Em C, osteoclasto (Oc), aderido à superfície óssea (O). Pode-se observar presença de borda em escova bem desenvolvida (BE), zona clara (ZC), aderida à superfície. Ot, osteócito. (Figura A, aumento original 8.000x. Figura B, aumento original 12.000x. Figura C, aumento original 4.000x)

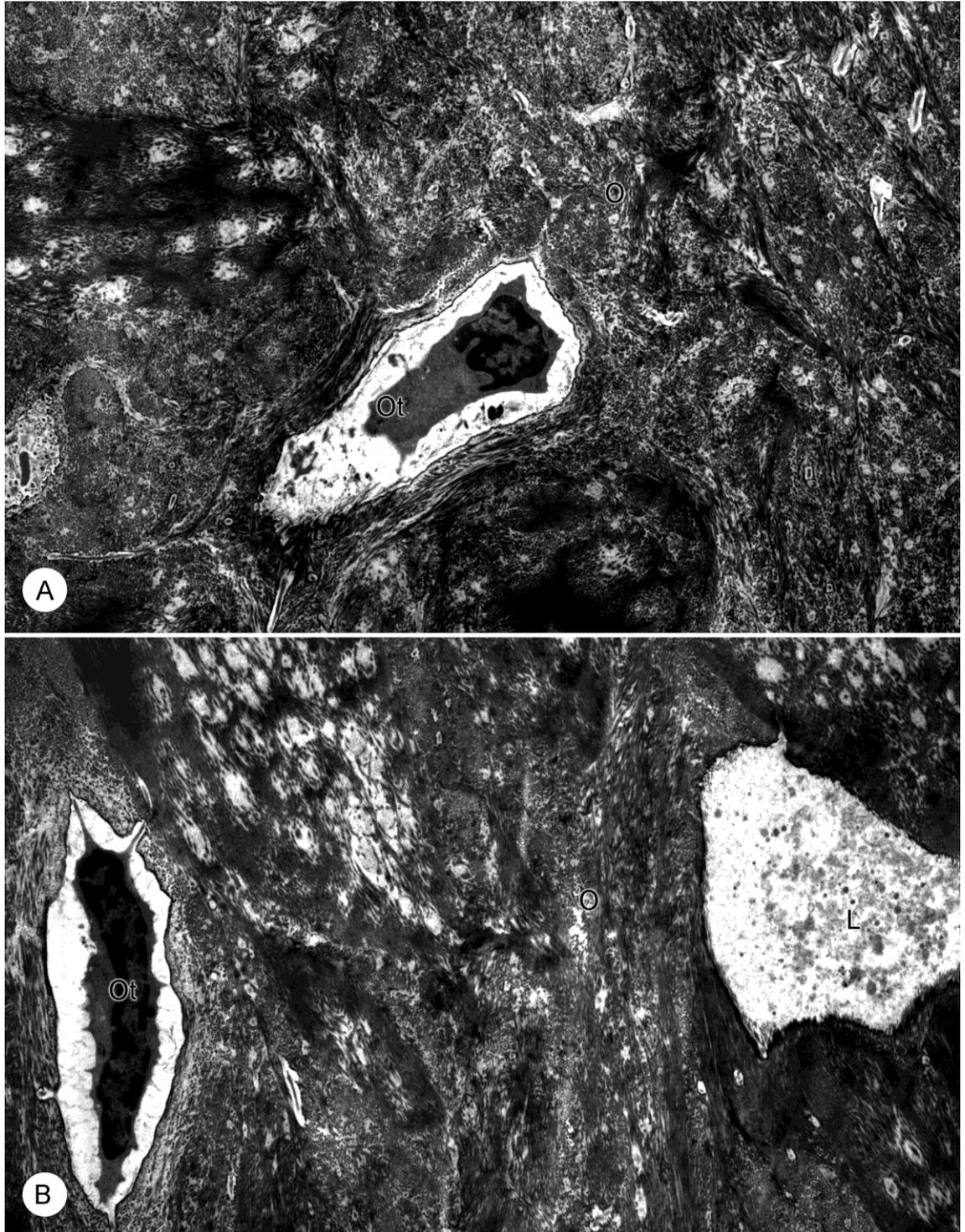


Figura 5.18 - Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando em A, espécime do grupo CON-L-21, onde observa-se osteócito (Ot), dentro da lacuna, com citoplasma amplo, apresentando estado de vitalidade. Em B, espécime do grupo ALN-L-14, observa-se osteócito (Ot) em degeneração, e ao lado lacuna (L) de osteócito preenchida apenas por restos celulares. O, osso. (Figuras A e B aumento original, 8.000x)

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram que o alendronato (ALN) interfere na reabsorção óssea da doença periodontal, reação ocasionada pela inativação das células clásticas. O ALN, apesar de impedir que essas células fossem ativadas, não interferiu no recrutamento dos precursores e sua fusão. A droga também não ocasionou diminuição ou alteração no processo inflamatório, o que pode ter influenciado para o aparecimento de áreas de leve necrose na crista óssea, nos tempos mais avançados da doença periodontal.

Estudos experimentais para melhor elucidação da doença periodontal vêm sendo realizados utilizando diversos modelos animais, em sua maioria em ratos, por ser um animal de fácil procriação, manejo, e com semelhanças, nos seus molares, às estruturas dentoperiodontais em humanos. Alguns trabalhos propõem a alteração na dieta dos animais, a base de sacarose, gerando a reabsorção generalizada do osso alveolar (Aguirre et al., 2012). Outros modelos utilizam a inserção de fio de sutura no sulco gengival do primeiro molar superior (Aghaloo et al., 2011). Considerando que a doença periodontal em humanos tem como fator etiológico principal o biofilme e não apenas a alimentação do indivíduo, no presente trabalho foi utilizado a inserção do fio de sutura no segundo molar superior, com o intuito de avaliar as duas cristas alveolares, o que não ocorreria no primeiro molar superior, que no rato apresenta um diastema na sua face mesial, aproximando as semelhanças com a doença periodontal em humanos, além de melhorar a estabilização do fio.

A maior parte das pesquisas realizadas com o intuito de interferir na atividade reabsortiva das células clásticas utilizaram bisfosfonatos com maior potência que o ALN, como o ácido zoledrônico. A maioria dos relatos de casos clínicos também são com o uso dessa droga, devido a sua alta potência. Porém, no presente estudo foi administrado o ALN por ser o bisfosfonato mais utilizado atualmente no tratamento de diversas doenças ósseas.

É difícil transportar a dose e tempo de administração da droga em humanos para animais, pois o metabolismo e absorção das drogas são diferentes. Além disso,

os eventos biológicos que ocorrem na cavidade oral dos animais também diferem dos que ocorrem nas estruturas e tecidos correspondentes em humanos. Várias doses e tempos são sugeridos em outros estudos (Duarte et al., 2004; Aghaloo et al., 2011; Aguirre et al., 2012). Neste estudo foi utilizada uma dose padronizada por Massa et al. (2006) para o estudo de germes dentários e depois utilizada por Bradaschia-Correa et al. (2007) para analisar o efeito do ALN no osso alveolar. Posteriormente, Yamamoto-Silva et al. (2013) administraram a mesma dose em ratos adultos, como no presente trabalho, para avaliar a reparação alveolar após extração. Em todos esses trabalhos foram constatados efeitos no osso, principalmente a inibição da atividade osteoclástica.

No presente estudo não foi desenvolvido outra deficiência além da doença periodontal, como a falta de estrogênio. Apesar dos bisfosfonatos serem muito utilizados para o tratamento de mulheres com osteoporose, essa doença também acomete homens; além disso, a droga também é usada para outras patologias. Inicialmente, estudos foram publicados relacionando a doença periodontal, deficiência de estrogênio e o uso do alendronato, concluindo que apenas este bisfosfonato, e não a reposição de estrogênio, reduziu os efeitos da doença periodontal, diminuindo a perda alveolar (Duarte et al., 2004).

Como esperado, o alendronato inibiu a reabsorção, tanto do processo alveolar quanto dos outros tecidos mineralizados envolvidos, dentina e cimento. Os espécimes que não receberam a droga tiveram quase que total reabsorção do processo alveolar no grupo de 30 dias, além da reabsorção de cimento e dentina, deixando a superfície da raiz irregular, inclusive no terço cervical. A reabsorção de cimento na região cervical, não é frequente, pois essa área é em grande parte protegida por fibras colágenas inseridas nesse tecido mineralizado (cimento acelular de fibras extrínsecas), além da ausência de cementóide. Devido a isso, o cimento cervical é raramente reabsorvido, mesmo em modelos de movimentação ortodôntica (Graber et al., 2012). Na doença periodontal, essas fibras são destruídas pelo processo inflamatório, expondo regiões de matriz mineralizada do cimento às células, entre elas às células clásticas. Rothbart et al. (2014), descreveram reabsorção de cimento e dentina após luxação do segundo molar superior de ratos. A luxação provoca rompimento das fibras extrínsecas, expondo a matriz do cimento, assim como na doença periodontal. Sato et al. (2013), observaram a

reabsorção radicular externa cervical, após retalho de Widman, para raspagem subgingival. Nesse procedimento também ocorre rompimento das fibras extrínsecas, o que pode ser também um fator responsável a reabsorção radicular.

O grau de reabsorção da crista óssea foi confirmado, com análise histomorfométrica, utilizando à distância da JCE à borda da crista alveolar nos diferentes grupos. A análise estatística revelou diferença significativa na comparação entre os grupos em todos os tempos experimentais. O lado esquerdo da maxila do rato foi usado como controle para análise do efeito do alendronato, sem a presença da doença periodontal. Nestes animais não houve alterações morfológicas nos tecidos periodontais, nos tempos observados. Entretanto, os osteoclastos que fazem a homeostase óssea, apresentaram estado de latência. Em um estudo anterior Samantaria et al. (2010), administraram o alendronato sódico em ratos, sem indução da periodontite e também observaram que não houve nenhuma alteração morfológica nos tecidos periodontais, nem diminuição da densidade óssea, apesar de não terem avaliado a presença de células clásticas, nem seu estado funcional.

Apesar da preservação dos tecidos mineralizados, foi possível observar a presença de bactérias e infiltrado inflamatório nos animais tratados com ALN, em todos os tempos. Esses achados sugerem que o ALN, atua diretamente nos tecidos mineralizados, sem interferir no infiltrado inflamatório e colônias de bactérias. Um estudo desenvolvido por Goes et al. (2012), utilizando o mesmo modelo para indução da doença periodontal, relatou a redução de infiltrado inflamatório nos animais tratados com alendronato, sugerindo que a droga reduz a reabsorção dos tecidos mineralizados, atuando nos clastos e diminuindo o infiltrado inflamatório.

Um achado interessante foi revelado pela análise ultra estrutural. As bactérias também foram vistas nos cortes de gengiva examinados com a microscopia eletrônica de transmissão, dentro de vasos sanguíneos, aparecendo junto com as hemácias. Às bactérias relacionadas com a doença periodontal, já foram vinculadas a doenças sistêmicas por diversas vezes (Lindhe, et al 2010). Porém ainda não foi totalmente elucidado. Estudos recentes, com o objetivo de avaliar a associação de microorganismos com doenças sistêmicas, ainda vem sendo publicados. Ramírez et al. (2014), desenvolveram um estudo com pacientes, com e sem periodontite, e avaliaram microbiota e biomarcadores plasmáticos da doença cardiovascular em

ambos os grupos. Concluíram que a periodontite está associada às inflamações sistêmicas, e poderia aumentar o risco de doenças cardiovasculares. Esse risco pode ser vinculado à maior permeabilidade dos vasos sanguíneos e capilares, onde a presença de bactérias no interior facilitaria a proliferação de bactérias na corrente sanguínea, levando a doenças sistêmicas. A presença de bactérias no interior de vasos sanguíneos foi observada em todos os grupos nos quais a periodontite foi induzida, com ou sem tratamento com ALN.

A reabsorção dos tecidos mineralizados é induzida pelo RANKL, molécula chave para diferenciação e fusão dos clastos (Chen et al., 2014). Neste modelo a expressão de RANKL não foi diminuída com o uso, da droga, porém sua distribuição se mostrou diferente. No grupo ALN, a marcação apresentou-se uniforme no tecido conjuntivo e no epitélio, já no grupo CON-L apresentou-se mais intensa nas áreas de reabsorção. Um estudo utilizando hibridização *in situ*, encontrou a expressão de RANKL em locais com abundantes células inflamatórias, linfócitos e macrófagos (Liu et al., 2003). Na microscopia eletrônica de transmissão essas mesmas células inflamatórias foram observadas no epitélio, o que pode justificar a presença de intensa imunomarcagem nessa região.

A imunomarcagem para RANKL foi menos intensa na região cervical da crista alveolar nos tempos mais longos, sugerindo que essa expressão tenha sido menor, pois o osso alveolar da região já tinha sido quase totalmente reabsorvido no grupo controle e a doença progredia em direção ao ápice, em ambos os grupos. Foi anteriormente relatado que o nível de RANKL mRNA, é maior na periodontite avançada comparada com a moderada (Wara-Aswpati et al., 2007).

Apesar da expressão de RANKL não diminuir com a ação do ALN, o método de histoquímica para TRAP permitiu observar que a quantidade de clastos não diminuiu no grupo tratado, portanto o ALN, não interferiu no recrutamento e fusão dessas células. Assim, os osteoclastos dos grupos tratados, em sua maioria, não foram ativados, apresentando-se em estado latente, arredondados, sem formação de borda em escova e zona clara, características confirmadas pela análise ultra estrutural. É possível que as células clásticas recém fusionadas, quando entraram em contato com a superfície óssea, sofreram a interferência do ALN associado à matriz mineralizada, e se tornaram latentes. Bradaschia-Correa et al. (2013),

desenvolveram um estudo com ratos recém-nascidos, nos quais foi aplicado ALN até os 30 dias de vida. A droga inibiu a expressão de RANKL, no grupo tratado. Porém as células precursoras foram recrutadas, e fusionadas, podendo observar um grande numero de células clásticas latentes na região da cripta óssea.

Além disso, nesse grupo a expressão de OPG, apresentou-se alterada. A expressão de OPG, apresentou-se mais intensa no grupo que recebeu o ALN, encontrando-se também mais freqüentemente em osteócitos. Foi também observada a expressão em canalículos e regiões de inicio de reabsorção. No grupo CON a expressão foi mais restrita aos osteócitos, porem menos intensa. Diminuiu a intensidade nos tempos mais longos. Um estudo realizado por Gu et al., (2005), usando calvária de rato em cultura, revelou a importância do papel dos osteócitos para regulação da remodelação óssea. O grupo em que os osteócitos foram mantidos vivos, não houve formação de anéis de actina. Já o grupo em que a apoptose dos osteócitos foi induzida foi observada atividade de reabsorção. A OPG atua como receptora e é expressa por osteoblastos, desempenhando a função de inibir a reabsorção óssea quando se liga ao RANKL. Na reabsorção óssea patológica o equilíbrio dessa interação é desregulado (Kirkwood et al., 2007).

Koide et al. (2013) realizaram um estudo em animais com animais com deficiência de OPG, e aumento de RANKL, relataram que a perda de osso alveolar foi muito maior nos ratos com menos OPG, do que nos ratos com aumento da RANKL, especialmente nas áreas de osso alveolar onde houve um aumento de osteoclastos no grupo com menos OPG. Na análise imuno-histoquímica a OPG teve sua expressão significamente maior nos osteócitos, principalmente na área cortical. O que sugere que a reabsorção nas áreas de osso cortical foi prevenida pela OPG produzida no local. Concluíram que a OPG é útil e eficaz na busca de agentes terapêuticos contra a perda de osso alveolar. Por outro lado, Shoji et al. (2010), relataram que a ligação entre RANKL/OPG, é dez vezes mais potente, do que a ligação de RANK/RANKL. O que pode justificar a presença de RANKL, em um tecido não reabsorvido.

Em relação à osteonecrose associada ao tratamento com bisfosfonatos, em 2003, foi publicado o primeiro relato de osteonecrose nos maxilares relacionado com o uso destas drogas (Marx, 2003), desde então, vários outros estudos vem sendo

desenvolvidos para esclarecer essa relação. Yamamoto-Silva et al. (2013), realizaram um estudo no qual sinais de osteonecrose foram achados na mandíbula de ratos que tiveram o segundo molar inferior extraídos e haviam recebido doses de ALN previamente e posteriormente à extração. Os sinais de osteonecrose foram caracterizados com áreas de osso isentas de elementos celulares. Nesse estudo também foram observadas áreas de osso isentas de células, nos tempos mais avançados (ALN-L 21 e 30 dias). Essas áreas foram bem observadas na microscopia eletrônica de transmissão, que apresentou lacunas preenchidas apenas por restos celulares, e algumas células em processo de degeneração.

Em um estudo de coorte em humanos, para avaliar a relação da osteonecrose nos maxilares e o uso de bisfosfonatos, foi verificada uma significativa associação entre os bisfosfonatos e a osteonecrose, a qual foi definida como osso exposto à cavidade oral durante o período observado, além de apontar a periodontite como fator de risco para a osteonecrose (Yamazaki et al., 2012).

Estudos também vêm sendo desenvolvido em animais, com a periodontite experimental, para elucidar melhor a relação de causa e efeito. Em concordância com o presente trabalho, quando administrado ácido zoledrônico a ratos com periodontite induzida por ligadura, foi observada perda difusa de osteócitos no osso alveolar, o qual se apresentou clinicamente exposto à cavidade oral (Aghaloo, et al., 2011).

Além da microscopia eletrônica, a estatística realizada não mostrou significância, quando foi comparada a distância da crista alveolar à junção cimento esmalte, no grupo tratado nos diferentes tempos. Lekic et al. (1997) demonstraram que o bisfosfonato não nitrogenado etidronato contribui para formação de osso alveolar, pois interfere na proliferação de células do ligamento periodontal em osteoblastos em contraste com o presente estudo, onde não foi observado formação de osso, nem aumento de osteoblastos. Isso confirma a ideia segundo a qual o mecanismo pelo qual os diversos tipos de bisfosfonatos atuam sobre as células dos tecidos mineralizados é diferente.

O uso de bisfosfonatos já foi muito estudado e sugerido como agente terapêutico para periodontite, com o objetivo de reduzir a perda óssea alveolar e a da densidade mineral. Alguns estudos já utilizaram o ALN como agente terapêutico e

relataram uma ação terapêutica satisfatória (Rocha et al., 2001; Rocha et al., 2004), porém, relatando achados que sugeriram que o uso por tempo prolongado dessa droga, na presença da doença periodontal, pode gerar osteonecrose nos maxilares.

Os presentes resultados também contribuem para o entendimento das reações teciduais durante a periodontite; para o efeito do ALN na presença da doença, assim como para algumas decisões clínicas. A indicação da mesma como agente terapêutico ainda deve ser desconsiderada, e cuidados devem ser tomados com pacientes com esse histórico.

7 CONCLUSÕES

- -O alendronato interferiu na progressão da doença periodontal, promovendo a inativação das células clásticas, inibindo o processo de reabsorção dos tecidos mineralizados dentoperiodontais.
- -O alendronato sódico não interferiu no processo inflamatório da doença periodontal.
- -A dose e o tempo prolongado da administração do alendronato causaram grau leve de osteonecrose na crista alveolar do segundo molar superior de ratos com periodontite induzida.
- -A expressão da proteína RANKL não alterou com o tratamento com alendronato.
- -A expressão da proteína OPG, aumentou com a administração do alendronato.

REFERÊNCIAS¹

Aghaloo TL, Kang B, Sung E C, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM and Tetradis S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1871–82.

Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M, Kesavalu L and Wronski TJ. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in Rice Rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2012;27(10):2130-43.

Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit AC, Wronski TJ. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis.* 2010;16(7):674-85.

Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. *Biologia celular e tecidual para odontologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: Mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:446-50.

Belibasakis G, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J.Clin.Periodontol.* 2012;39:232-8.

Belibasakis GN, Bostanci N, Hashim A, Johansson A, Aduse-Opoku J, Curtis MA and, Hughes FJ. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: A putative role of the Arg-gingipains. *Microb Pathog.* 2007;43(1):46–53.

Bradaschia-Correa V, Massa LF, Arana-Chavez VE. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. *Cell Tissue Res.* 2007;330(3):475–85.

Bradaschia-Correa V, Moreira MM, and Arana-Chavez VE. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell Tissue Res.* 2013;353(1):79–86.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Brewer L, Williams D, Moorre A. Current and future treatment options in osteoporosis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011;67(4):321–31.

Cerri PS, Katchburian E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodontol Res*. 2005;40:365-72.

Cetinkaya, BO, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: A stereologic study in rats. *J. Periodontol*. 2008;79(10):1950-61.

Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: Where does RANKL come from? *BioMed Res Inter*. 2014. Impress

Duarte PM, Assis DR, Casati MZ, Sallum AW, Enilson AS, Nociti JrFH. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol*. 2004;75(9):1196-202.

Giannobile WV. Host-Response therapeutics for periodontal diseases. *J.Periodontol*. 2008;78(8):1592-600.

Goes P, Melo IM, Dutra CS, Lima APS, Lima V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1537-44.

Gomes-Filho IS, Oliveira TJS, Passos JS, Cerqueira EMM, Cruz SS, Barreto ML, Coelho JMF, Trindade AC, Santos CAST, Sarmiento VA. Effect of osteoporosis on periodontal therapy among postmenopausal women. *Gerodontology*. 2012;30(1):40-8.

Graber LW, Vanarsdall RL, Vig KWL. *Orthodontics: Current principles and techniques*. 5^a ed. Philadelphia, PA.:2012.

Graves DT, Fine D, Teng Y-TA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models for investigates host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008;35:89-105.

Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335:1095-101.

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;22(2):225-31.

Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Gracés CP, Román-Alvarez P, Barajas-Torres C, Contreras-Marmolejo LA. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization. *Cell Biology International.* 2007;31:1063-8.

Jain N, Jain G, Javed S, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad EF, et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discov Today.* 2008;13(21-22):932-43.

Santamaria MJ, Fractalossi ACC, Consolaro MFMO, Consolaro A. Influence of bisphosphonates on alveolar bone density: a histomorphometric analysis. *Braz Oral Res.* 2010;24(3):309-15.

Kalsi R, Vandana K, Prakash S. Effect of local drug delivery in chronic periodontitis patients: A meta-analysis. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15(4):304-309.

Katchburian E, Arana-Chavez VE. *Histologia e embriologia oral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 294-315.

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N. Osteoprotegerin-Deficient Male Mice as a Model for severe alveolar bone loss: Comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 2013, 154(2):773-82.

Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW, Sedghizadeh PP. The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Curr Osteoporos Rep.* 2010 Mar;8(1):40-8.

Lekic P, Rubbino I, Krasnoshtein F, Cheifetz S, McCulloch CA, Tenenbaum H. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *Anat Rec.* 1997 Mar;247(3):329-40.

Lindhe J, Lang NP, Karring TK. Tratado de Periodontia clínica e implantologia oral. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2010.

Lins RDAU, Pequeno MT, Melo JPLC, Ferreira RCQ, Silveira EJD, Dantas EM. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac. 2006; 7: 29-36

Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zhenq MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. Int J Mol Med. 2003;11(1);17-21.

Lotze MT, Tracey KJ. High-Mobobility group Box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol. 2005 Apr;5(4): 331-42.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg. 2003;61(9):1115-7.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. Eur J Oral Sci. 2000;108(1):74-7.

Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. J Histochem Cytochem. 2006;54:713-25.

Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000. 2006;40:11-28.

Oliveira AFB, Passos AI, Paiva FPF, Madeiro AT, Massoni ACLT. Aspectos clínicos histológicos da gengiva: revisão de literatura. Odontol Clin-Cientif. 2005; 4:95-100.

Ramírez JH, Parra B, Gutierrez S, Arce RM, Jaramillo A, Ariza Y, Contreras A. Biomarkers of cardiovascular disease are increased in untreated chronic periodontitis: a case control study. Aust Dent J. 2014;59:29-36.

Rocha M, Nava LE, Torre CV, Sánchez-Marin F, Garay-Sevilla ME, Malacara JM. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: A randomized, placebo-controlled Trial. J Periodontol. 2001, 72(2): 204-9.

Rocha ML, Malacara JM, Sánchez-Marin FJ, Torre CJ, Fajardo ME. Effect of Alendronate on periodontal disease in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled Trial. *J Periodontol*. 2004;75(12):1579-85.

Rothbarth CP, Bradaschia-Correa V, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Effects of the bisphosphonate alendronate on molars of Young rats after lateral luxation. *Dent Traumatol*. 2014, *in press*.

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J*. 2009 Dec;35(3):119-30.

Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*. 2008;19(6):733-59.

Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011 Jul;49(1):2-19.

Sato S, Hasuike A, Yoshinuma N, I Koichi. Invasive cervical root resorption 15 years after modified Widman flap surgery. *J Oral Science*. 2013;55(2):183-5.

Shoju S, Tabuchi M, Miyazawa K, Yabumoto T, Tnaka M, Kadato M, Maeda H, Goto S. Bisphosphonate Inhibits Bone Turnover in OPG -/- Mice via a depressive effect on both osteoclasts and osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2010;87:181-92.

Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*. 1993;91:257-63

Taylor A, Mules EH, Seabra MC, Helfrich MH, Rogers MJ, Coxon FP. Impaired prenylation of Rab GTPases in the gunmetal mouse causes defects in bone cell function. *Small GTPases*. 2011;2:131-42.

Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, Gopalakrishnan R. Periodontal Disease as a Risk Factor for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *J. Periodontol* 2013; 85(2): 226-33.

Tsao C, Darb I, Ebeling PR, O' Brien-Simpon N, Reynolds E, Borromeo G. Oral Health Risk-Factors for Bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(8):1360-6.

Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadam A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with periodontitis and porphyromonas gingivalis. *J Periodontol* 2007;78(6):1062-69.

Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1967;15(9):542-9.

Yamamoto-Silva FP, Bradaschia-Correa V., Lima LAPA and Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. *Microsc Res Tech.* 2013;76(6):33-40.

Yamazaki T, Yamori M, Ishizaki T, Asai K, Goto K, Takahashi K, Nakayama T, Bessho K. Increased incidence of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients treated with bisphosphonates: a cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(11):1397-403.

Zuo J, Jiang J, Chen SH, Vergara S, Gong Y, Xue J, et al. Actin binding activity of subunit B of vacuolar H⁺-ATPase is involved in its targeting to ruffled membranes of osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2006 May;21(5):714



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **002/2013** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Victor Elias Arana-Chavez** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "Efeito do alendronato sódico sobre a atividade osteoclástica na periodontite experimental em ratos" do qual participam o(s) pesquisador(es) **Mariana M. Moreira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **26/02/2013**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2013


Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA-FOUSP