FERNANDA PAULA YAMAMOTO

**Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares
em ratos tratados com alendronato de sódio**

São Paulo
2010

FERNANDA PAULA YAMAMOTO

**Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares
em ratos tratados com alendronato de sódio**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo
para obter o título de Doutor, pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Victor E. Arana-Chavez

São Paulo
2010

Yamamoto FP. Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares em ratos tratados com alendronato de sódio. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Patologia Bucal.

Aprovado em: ____/____/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Teruaki e Aparecida**,
Todo meu esforço e dedicação não seriam suficientes, se não fosse o apoio
incansável e incalculável de vocês durante todos esses anos. Agradeço pelo
exemplo de determinação, e acima de tudo pelo incentivo constante para a
concretização deste objetivo.*

*A minha irmã **Fabiana** e meus sobrinhos **Breno e Beatrice** agradeço pela
descoberta de um novo sentimento, ser tia e madrinha foi um grande
incentivo para superar meus desafios durante esta jornada. **Amo vocês.***

*Ao meu noivo **Brunno** pelo constante apoio, dedicação, compreensão, pelo exemplo de profissional e pelo incansável incentivo, aliás, sua participação neste período foi além disso, seu companheirismo foi essencial para a minha caminhada, você foi meu porto seguro. Obrigada por ser, antes de tudo, meu amigo. **Te Amo!***

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao **Prof. Victor Elias Arana-Chavez**, inicialmente pela confiança, e por me permitir fazer parte da família, hoje, LBO. Agradeço também pela amizade, incentivo, compreensão, serenidade, e principalmente, pelo exemplo da docência. Seu amor pela pesquisa é contagiante, obrigada pela oportunidade de sido orientada por você durante este período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo, pela oportunidade de cursar a pós-graduação. Foi uma honra ter conhecido e convivido com uma pessoa que é referência na área de Patologia Bucal. Obrigada.

A Profa. Dra. Andrea Mantesso, pela confiança e pelo apoio durante minha pós-graduação. Além de excelente professora, foi uma grande amiga. Serei eternamente grata a você.

Aos demais professores da Disciplina de Patologia Bucal pela ajuda durante meu aprendizado docente e na rotina anatomo-patológica: Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa, Profa. Dra. Marina Magalhães, Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Prof. Dr. Fábio Daumas, Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins e Profa. Dra. Karem Ortega.

Aos meus sogros: Dayse e Luiz, pela paciência e colaboração durante todos esses anos.

A funcionária Fernanda Barrence (ICB), pela ajuda diária na difícil missão de trabalhar com os animais, muito obrigada por fazer essa missão possível!

Ao Prof. Luiz Lima sempre muito solícito e criterioso, contribuiu com a técnica de histomorfometria, assim como na interpretação desses resultados, muito obrigada!

As amigas do LBO e LBTM: Lorraine, Tati, Elô, Viva, Natasha, Karla com K, Dani, Taís e mais recentemente, Vanesa. Muito obrigada por dividir comigo os momentos de angústia na bancada e fora dela também. Os momentos de risada e descontração foram importantíssimos.

Aos meus amigos da disciplina de patologia bucal, que tornaram minha caminhada mais alegre e me incentivaram desde minha primeira rotina: Hélder Pontes, Flávia

Pontes, Sérgio Cury, Flávia Caló, Tessa, Kívia, Yonara, Marina, Tati Libório, Fábio Coracin, Pati Adachi, Cris Barbosa e Erika Pereira, muito obrigada.

Aos colegas de pós-graduação: Karin Fernandes (minha dentista e amiga), Alexandra Fontes, Fabiana e Márcio Martins, Juliana Schussel, Juliana Noguti, Roberto, Ronald, Aluana, Fernanda Giudice, Felipe, Fátima, Michella, Renata Acay e Renata Camarez.

As funcionárias da Patologia Bucal: Zilda Natalina, Néia, Nair, Bia, Elisa e Edna (*in memoriam*). Obrigada pelo carinho e pelo bom convívio durante esses anos.

Aos funcionários do biotério do ICB: Cláudio, Fernando e Marley pelo cuidado com os animais.

Aos funcionários Gaspar e Edson, sempre competentes na confecção das telas e fotos do MET. Gaspar, obrigada por sempre me socorrer em momentos de desespero no LBTM.

Aos funcionários do biotério central: Renaide e Marcelo que sempre muito prestativos me ajudaram na aquisição dos animais.

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!
Mário Quintana

Yamamoto FP. Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares em ratos tratados com alendronato de sódio [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2010.

RESUMO

A osteonecrose dos ossos maxilares relacionada ao uso prolongado de bisfosfonatos (OMRB), associada a procedimentos cirúrgicos, constitui uma entidade com menos de dez anos de ocorrência na clínica estomatológica. Os bisfosfonatos (BFs) são medicamentos antireabsortivos altamente efetivos no tratamento de diversas doenças ósseas, além de metástases. Embora a maioria dos casos de OMRB tenha sido relatada após o uso de potentes BFs da terceira geração, o alendronato de sódio (ALN), um bisfosfonato de segunda geração, é amplamente utilizado no tratamento e prevenção de doenças ósseas. O presente estudo experimental *in vivo* visou analisar a possível presença de OMRB no processo alveolar de ratos tratados com ALN após exodontia do segundo molar inferior. Para tanto, utilizou-se 30 ratos Wistar, machos, com 7 semanas de vida, divididos em dois grupos, ALN (tratado com alendronato) e CTL (controle, tratado com solução salina). O ALN foi administrado diariamente por injeção subcutânea na dose de 2,5 mg/kg peso por 14 dias. Nesse momento, foi realizada a exodontia, havendo sido eutanasiados cinco animais de cada grupo, 7, 14 e 21 dias após a exodontia. Após a eutanásia, a região da mandíbula foi fixada em 2,5% formaldeído e 2% glutaraldeído, em tampão cacodilato 0,1M - pH 7,4 e descalcificada em EDTA a 4,13% por 30 dias. Os espécimes foram analisados em cortes corados em HE, e foi realizada histomorfometria para análise da reabsorção da crista alveolar mesial e distal, além do tecido ósseo neoformado no interior do alvéolo, que também foi analisado através de imuno-histoquímica para as proteínas não colágenas OPN e BSP e para evidênciação de vasos sanguíneos neoformados com o anticorpo anti-CD105. Os osteoclastos foram evidenciados através de histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Além disso, as células e eventos da reparação foram examinados por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados

mostraram que os animais tratados com ALN exibiram OMRB de grau zero em todos os períodos estudados, além da presença de osteoclastos latentes TRAP-positivos e histomorfometria, onde a não reabsorção das cristas alveolares ocasionaram a permanência do osso alveolar, em contato com bactérias. Observou-se ainda, um claro atraso na formação óssea, quando comparado ao controle, além da diminuição dos vasos sanguíneos nos estágios iniciais. A localização e o padrão de marcação para as proteínas OPN e BSP foram considerados normais, observados evidente marcação em áreas ósseas imaturas e em linhas cimentantes. Assim, concluiu-se que o ALN administrado neste protocolo provocou OMRB leve, provavelmente causada pela diminuição da angiogênese, presença de osso alveolar não remodelado expostos a colônias bacterianas, além da diminuição da atividade osteoblástica.

Palavras-chave: Osteonecrose. Alendronato de sódio. Bisfosfonatos. Osteoclastos. Reparação alveolar.

Yamamoto FP. Study of the presence of osteonecrosis of the jaw following molar extraction in rats treated with sodium alendronate [thesis]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2010.

ABSTRACT

The bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) associated with surgery procedures, is an entity with less than 10 years of occurrence in dental practice. The bisphosphonates (BFs) are anti-resorbing drugs highly effective in the treatment of several bone diseases, including metastasis. Although the majority of cases of BRONJ had been reported with the potent third generation of BFs, sodium alendronate (ALN), a second generation bisphosphonate, is widely used for treatment or prevent bone diseases as osteoporosis. The present experimental study aimed to analyze the possible presence of BRONJ in the alveolar process of rats treated with ALN following extraction of the mandibular second molar. For this, we used thirty 7-week-old male Wistar rats, divided into two groups, ALN (treated with alendronate) and CTL (control, treated with saline solution). The administration of ALN received daily subcutaneous injection at a dose of 2.5 mg/kg for 14 days. At that moment, the extraction was performed. After 7, 14 e 21 days of surgery, five animals of each group were euthanized and the mandibular region fixed in 2.5% formaldehyde + 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1M - pH 7.4 and decalcified in 4.13% EDTA for 30 days. The specimens were morphologically analyzed in HE stained sections, and, histomorphometry was used to analyze the resorption of mesial and distal alveolar crests, as well as the bone formed into the alveolus. Immunohistochemistry for the noncollagenous proteins OPN and BSP and for CD105 to revel neoformed blood vessels was also performed. The osteoclasts were revealed through tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) histochemistry. Moreover, the cells and events of alveolar healing were examined by transmission electron microscopy. The results showed light degree of BRONJ in the ALN treated animals at all the studied periods, and the presence of latent osteoclasts near the non-resorbing crest alveolar. Bacteria were observed in contact with the non-resorbed alveolar bone. An evident delay in bone formation when compared to control group was also

observed, as well as the decrease of blood vessels in early stages. The distribution of immature bone and in cement lines of OPN and BSP was considered normal. Thus, we concluded that the present protocol of ALN yielded light BRONJ areas, probably by reduced angiogenesis, lack of remodeling of alveolar, presence of bacterial colonies and evident decreased osteoblastic activity.

Keywords: Osteonecrosis. Alendronate. Bisphosphonate. Osteoclasts. Alveolar healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 -	Estrutura química dos diferentes tipos de bisfosfonato. Fonte: Russel et al. (2008).....	26
Figura 2.2	Esquema ilustrativo do mecanismo de ação dos bisfosfonato com e sem nitrogênio na composição. Fonte: Russel et al. (2008)....	29
Figura 4.1	Hemi-mandíbula (lado direito) dissecada, após remoção de parte do incisivo central e parte do ramo ascendente.....	48
Figura 4.2	Após a descalcificação, as hemi-mandíbulas foram divididas ao meio no sentido longitudinal.....	48
Figura 5.1	Fotomicrografias do Grupo ALN-7- A) Alvéolo (Al) preenchido por infiltrado inflamatório na porção cervical subjacente a área de necrose (*) em proximidade a bactérias (Bac). Osso alveolar (AO) não reabsorvido 25x. Osso alveolar (AO) necrótico em adjacente ao infiltrado inflamatório presente no alvéolo (Al) 100X. C) Osso necrótico permeado por colônia bacteriana (Bac) (400x). D) Osso alveolar (AO) adjacente a osteoclastos latentes (OcL)(100x). Osteoclastos latentes (OcL) evidenciado na cor vermelha na histoquímica para TRAP (100x).....	54
Figura 5.2	Fotomicrografias do Grupo CTL-7 – A) Alvéolo (Al) exibindo recobrimento epitelial (E) e preenchimento com osso imaturo (OI). Observar setas (25X). B) Osso imaturo em remodelação, apresentando osteoclastos ativos (OcA) e osteoblastos (Ob) próximos ao osso imaturo (100X).Crista alveolar (CA) em processo de reabsorção adjacente a osteoclastos ativos (OcA) (100x). Osso imaturo em remodelação, osteoclastos ativos (OcA) aderidos a superfície trabecular (100X). Osteoclastos ativos (OcA) TRAP-positivos aderidos a trabéculas ósseas.....	56
Figura 5.3	Fotomicrografias do Grupo ALN-14. A) Alvéolo (Al) exibindo recobrimento epitelial (E) subjacente a colônia bacteriana (Bac). Nota-se ainda, a crista alveolar (CA) não reabsorvida 25X. B) Crista alveolar em maior detalhe, apresentando infiltrado inflamatório e ausência de osteócitos (necrótico)(ON)100X. C) Região apical do alvéolo, observar setas direcionadas ao osso neoformado 25x. D) Parede lateral do alvéolo (Al) exibindo osso imaturo circundado por osteoblastos (Ob), em proximidade, nota-se osteoclasto latente (OcL)100x. E) Em histoquímica TRAP, observa-se osteoclastos latentes evidenciados em vermelho, assim como o osteoclasto latente (OcAp)100x.....	58

- Figura 5.4 Fotomicrografias Grupo CTL-14 - A) Alvéolo apresentando recobrimento epitelial (E) e osso imaturo (OI) preenchendo o alvéolo, observar setas. B) Maior detalhe do osso imaturo (OI) adjacente a rimas de osteoblastos (Ob) 100X. Osso próximo ao osso imaturo do alvéolo em remodelação. Osteoclastos TRAP-positivos adjacentes a trabécula óssea (100X).....60
- Figura 5.5 Fotomicrografias do Grupo ALN-21 – A) Alvéolo (Al) apresentando-se recoberto por epitélio (E), exibindo no seu interior pequena quantidade de osso imaturo evidenciado pelas setas. A crista alveolar (CA) permanece não reabsorvida 25X. B) Em maior detalhe, nota-se osso necrótico (ON) da crista alveolar subjacente ao epitélio (E) 400X. C) Crista alveolar do lado oposto, também necrótico (ON) subjacente ao recobrimento epitelial (E) 400X. Osso alveolar necrótico (ON) circundado por bactérias (Bac) 400X. Osteoclastos latentes (OcL) TRAP-positivos na região do osso alveolar 100X.....62
- Figura 5.6 Fotomicrografias do Grupo CTL-21 – A) Alvéolo (Al) recoberto por epitélio e preenchido quase em sua totalidade por osso imaturo (OI) evidenciados por setas 25x. B) Maior detalhe da crista alveolar (CA) em remodelação, nota-se osteoblastos (Ob) ativos 400X. C) Osso imaturo (OI) circundado por osteoblastos (Ob) 400x. Osteoclastos ativos (OcA) reabsorvendo osso.....64
- Figura 5.7 Figura 5.7 – Fotomicrografias do Grupo CTL-7 – A) Imuno-histoquímica para a proteína OPN. Marcação evidente em linhas cimentantes e regiões de osso imaturo 400x. B) Imuno-histoquímica para a proteína BSP. Marcação granular evidente em todo osso imaturo e tênue no osso maduro 400x.....69
- Figura 5.8 Fotomicrografias do Grupo ALN-14 – A) Marcação imuno-histoquímica da proteína OPN evidente em linhas cimentantes (Ic) (400x). B) Marcação imuno-histoquímica para BSP evidente na região de osso imaturo (OI) e tênue em regiões de osso maduro (OM) (400X).....70
- Figura 5.9 Fotomicrografia do Grupo CTL-14 – A) Marcação imuno-histoquímica para proteína OPN. Marcação evidente no osso imaturo (OI) e em linhas cimentantes (Ic) e tênue em região de osso maduro (OM). Observa-se ainda, alguns osteoblastos positivos (Ob) 400X. B) Marcação imuno-histoquímica para BSP. Marcação em linhas cimentantes (Ic) e osso imaturo (OI) 400X.....71
- Figura 5.10 Figura 5.10– Fotomicrografias do Grupo ALN-21 – A) Marcação imuno-histoquímica para proteína OPN, marcação evidente em linhas cimentantes (Ic) e osso imaturo (OI) e marcação tênue em regiões de osso maduro (OM) 400X. Marcação imuno-histoquímica para a proteína BSP, nota-se marcação granular

	distribuída em região de osso maduro. Nota-se ainda, marcação tênue em região de osso maduro (OM).....72
Figura 5.11	Fotomicrografia do Grupo CTL-21 – A) Marcação imuno-histoquímica evidente para OPN em região de osso imaturo e linhas cimentantes (lc) e marcação tênue em região de osso maduro (OM) 400X. B) Marcação imuno-histoquímica para BSP evidente em osso imaturo (OI) e linhas cimentantes (lc) e tênue em osso maduro (OM).....73
Figura 5.12	Fotomicrografia de reações de imuno-histoquímica para a proteína endoglina (Cd-105) dos grupos: CTL-7 e ALN-7. A) Grupo CTL-7 - marcação positiva para diversos vasos sanguíneos(vs) neoformados do interior do alvéolo (400X). B) Grupo ALN-7 - Marcação positiva em poucos vasos sanguíneos (vs) neoformados 400X.....75
Figura 5.13	Fotomicrografia de reações de imuno-histoquímica para a proteína endoglina (CD-105) nos grupos CTL-14 e ALN-14. A) Grupo CTL-14, marcação imuno-histoquímica positiva para vasos sanguíneos (vs) neoformados. B) Grupo ALN-14, marcação imuno-histoquímica para os vasos sanguíneos (vs) neoformados (400X).....76
Figura 5.14	Eletronmicrografias de transmissão do Grupo ALN-7 – A) Interior do alvéolo (Al) exibindo células inflamatórias e macrófago com fibras colágenas em seu fagossomo 3.000X. B) Parede lateral do osso alveolar (AO) exibindo fibras de Sharpey (fs) inseridas 2675X. C) Osteoclasto latente (OcL) apresentando pequena zona de adesão no osso alveolar, o qual exibe fibras de Sharpey (fs) remanescentes inseridas 2.750X. D) fibras de Sharpey (fs) inseridas no osso alveolar que apresenta faixa de hialinização (h) 3.600X.....78
Figura 5.15	Eletronmicrografia de transmissão do Grupo CTL-7 – A) Osso imaturo (OI) exibindo osteócitos em lacuna (Ot) e osteoblastos (Ob) na superfície, com uma típica disposição epitelióide. Entre o osso maduro e osteoblastos, nota-se camada de osteóide (o) 3.600X. B) Linha cimentante (lc) presente entre o osso imaturo (OI) e osso maduro (OM) 8.800X.....79
Figura 5.16	Eletronmicrografia do Grupo ALN-14 – A) Fibroblastos (fb) no interior do alvéolo (Al). B) Parede do osso alveolar (OA) em proximidade a camada de osso imaturo (OI) recém formado no interior do alvéolo (Al) 7.500X. C) camada hialinizada (h) recobrendo osso alveolar necrótico (ON) exibindo lacuna de osteócito vazia (*)2500X. D) Fibras de Sharpey (fs) do osso alveolar adjacente a área hialinizada (h) 8000X. E) Parede lateral do osso alveolar com fibras de Sharpey (fs) circundada por área hialinizada (h). F) Osteoclasto latente (OcL) adjacente ao osso

	alveolar 2500X.....	81
Figura 5.17	Eletronmicrografia de transmissão do Grupo CTL-14 – A) Osso imaturo (OI) exibindo osteócito em lacuna (Ot) 4.600X. B) Osteoclasto ativo (OcA) exibindo borda em escova (be) adjacente ao osso alveolar (OA)4.400X.....	82
Gráfico 5.1	Quantidade de osso neoformado que preencheu o alvéolo nos diferentes períodos. (7 dias $p=0,028$; 14 dias $p=0,014$; 21 dias $p=0,021$).....	65
Gráfico 5.2	Distância do limite cimento-esmalte dos primeiros molares até a crista mesial do segundo molar em μm . 7 dias $p=0,049$; 14 dias $p=0,034$; 21 dias $p=0,049$).....	66
Gráfico 5.3	- Distância do limite cimento-esmalte dos terceiros molares até a crista distal do segundo molar em μm . 7 dias $p=0,049$; 14 dias $p=0,034$; 21 dias $p=0,049$).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Aspectos histológicos de cada animal do Grupo ALN-7 avaliando-se cada item.....	53
Tabela 5.2	Aspectos histológicos de cada animal do Grupo CTL-7 avaliando-se cada item	55
Tabela 5.3	Aspectos histológicos de cada animal do Grupo ALN-14 avaliando-se cada item	57
Tabela 5.4	Aspectos histológicos de cada animal do Grupo CTL-14 avaliando-se cada item	59
Tabela 5.5	Aspectos histológicos de cada animal do Grupo ALN-21 avaliando-se cada item.....	61
Tabela 5.6	Aspectos histológicos de cada animal do Grupo CTL-21 avaliando-se cada item.....	63
Tabela 5.7	Quantidade de osso neoformado em relação ao tamanho do alvéolo, em porcentagem.....	65
Tabela 5.8	Distâncias do limites cemento-esmalte do primeiro molar até a crista mesial do segundo molar.....	66
Tabela 5.9	Distâncias do limites cemento-esmalte do primeiro molar até a crista mesial do segundo molar.....	67
Tabela 5.10	Número de vasos sanguíneos em cada grupo, nos períodos: 7 e 14 dias.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
ATP–	trifosfato de adenosina
BFs	Bisfosfonatos
BSP	sigla em inglês para <i>bone sialoprotein</i>
CO ₂	formula química do dióxido de carbono
DAB	sigla em inglês para 3.3' <i>diaminobenzidine</i>
GTP	sigla em inglês para <i>guanosine triphosphate</i>
HA	hidroxiapatita
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>
OPN	sigla em inglês para <i>osteopontin</i>
PBS	sigla em inglês para <i>phosphate buffered saline</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>
RGD	sequência arginina-glicina-aspartato
SIBLINGS	sigla em inglês para <i>Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein</i>
TC	tomografia computadorizada
TGF	sigla em ingles para <i>transforming growth factor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	sinal matemático de porcentagem
α	alfa
μg	micrograma
μm	micrometros
M	molar
mm^2	milímetros quadradros
β	beta
kg	quilograma
kDa	kiloDalton
~	Sinal matemático indicativo de valor aproximado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO LITERATURA	25
2.1 BISFOSFONATO	25
2.1.1 Estrutura química	25
2.1.2 Mecanismo de ação	26
2.1.2.1 Bisfosfonatos sem nitrogênio	27
2.1.2.2 Bisfosfonato com nitrogênio	27
2.2 OSTEONECROSE	29
2.2.1 Fatores de risco	30
2.2.3 Bisfosfonatos orais e incidência de OMRB	32
2.2.4 Bisfosfonatos endovenosos e incidência de OMRB	32
2.2.5 Patogênese	32
2.3 REPARAÇÃO ALVEOLAR	36
2.4 PROTEÍNAS NÃO COLÁGENAS	37
2.4.1 Osteopontina	39
2.4.2 Sialoproteína óssea	41
2.4.3 Endogлина	42
3 PROPOSIÇÃO	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 ANIMAIS	45
4.2 ADMINISTRAÇÃO DE ALENDRONATO E SOLUÇÃO SALINA	45
4.3 DIVISÃO DOS GRUPOS: ALENDRONATO E CONTROLE	45
4.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	46
4.5 PROCESSAMENTO DO MATERIAL	46
4.6 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA	49
4.7 HISTOMORFOMETRIA	49
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA	50
4.10 TÉCNICA DE HISTOQUÍMICA PARA FOSFASE ÁCIDA RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP)	51
4.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASMISSÃO	52
5 RESULTADOS	53
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA PARA TRAP	53
5.1.1 Grupo ALN-7	53
5.1.2 Grupo CTL-7	55
5.1.3 Grupo ALN-14	57
5.1.4 Grupo CTL-14	59
5.1.5 Grupo ALN-21	61
5.1.6 Grupo CTL-21	63
5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	65
5.2.1 Análise do preenchimento alveolar com osso neoformado	65
5.2.2 Análise da crista mesial	66
5.2.3 Análise da crista distal	67
5.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA	68
5.3.1 Osteopontina e Sialoproteína óssea	68
5.3.2 Endogлина	74

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	77
5.4.1 Grupo ALN-7.....	77
5.4.2 Grupo CTL-7.....	77
5.4.3 Grupo ALN-14.....	80
5.4.4 Grupo CTL-14.....	80
5.4.5 Grupo ALN-21.....	83
5.4.6 Grupo CTL-21.....	83
6 DISCUSSÃO.....	84
7 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXO A.....	105

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos ossos maxilares relacionada ao uso prolongado de bisfosfonatos (OMRB), associada a procedimentos cirúrgicos, constitui uma entidade com menos de dez anos de ocorrência na clínica estomatológica, porém, significando motivo de numerosas pesquisas relacionadas a sua etiologia e manejo.

Os bisfosfonatos (BFs) constituem uma classe de medicamentos antireabsortivos altamente efetivos no tratamento de diversas doenças ósseas como a osteoporose, doença de Paget, entre outras, além de metástases ósseas. Esses compostos são análogos ao pirofosfato inorgânico, um regulador endógeno da mineralização óssea.

Os BFs são quimicamente constituídos por um átomo central de carbono ligado a dois átomos de fosfato (P-C-P) e a duas cadeias laterais (R1 e R2). Alterações na cadeia R1 proporcionam maior ou menor afinidade do medicamento pela hidroxiapatita do osso, enquanto que alterações na cadeia R2 interferem na potência do fármaco (capacidade de inibição osteoclástica). A adição de nitrogênio ou de um grupo amina na cadeia R2 foi a modificação mais relevante introduzida nesta estrutura, proporcionando um importante aumento na potência dos BFs. De acordo com a potência, os BFs são classificados em: primeira, segunda e terceira geração ou, de acordo com a presença do nitrogênio na sua composição em: bisfosfonatos que contém nitrogênio (N-BFs) e BFs sem nitrogênio.

O mecanismo de ação desses dois tipos de BFs é distinto. Uma vez administrado, o medicamento tem a capacidade de se ligar ao osso, principalmente nos locais em remodelação, e a partir disso, podem levar os osteoclastos a apoptose (BFs sem nitrogênio) e/ou diminuem a diferenciação dessas células (N-BFs).

Apesar do seu comprovado efeito antiosteoclástico, em 2003, Marx relatou uma série de casos de osteonecrose dos ossos maxilares, relacionada ao uso prolongado de BFs, usualmente precedida de procedimentos cirúrgicos, sendo identificada como uma entidade clínica, a OMRB. Atualmente inúmeros casos são relatados na literatura, alguns deles sem causa aparente, chamados, por isso, de “espontâneos”. Este novo efeito colateral caracteriza-se pelo uso do medicamento associado ao surgimento de osso necrótico, exposto a cavidade oral por mais de 8

semanas, sem que o paciente tenha recebido radioterapia. Esta desordem acomete preferencialmente mandíbula.

A OMRB chamou a atenção da Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial, que na atualidade classifica clinicamente a OMRB em estágios: de discreto (grau zero) sem sintomatologia, sendo possível observar alterações radiográficas a estágio severo (grau 3) com secreção purulenta e sintomatologia dolorosa. O tratamento varia de acordo com a classificação clínica.

Os fatores de risco para o desenvolvimento da OMRB são relacionados com o tempo e a dose de exposição aos BFs em associação a um procedimento cirúrgico, com frequência, a exodontia.

A epidemiologia do OMRB é claramente maior em pacientes que fazem uso dos BFs de terceira geração, como o ácido zoledrônico, utilizados principalmente para tratamento de mieloma múltiplo e metástases ósseas, visto que são aproximadamente 10.000 vezes mais potentes que os de primeira geração, justificando os inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* presentes atualmente na literatura. Entretanto, os BFs de segunda geração são os mais utilizados no tratamento do restante das doenças ósseas que envolvem a atividade exacerbada de células clásticas, notadamente a osteoporose, transtorno muito evidente nos dias de hoje, principalmente com o aumento da expectativa de vida da população em geral. O alendronato de sódio (ALN) é um bisfosfonato de segunda geração amplamente utilizado no tratamento e prevenção da osteoporose, e por este motivo, aproximadamente 190 milhões de pessoas fazem uso deste medicamento em todo o mundo e por um tempo prolongado.

O crescente número de relatos de casos clínicos de OMRB gerou o desenvolvimento de modelos animais na tentativa da busca do conhecimento desta entidade desde o ponto de vista experimental. De fato, apesar de modelos *in vitro* sugerir mecanismos de resposta de células ósseas frente a drogas como os BFs, os modelos *in vivo* permitem a associação de procedimentos cirúrgicos com a interação de diversos tipos celulares durante as respostas teciduais. Assim, o primeiro modelo animal de OMRB foi publicado em 2009, conseguido através da administração de ácido zoledrônico e do corticóide dexametosona em associação a extração de molares em ratos, transmitindo ao animal um protocolo frequentemente utilizado no tratamento de doenças ósseas malignas, o que contribuiu para o início da

construção das primeiras hipóteses das causas da OMRB baseadas em análises experimentais.

Desde então, outros trabalhos experimentais *in vivo* foram realizados, utilizando não só o ácido zoledrônico, mas também o ALN. Nos trabalhos com este último BF, atrasos na reparação alveolar foram vistos, além da diminuição da angiogênese, alterações essas, explicadas pela inibição da remodelação óssea e pelo efeito anti-angiogênico dos BFs, este último atribuído até mesmo antes dos primeiros casos de OMRB.

Assim, por ser o ALN, um N-BFs amplamente prescrito em todo o mundo no tratamento de doenças ósseas, torna-se necessário um estudo experimental *in vivo* focalizando a análise do seu efeito sobre o osso do processo alveolar após exodontia em mandíbula, correlacionando eventos de neoformação óssea, qualidade do osso neoformado, bem como a presença de células clásticas e sua atividade reabsortiva, todos esses fatores com a possível presença de áreas de OMRB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BISFOSFONATOS

2.1.1 Estrutura química

Bisfosfonatos constituem um grupo de medicamentos anti-reabsortivos amplamente utilizados no tratamento de doenças metabólicas do osso como osteoporose, doença de Paget e metástases ósseas (Coxon et al., 2006; Russel et al., 2008). Esses medicamentos são análogos ao pirofosfato inorgânico, regulador endógeno de mineralização óssea (Russel et al., 1970) apresentando dois grupos fosfatos ligados a um átomo central de carbono (P-C-P), o qual possui duas cadeias referidas de R1 e R2 (Rogers et al., 2000). Essa estrutura confere aos bisfosfonatos, afinidade pelo Ca^{+2} e conseqüentemente, à superfície mineral óssea, particularmente em sítios de atividade osteoclástica (Lin, 1996), propriedade exclusiva de captação seletiva pelo seu órgão-alvo (Russel et al., 2008).

As habilidades do bisfosfonato de se ligar aos cristais de hidroxiapatita e prevenir sua dissolução foram evidenciados quando a cadeia R1 foi preenchida por um grupo hidroxila. A presença do grupo hidroxila na posição R1 aumenta a afinidade dos bisfosfonatos de quelar íons cálcio por uma ligação tripla e não dupla (Ebrahimpour ; Francis, 1995).

Após o sucesso clínico do uso do clodronato e etidronato nos anos 70 e 80, alterações foram feitas na cadeia R2. Em particular, a inclusão de um átomo básico de amino-nitrogênio na cadeia alquil dos bisfosfonatos (como pamidronato e alendronato) que são de 100-1000 vezes mais potentes que o clodronato e etidronato. Consecutivas alterações foram realizadas para aumentar a potência e a capacidade desses medicamentos de interferir o metabolismo ósseo, diminuindo sua reabsorção, dando origem aos bisfosfonatos: ibandronato e olpadronato que apresentam um átomo terciário amino-nitrogênio e ao residronato e ácido zoledrônico os quais apresentam um átomo de nitrogênio com um anel heterociclíco

(Figura 2.1), conferindo a eles, uma potência 10.000 maior que o etidronato (Ebetino et al., 1996). Devido a essa diferença na estrutura dos bisfosfonatos e na potência, esses são classificados em primeira, segunda ou terceira geração ou bisfosfonatos com nitrogênio (N- Bisfosfonatos) e sem nitrogênio (Russel et al., 2008).

Figura 2.1 - Estrutura química dos diferentes tipos de bisfosfonato. Fonte: Russel et al. (2008)

2.1.2 Mecanismo de ação

O preciso mecanismo pelo qual os bisfosfonatos atuam ainda não está totalmente esclarecido. Devido a sua alta afinidade pela hidroxiapatita do osso, eles são rapidamente retirados da circulação sistêmica e local, aderindo-se à superfície óssea (Lin, 1996), particularmente nos sítios de atividade osteoclástica. Quando osteoclastos estão ativos, eles estão em um microambiente ácido, o qual pode facilitar a liberação do bisfosfonato da superfície óssea, dando origem a uma alta concentração local de bisfosfonato (Rogers et al., 2000). O medicamento penetra no osteoclasto, culminando com sua direta inibição (Selander et al., 1996).

Estudos demonstram que os bisfosfonatos proporcionam múltiplas ações na hidroxiapatita. Inibem a precipitação de fosfato de cálcio, retardam a transformação da fase amorfa para a fase de cristalina da hidroxiapatita, inibem a agregação de cristais de hidroxiapatita e inibem sua dissolução (Francis et al., 1969).

De acordo com seu mecanismo de ação, os bisfosfonatos podem ser divididos em dois grupos. Os bisfosfonatos simples ou com nitrogênio na sua composição (Russel et al., 2008).

2.1.2.1 Bisfosfonatos sem nitrogênio

Os bisfosfonato sem nitrogênio são metabolizados intracelularmente em metileno, substância análoga ao ATP. Esse metabólito acumula no citosol de osteoclastos, induzindo-o a apoptose (Figura 2.2), provavelmente pela inibição de enzimas como adenina nucleotide translocase, um componente da permeabilidade de transição mitocondrial (Lehenkari et al., 2002). A indução a apoptose parece ser o primeiro mecanismo pelo qual os bisfosfonatos simples inibem a reabsorção, o que é confirmado em estudos *in vitro* nos quais se observam a relacionada inibição de caspase e conseqüentemente, inibição da apoptose de osteoclastos (Halasy-Nagy et al., 2001).

2.1.2.2 Bisfosfonatos com nitrogênio

Os bisfosfonatos mais potentes são caracterizados por apresentar nitrogênio na composição (N-BPs) ou um grupo amino-alquil (exemplo:alendronato e ibandronato). Eles atuam inibindo a farnesil difosfato sintase, uma enzima chave na via do mevalonato (Figura 2.2). Esta enzima é inibida por concentrações nanomolares de bisfosfonato. Estudos mostram que menores modificações na estrutura química do medicamento (R2), são suficientes para afetar a capacidade de inibição da farnesil difosfato sintase, sugerindo que esta enzima é o principal alvo desses medicamentos na inibição de osteoclastos (van Beek et al., 1999).

A inibição dessa enzima bloqueia a síntese de farnesil pirofosfatase, levando a uma redução da concentração de seus substratos, necessários para a produção de geranylgeranyl pirofosfatase, que são metabólitos isoprenoides para modificação lipídica (prenilação) de GTPases (Russel et al., 2008).

As pequenas GTPases são proteínas sinalizadoras que, quando ativadas, possibilitam a regulação de diversas propriedades e processos estruturais importantes para a função osteoclástica, incluindo morfologia, organização do citoesqueleto e tráfego vesicular (Alakangas et al., 2002; Pavlos et al., 2005) além da borda em escova. O tráfego vesicular dos osteoclastos é responsável pela concentração e transporte de enzimas envolvidas na reabsorção óssea. Esse processo, o qual requer desmineralização seqüencial de colágeno e dissolução de matriz colágena, ocorre na região da borda em escova dos osteoclastos (Mulari et al., 2003). A borda em escova cria um compartimento acidificado entre a célula e a superfície óssea. A parte mineral é removida do osso, levando a degradação do colágeno por enzimas. Quando o tráfego vesicular e a membrana da borda em escova são inibidos, suas atividades específicas de facilitar a reabsorção óssea são também reduzidas. Além disso, existem indicações que a geranylgeranilação de Rho e Rac estão envolvidas na diferenciação de fagócitos mononucleares em pré-osteoclastos (Zhang et al., 1995; Coxon et al., 2006; Woo et al., 2006).

Deste modo, a inibição osteoclástica através da inibição de farnesil difosfato sintase está envolvida em três maneiras que aparentemente, são dose-dependentes: em baixas concentrações, a atividade funcional envolve o citoesqueleto, o tráfego vesicular e a membrana da borda em escova. Em altas concentrações, a diferenciação osteoclástica está diminuída e em concentração aproximada de 100 μ M, a apoptose é induzida (Coxon et al., 2006).

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo do mecanismo de ação dos bisfosfonato com e sem nitrogênio na composição. Fonte: Russel et al. (2008)

2.2 OSTEONECROSE

A osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bisfosfonatos (OMRB) foi descrita pela primeira vez por Marx, em 2003, como sendo uma alteração relacionada ao uso prolongado de bisfosfonato, clinicamente caracterizada por uma área de osso necrótico exposto a cavidade oral.

A partir desta data, muitos casos são relatados na literatura, inclusive os de aparecimento “espontâneo”, ou seja, sem estímulo aparente como cirurgias e trauma crônico.

Atualmente; a Associação Americana de cirurgia oral e maxilofacial relaciona três condições para caracterizar a OMRB, são elas: 1- tratamento prévio ou presente com bisfosfonato; 2- apresentar a exposição de osso necrótico na região maxilofacial há mais de 8 semanas e 3- não ter história de tratamento com radioterapia. A partir do diagnóstico, são classificadas em: estágio 0 quando o paciente não apresenta aparente osso necrótico mas apresenta sinais clínicos e sintomas inespecíficos e alterações radiográficas, estágio 1- quando o paciente apresenta osso necrótico sem sintomas e sinais de infecção; estágio 2- o paciente apresenta osso necrótico, infecção, áreas eritematosas com evidência de sintomatologia e com ou sem drenagem purulenta; e estágio 3- paciente apresenta osso necrótico acompanhado de dor, infecção, e um ou mais fatores seguintes, como: extensão além do região envolvida inicialmente, resultando em fratura patológica, fístula extra-oral, comunicação nasal, ou osteólise extendendo de borda inferior da mandíbula e assoalho do seio (Ruggiero et al., 2009).

O fator de risco mais importante para o aparecimento da OMRB parece ser a potência do medicamento e o tempo de tratamento (Almazroo ; Woo, 2009) como descreve também a Associação americana de cirurgia oral e maxilofacial em 2009 juntamente como outros fatores de risco, que serão mencionados a seguir:

2.2.1 Fatores de risco

1- Relacionados a drogas

- a) Potência do bisfosfonato: Ácido zoledrônico > pamidronato > bisfosfonatos via oral (Bamias et al., 2005; Woo et al., 2006).
- b) Duração da terapia: os pacientes que recebem o tratamento por mais tempo, parece apresentar maior probabilidade de desenvolver a OMRB (Durie et al., 2005).

2- Fatores locais

A) Cirurgias orais (Badros et al., 2006):

- a. Extrações dentárias
- b. Implante dental
- c. Cirurgia periapical
- d. Cirurgia periodontal envolvendo injúria óssea

B) Local Anatômico

- a. Mandíbula > maxila

C) Doença oral concomitante: Paciente em tratamento com bisfosfonato apresentando doença periodontal, exibem 7 vezes mais chance de desenvolver OMRB (Hoff et al., 2008)

D) Fatores demográficos e sistêmicos

- a) Alguns trabalhos encontraram associação entre aumento da idade com aumento na probabilidade de desenvolver OMRB (Bamias et al., 2005; Badros et al., 2006) e outros não encontraram relação entre idade e OMRB.

E) Fatores genéticos

Sarasquete et al. 2008, demonstrou que perturbações genéticas (como polimorfismos) no citocromo do gene P450-2C foi associado com o aumento do risco de desenvolver OMRB em pacientes tratados com bisfosfonatos endovenosos.

Lehrer et al., 2009 sugere que polimorfismo no gene MMP2 pode ser a causa do desenvolvimento de OMRB, no entanto, os autores afirmam que estudos futuros são necessários para confirmação dessa hipótese.

F) Fatores preventivos

A Associação americana de cirurgia oral e maxilofacial recomenda que os pacientes realizem qualquer tratamento necessário antes de iniciar o tratamento com bisfosfonato endovenoso.

2.2.3 Bisfosfonatos orais e incidência de OMRB

A epidemiologia em pacientes tratados com bisfosfonatos via oral é pouco conhecido(Lo et al., 2010). De acordo com os dados da literatura, a estimativa é que a população da Alemanha e Austrália apresentam de 0,001% a 0,01% de prevalência de OMRB (Mavrokokki et al., 2007; Khosla et al., 2007).

Lo et al., 2010 descreveram que de 8.572 pacientes em tratamento com bisfosfonato via oral, 9 casos de OMRB foram confirmados, resultando na prevalência de 0,1%.

2.2.4 Bisfosfonato endovenoso e incidência de OMRB

De acordo com *series cases* reportados na literatura, a estimativa é que a incidência de OMRB em pacientes em tratamento com bisfosfonatos endovenosos varie de 0,8% a 12% (Durie et al., 2005; Bamias et al., 2005; Dimopoulos et al., 2006).

2.2.5 Patogênese

Até os dias atuais, a patogênese da OMRB ainda não foi elucidada. No entanto, vários trabalhos experimentais foram publicados na tentativa de se conseguir um modelo animal para OMRB (Sonis et al., 2009; Allen et al., 2010; Bi et al., 2010) e para sugerir as causas desta manifestação (Kassolis et al., 2010; Hikita et al., 2009; Kobayashi et al., 2010), que alguns autores propõem ser multifatorial (Aguirre et al., 2010).

Dentre as causas sugeridas para a OMRB, estão: diminuição da angiogênese, descrita tanto *in vitro* (Moreira et al., 2005; Ziebart et al., 2009) como *in vivo* (Aguirre et al., 2010; Kobayashi et al., 2010), toxicidade de tecido mole (Reid et al., 2007) e migração epitelial, proliferação e adesão de bactérias orais na hidroxiapatia, infecção

prévia do osso alveolar antes da exodontia (Kassolis et al., 2010) ou até mesmo desordem genética (Lehrer et al., 2009).

Em 2009, Sonis et al., descreveram o primeiro modelo de OMRB, conseguido após administração de ácido zoledrônico (7,5 µg/kg) semanalmente em associação com dexametasona (1,5 mg/kg) diariamente, subcutâneo de uma a três semanas em ratos posteriormente submetidos a exodontia de todos os molares superiores. Histologicamente observaram osso necrótico sem a presença de colônias bacterianas e de infiltrado inflamatório.

Bi et al. (2010) afirmaram que este trabalho é o primeiro a mostrar modelo animal de OMRB capaz de reproduzir as manifestações clínicas e radiográficas de pacientes, as quais não tinham sido descritas em animais. Neste estudo, ratos foram tratados com ácido zoledrônico em altas concentrações (125 µg/kg peso) duas vezes por semana, por três semanas e depois eram submetidos a exodontia do primeiro molar superior. Os autores administraram ainda, imunossupressores (dexametasona) e quimioterápicos (docetaxel), que sozinhos, não apresentaram capacidade de desenvolver OMRB, porém, quando administrados em associação com o ácido zoledrônico, potencializaram as alterações, principalmente de tecido mole. A supressão da remodelação óssea e da angiogênese foram os responsáveis pelo desenvolvimento da OMRB.

No entanto, quando o ácido zoledrônico é administrado em um curto período (7 dias) antes da extração, subcutâneo na dose de 250 µg/kg/dia promoveu atraso na reparação alveolar sem indícios de OMRB, além de inibir migração de células epiteliais e promover a proliferação e adesão de bactéria na hidroxiapatita, sem causar OMRB. Após a avaliação da migração epitelial, concluíram que houve um atraso na epitelização dos alvéolos de ratos tratados com ácido zoledrônico e que isso afetaria tanto o sucesso da reparação como a proteção alveolar. Os autores descreveram ainda, a particularidade da ocorrência de OMRB nos ossos maxilares, sendo este um fator sugestivo de que os bisfosfonatos poderiam interferir na microbiota oral, pois neste trabalho, observaram um aumento na aderência e no número de *S. mutans* na hidroxiapatita, sugerindo que esta pode ser uma provável ação do ácido zoledrônico como desencadeadora de infecção oral (Kobayashi et al., 2010).

Apesar da diferença de dose e da via de administração, os trabalhos envolvendo a administração de alendronato de sódio em ratos, seguidos de

exodontia foram unânimes em afirmar que este medicamento provocou atraso na reparação alveolar. Hikita et al. (2009) administrou alendronato de sódio em ratos por dois dias previamente a exodontia do segundo molar superior, na região do osso alveolar e o tratamento continuou por até 14 dias após o procedimento cirúrgico. Análises histométricas e imagens de micro-TC foram realizadas, mostrando que houve atraso na reparação alveolar nos animais tratados, o que permitiu aos autores sugerirem que a inibição da reabsorção óssea foi tanto a causa do atraso da reparação alveolar, quanto das alterações encontradas em pacientes com OMRB. Aguirre et al. (2010) administraram o alendronato de sódio ($150\mu\text{g kg}^{-1}$) subcutâneo de 3-4 semanas previamente a exodontia. Os autores concluíram que o atraso na formação de osso imaturo no interior do alvéolo e a diminuição da vascularização foram vistos somente até o 10º dia, mas não em períodos tardios. Notaram ainda, o atraso na remoção do osso alveolar interdental.

Este atraso na reparação alveolar não foi atribuído ao efeito direto nos osteoblastos, pois este efeito é controverso e ainda não está estabelecido na literatura. Schindeler e Little (2005) escreveram que osteoclastos e osteoblastos comportam-se de forma contrária quando cultivados na presença de ácido zoledrônico. Os osteoclastos apresentaram viabilidade reduzida, enquanto os osteoblastos se mantiveram inalterados, tanto em relação a viabilidade quanto em relação a capacidade de mineralização. Recente estudo *in vitro* demonstrou que os bisfosfonatos podem interferir na osteoclastogênese, atuando sobre o osteoblasto. Neste estudo, o ácido zoledrônico e pamidronato aumentaram a produção de osteoprotegerina (OPG) em osteoblastos humanos. Portanto, quando a OPG se liga ao RANKL, inibe sua interação com RANK e conseqüentemente a osteoclastogênese (Green, 2002).

O ALN, segundo Xiong et al. (2009) quando em contato com células osteoblásticas em cultura, aumenta sua proliferação, assim como a atividade da fosfatase alcalina, da proteína morfogenética óssea 2, osteocalcina e colágeno tipo I.

A diminuição da angiogênese, outro fator relacionado ao OMRB, é um efeito atribuído aos BFs desde antes do aparecimento dos primeiros casos de OMRB. Nemoto et al. (1990), relataram diminuição da angiogênese *in vitro* e posteriormente por Fournier et al. (2002). Alguns estudos *in vivo* corroboram com os achados *in vitro*, como de Wood et al. (2002) e Fournier et al. (2002).

A toxicidade dos bisfosfonatos em tecido mole justificaria o aparecimento “espontâneo” da OMRB. Aguirre et al. (2010), descrevem que a toxicidade direta dos bisfosfonatos é descrita há anos o que levou a preocupação e prevenção do extravasamento de bisfosfonato durante a infusão endovenosa, e mais recentemente, foi descrito a toxicidade do alendronato em região subcutânea em ratos (Moreira et al., 2005).

A toxicidade do tecido mole do trato digestivo foi investigado após a análise dos efeitos dos bisfosfonatos administrados via oral, que atualmente é bem documentado ser responsável por causar úlceras no epitélio gastrointestinal (Reszka et al., 2001).

A infecção bacteriana parece ser essencial para o aparecimento de OMRB, na opinião de alguns autores. Hansen et al. (2007) analisaram biópsia de pacientes com OMRB e concluíram que o quadro histológico é heterogêneo com áreas de osso necrótico e áreas de osso vital, porém, invariavelmente, infectados, diferente do quadro histológico dos pacientes com osteoradionecrose, que apresentavam um quadro homogêneo, sempre necróticos. Kumar et al. (2010) descreve que a presença de bactéria para caracterizar a OMRB é essencial. Os autores consideram que a OMRB trata-se de um tipo de osteomielite.

Kassolis et al. (2010), realizaram uma avaliação histológica de fragmentos retirados de sítios a serem submetidos a colocação de implantes, em regiões em que a extração dentária foi executada, no mínimo, há um ano. Como resultado observaram que 35% dos pacientes apresentaram osso não vital e que 15,6% deles apresentaram osteomielite, remetendo aos autores a sugestão que regiões de osso necrótico e infecção subclínica possam contribuir para o desenvolvimento da OMRB em pacientes em tratamento com bisfosfonatos presentes antes do procedimento cirúrgico para colocação de implantes.

Migliorati et al. (2005), apontaram que além dos efeitos já explorados para o aparecimento da OMRB, há diferenças genéticas como polimorfismos, que possivelmente devam ser as únicas respostas para a suscetibilidade de alguns indivíduos em desenvolver a OMRB. Recentemente foi sugerido por Lehrer et al. (2009) que a indução a OMRB seja causada pelo gene: da metaloproteinase de matriz 2 (MMP2), sustentado por três razões: MMP2 está associada a anormalidades ósseas, as quais são semelhantes a OMRB, o ácido zoledrônico e o alendronato têm sido associados a fibrilação arterial, e a MMP2 é o único gene

sabidamente associado com anormalidades ósseas e fibrilação arterial. E por fim, uma rede de desordens e doenças associadas a genes já conhecidos como causadores de doenças, sugerem que doenças cardiovasculares e doenças ósseas estão relacionadas, indicando que uma droga como o bisfosfonato, atue em um único gene. A MMP2 pode ter efeitos diferentes no sistema cardiovascular e ósseo, inibindo osteoclastos (Lehrer et al., 2009).

Apesar de inúmeros trabalhos que tangem a descrição das causas da OMRB, a patogênese deste processo permanece não elucidado, por isso, estudos futuros são necessários para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para prevenir e tratar a OMRB (Bi et al., 2010).

2.3 REPARAÇÃO ALVEOLAR

O processo de reparo alveolar constitui uma sequência de eventos que envolvem respostas dinâmicas com o único objetivo de formar tecido ósseo preenchendo a cavidade formada após a exodontia, mantendo homeostasia mineral do organismo (Okamoto et al., 2006).

Embora o período de reparação alveolar seja distinto entre as diferentes espécies, os eventos são similares, podendo ser divididos didaticamente em: Fase de coagulação ou inicial (1-5 dias), Fase de organização do coágulo e proliferação do tecido conjuntivo, Fase de formação óssea (completa no 20º dia) e Fase de remodelação óssea (Smith, 1974, Sato ; Takeda, 2007).

A fase de coagulação ou fase inicial (1-5 dias) inicia-se logo após a remoção do dente, neste momento, o alvéolo constitui-se de cortical da lâmina dura, coberta por fibras de ligamento periodontal rompidas, com uma borda de epitélio (gengiva) deixada na porção coronária. Nesta fase, Todo (1968a) observou fraca marcação imuno-histoquímica de fosfatase ácida e alcalina nos ligamentos periodontais e em células inflamatórias como leucócitos. Além disso, esta fase exhibe proliferação de fibroblastos pré-existentes e diferenciação de células indiferenciadas do remanescente do ligamento periodontal em direção ao coágulo sanguíneo. Nota-se ainda, proliferação de novos capilares sanguíneos e a consequente organização do coágulo em tecido de granulação. Gerber e Ferrara (2000) descrevem que o tecido

ósseo é particularmente vascularizado e que as células endoteliais exercem papel fundamental na remodelação óssea. Nas paredes e cristas alveolares observa-se inúmeros osteoclastos. No fundo do alvéolo são vistas delicadas trabéculas de osso neoformado (Todo, 1968a, Smith 1974, Guglielmotti ; Cabrini, 1985; Peterson et al., 2005, Hikita et al., 2009).

Fase de organização do coágulo e proliferação do tecido conjuntivo é observado a epitelização completa, o osso cortical continua sendo reabsorvido, e por isso, os osteoclastos são abundantes, enquanto o osso neoformado continua sendo depositado (Hikita et al., 2009). Aproximadamente metade do alvéolo encontra-se preenchido por osso no 15º dia (Todo, 1968b). Para Guglielmotti e Cabrini (1985) nesta época, quase a totalidade do alvéolo encontra-se preenchido por osso. Numerosas células osteoprogenitoras arredondadas e ovaladas e osteoblastos são uma característica predominante nesta fase. Nesta fase, observa-se forte marcação imuno-histoquímica para fosfatase alcalina e ácida. Os osteócitos na área calcificada de neoformação são grandes e se tornam gradativamente menores durante o processo de calcificação e também exibem imunopositividade para fosfatase ácida, porém negativa para fosfatase alcalina (Todo, 1968b).

Na fase de remodelação óssea ou fase tardia, finas trabéculas de tecido ósseo imaturo estão no nível da crista óssea reabsorvida (Todo, 1968b; Smith 1974; Guglielmotti ; Cabrini, 1985; Sonis et al., 2009). A medida que a formação óssea avança, uma crista óssea se forma. O topo da crista é normalmente plano e coberto por um fino perióstio (Todo, 1968b). O único remanescente visível do alvéolo depois do transcurso de um ano (em humanos) é a faixa de tecido fibroso pouco vascularizado que permanece sobre o processo alveolar edêntulo (Peterson et al., 2005).

2.4 PROTEÍNAS NÃO COLAGENAS

Tanto o osso quanto a dentina são muito semelhantes no que diz respeito à sua composição e mecanismo de formação. Ambos são constituídos de fase mineral (cristais de hidroxiapatita) e depositada sobre matriz orgânica. A matriz inicia sua formação quando osteoblastos secretam colágeno tipo I e outros constituintes da

matriz extracelular, que posteriormente é mineralizada. Assim, em adição ao colágeno tipo I, a matriz extracelular de osso e dentina contém diversas proteínas não-colágenas (Qin et al, 2004).

As proteínas não colágenas apresentam a aparente função de organizar a matriz colágena e regular a formação e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita (HA) (Ganss et al., 1999)

Um grupo de proteínas não-colágenas é chamada de SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) e inclui: osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP), proteína de matriz dentinária -1 (DMP-1), fosfoglicoproteína dentinária (DSPP) e sialofosfoproteína de matriz extracelular (MEPE) (Qin et al., 2004; Monfoulet et al., 2010). As SIBLINGs foram assim denominadas devido às características bioquímicas e genéticas que são compartilhadas pelos membros dessa família.

Estruturalmente elas apresentam sequências conservadas nos seus exons, incluindo aminoácidos e sequência arginina-glicina-aspartato (RGD) e por suas modificações pós-traducionais (casina quinase, fosforilação e vários eventos de glicosilação). Elas são definidas como pequenas, solúveis, e que se ligam a diferentes famílias de proteínas, incluindo as integrinas – através da sequência RGD ou não RGD – e a outras proteínas de superfície celular, tais como: membros da família metaloproteinase da matriz (MMP), o que as distingue de proteínas de matriz maiores, como a fibronectina, colágeno e traombospondina (THBS1) (Bellahcène et al., 2008)

Como mencionado acima, essas proteínas são principalmente encontradas na dentina e no osso e são secretadas na matriz extracelular durante a formação e mineralização desses tecidos. A expressão dessas proteínas é qualitativamente semelhante, mas quantitativamente diferentes nesses dois tecidos (Qin et al., 2004).

Recentemente, estudos *in vitro* e *in vivo*, os quais simulam uma superexpressão e subexpressão de OPN e BSP, demonstram que a deficiência de BSP aumenta o volume ósseo trabecular, além de reduzir a quantidade de osteoclastos, conseqüentemente a remodelação deste tecido, alterando a massa óssea (Malaval et al., 2008). Em contrapartida, a subexpressão de BSP aumenta a atividade osteoclástica e diminui os marcadores de atividade osteoblástica (Valverde et al., 2008). A deficiência de OPN não exibiu alterações ósseas esperadas em

condições fisiológicas normais, mas são resistentes a ovariectomias, induzido a perda óssea (Yoshitake et al., 1999; Ishijima et al., 2006).

Esses achados sugerem que essas proteínas apresentam funções complexas, especialmente em situações patológicas com envolvimento de diversas células, as quais as atividades são hermeticamente, temporariamente e espacialmente controladas (Monfoulet et al., 2010).

Estudos demonstram que a função da OPN na formação, remodelação e mineralização óssea tem sido detectada em osso neoformado durante o processo de reparação. No entanto, durante o reparo da cortical óssea em ratos desprovidos de OPN e BSP, a OPN parece não influenciar na reparação, diferentemente da BSP, que mostrou ser importante na mineralização, ocasionando o acúmulo de matriz não-mineralizada ou osteóide (Monfoulet et al., 2010).

2.4.1 Osteopontina

A OPN foi descrita pela primeira vez como sendo uma fosfoproteína específica de transformação de 60-kDa por Senger et al.¹. (1979 apud Sodek et al., 2000). No entanto, OPN foi identificada independentemente junto com a BSP, como sendo a maior sialoproteína na matriz extracelular óssea (Franzén ; Heinegard 1985).

O nome “osteopontina” foi introduzido para refletir sua capacidade de servir como ponte entre as células e a HA através da sequência RGD e ácido poliaspártico.(Sodek et al., 2000; Qin et al., 2004; Nanci et al., 2004)

A OPN é proteína de ~34-kDa, sendo secretada por células de uma variedade de tecidos, incluindo o osso, dentina, cimento, cartilagem hipertrófica, rim, cérebro, entre outros. Em osso, a OPN é produzida por osteoblastos em diferentes estágios de mineralização (Zohar et al., 1997) e por osteócitos (McKee ; Nanci, 1995; Sodek et al., 1995) e ainda por osteoclastos (Dodds et al., 1995). Essa diversidade de expressão reflete suas diferentes funções em processos fisiológicos e patológicos (Denhardt et al., 2001; Asou et al., 2001). Isso acontece porque a molécula de OPN

¹ Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. Cell. 1979 Apr;16(4):885-93.

apresenta várias formas, muitos receptores e sítios de ligação (Denhardt ; Guo, 1993).

A OPN pode se ligar a diferentes receptores celulares como $\alpha_v\beta_5$ e $\alpha_v\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ (Sodek et al., 2000) através dos quais é possível mediar diferentes adesões celulares.

O osso contém grande quantidade de OPN e é detectada em regiões específicas da matriz extracelular identificada através de métodos de imunohistoquímica. Enquanto que a maioria das proteínas não-colágenas apresenta uma distribuição relativamente homogênea dispersa no osso, a OPN apresenta-se quase que predominantemente acumulada em linhas cimentantes em áreas de remodelação óssea e em *laminae limitantes* na superfície óssea (McKee ; Nanci, 1996) Essa característica define a ligação matrix-matrix e célula-matrix respectivamente, e, portanto, representa importante localização na história da formação do osso.

As linhas cimentantes indicam sítios onde a formação óssea teve um momento quiescente ou onde um evento reverso na atividade celular ocorreu, entre as fases de formação e reabsorção desse tecido (linha reversa). As linhas cimentantes são marcas entre o osso antigo e o osso novo, e caracteristicamente contém uma alta quantidade de OPN. Essas estruturas são deficientes em fibras colágenas, mas ricas em OPN e as vezes apresentam BSP. Notavelmente, linhas reversas estão presentes em regiões de alta atividade de remodelação, as quais são observadas no osso alveolar e no periodonto (Sodek et al., 2000).

A OPN tem um papel importante no processo de remodelação óssea fisiológica (Denhardt ; Noda, 1998) participando nas fases de reabsorção e de formação.

Alguns estudos sugerem que durante o processo de remodelação óssea fisiológica, na fase de reabsorção, a OPN participa mediando adesão de osteoclastos sobre o tecido ósseo (Reinholt et al., 1990) recoberto pela *laminae limitans*. Essa estrutura serviria de substrato para adesão de osteoclastos e conseqüentemente para o selamento dessa célula sobre a matriz mineralizada. Esta adesão seria realizada através da sequência RGD da OPN presente na *laminae limitans* com a membrana plasmática da zona clara do osteoclastos, a qual possui integrina $\alpha_v\beta_3$, que tem a afinidade à OPN (Sodek et al., 2000). A OPN é geralmente regulada positivamente por hormônios e citocinas e suprimida por bisfosfonatos no

osso (Sodek et al., 1995). A regulação negativa da OPN por bisfosfonatos no osso é consistente com a supressão da atividade osteoclástica e consequentemente a síntese de OPN pela calcitonina (Kaji et al., 1994).

Durante a fase de neoformação óssea, a OPN é secretada pelos pré-osteoblastos e está presente nas linhas cimentantes. Esta OPN serve como um leito para a formação de uma matriz óssea e sua mineralização, e possivelmente para a adesão de osteoblastos nessa região. E finalmente, ela agiria como uma “cola biológica” promovendo adesão do novo tecido ósseo com o antigo (McKee ; Nanci, 1995).

2.4.2 Sialoproteína óssea

A sialoproteína óssea foi inicialmente isolada por Harris e Kent como uma glicoproteína de 23-kDa com alta quantidade de ácido siálico. Constitui-se de 8 a 12% do total de proteínas não colágenas do osso e cemento (Fisher et al., 1990).

Sua expressão é altamente específica em tecidos mineralizados, incluindo osso, cartilagem, dentina e cemento (Fisher et al., 1990). No entanto, os níveis de expressão são muito maiores em osso e cemento neoformados (Shen et al., 1995)

Enquanto sua expressão em pré-osteoblastos não é bem esclarecida, ela é rapidamente detectada em osteoblastos (Bianco et al., 1991) e osteócitos (Arai et al., 1995). Através da técnica de imuno-histoquímica foi observado que a BSP está presente em lamelas de humanos, osso cortical e trabecular e está presente também em linhas cimentantes e osteóide (Roach, 1994).

A presença da BSP no cemento e em linhas reversas indicam um potencial de mediar a ligação da célula na superfície mineral. Neste sentido, a BSP e a OPN possuem propriedades similares, embora sejam expressas em momentos diferentes durante a formação óssea (Chen et al., 1992) Assim, a propriedade de ligação da BSP, observada em osteoblastos e osteócitos (Helfrich et al., 1992) pode ser combinadas com a propriedade mediada pela sequência ácido poliglutâmico.

Esta proteína também está localizada em tecido do periodonto normal e em reparação de ratos e em osso mandibular em desenvolvimento (Pinero et al., 1995).

A BSP provavelmente inicia a formação da HA durante a formação óssea (Sodek et al., 2000). Notavelmente, a alta expressão da BSP é encontrada em sítios de formação óssea rápida e reparação de fraturas, situações onde o osso imaturo é formado.

No entanto, há evidências da participação da BSP em processos de reabsorção óssea, sendo expressa em osteoclasto durante a remodelação óssea (Bianco et al., 1991). Além disso, a BSP pode promover a ligação de osteoclastos *in vitro* (Helfrich et al., 1992). Quando a reabsorção óssea está aumentada, é devido a um aumento na aderência de osteoclastos na superfície óssea e não pela indução da diferenciação osteoclástica (Raynal et al., 1996).

Em adição, há trabalhos que indicam que a BSP também promove a adesão, proliferação e migração de células de câncer de mama através de interações com integrinas.

2.5 Endoglina (CD 105)

Endoglina (CD105) é uma glicoproteína integral tipo I de membrana, homodimérica de 180KD, de 658 aminoácidos que contém um domínio extracelular, um domínio transmembrana simples e um domínio intracelular curto. O domínio extracelular de humanos contém uma sequência tripéptica Arg-Gly-Asp (RGD) responsável pela interação de integrinas (Gougos ; Letarte, 1990).

Atua como um componente regulador da superfamília TGF- β (Derynck ; Feng 1997). Em humanos, 3 isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) tem sido descritos. Eles são estruturalmente e funcionalmente relacionados entre si e enxertam seus efeitos através da ligação de seus receptores (Yingling et al., 1995). Os receptores são do tipo I, II e III (betaglican) e endoglina. Betaglican e Endoglina não exibem sinalização entre si, no entanto, formam heteroméricos complexos com receptores do tipo I e II e podem formar reguladores que modulam o acesso de TGF- B no complexo de sinalização (Wrana et al., 1994). Desse modo, tem sido mostrado que a betaglican aumenta a ligação do TGF- β no receptor tipo II. Endoglina possui uma forte homologia a betaglican, particularmente no domínio intracelular e transmembrânico. Há descrito duas isoformas diferentes do gene endoglina, os

quais se ligam ao TGF- β 1 e TGF- β 3. A mutação desse gene parece ser responsável pela Telangiectasia hemorrágica hereditária tipo I (doença de Rendu-Osler-Weber), caracterizada por displasia vascular multisistêmica e hemorragia recorrente associada a malformações arteiovenosas (McAllister et al., 1994).

A expressão da endoglina tem sido reportada em células endoteliais de grandes e pequenos vasos, em particular interesse na observação de áreas angiogênicas, como reparação, psoríase, tecido embrionário, além de tumores (Letarte et al., 2005; Thorpe ; Burrows, 1995).

No entanto, CD105 é essencial para o desenvolvimento de vasos sanguíneos (Barbara et al., 1999). Em tecido humano normal CD105, é fracamente expresso em precursores de eritrócitos, células estromais, células B e monócitos ativos, enquanto que a endoglobina está minimamente expressa em tecidos normais, ela é amplamente expressa células vasculares endoteliais em locais de angiogênese ativa, durante embriogênese, tecidos inflamados e em tumores (Burrows et al., 1995, Millers et al., 1999; Fonsatti et al., 2000).

Recentes estudos demonstram que a proliferação de células endoteliais em tumores associados a neoangiogênese são de 20-2000 vezes maior do que em tecido normal. Estudos in vivo e in vitro sugerem que CD105 representa o marcador ideal para quantificar angiogênese tumoral, assim como um marcador prognóstico em pacientes com câncer de mama (Kumar et al., 1999).

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo mimetizar o quadro clínico da OMRB, em ratos, porém, utilizando um bisfosfonato de segunda geração, associando os seguintes fatores de risco: dose sabidamente suficiente de alendronato de sódio para inativar os osteoclastos, por um tempo prolongado e a exodontia como um procedimento cirúrgico na região de maior acometimento (mandíbula).

Com isso, analisar os eventos de neoformação óssea no alveólo do segundo molar inferior, tipo do osso neoformado, a presença e atividade de células clásticas, além do efeito do medicamento na angiogênese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados no total 30 ratos machos com 7 semanas de vida divididos em 2 grupos: ALN e CTL, mantidos em salas climatizadas a 22°C, com alteração de luz de 12/12 horas. A alimentação e água fornecidos *ad libitum*.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com animais sob o parecer de aprovação 10/2009 (Anexo A).

4.2 ADMINISTRAÇÃO DE ALENDRONATO E DE SOLUÇÃO SALINA

A dose de alendronato utilizada foi de 2,5mg/kgpeso/dia diluído em 10ml de PBS subcutâneo (Brachaschia-Correa et al., 2007) pelo período de 14 dias anteriores ao procedimento cirúrgico (exodontia) e seguiu até o dia da eutanásia dos animais. Os animais controles receberam 10ml de PBS, no mesmo protocolo supracitado.

4.3 DIVISÃO DOS GRUPOS: ALENDRONATO E CONTROLE

Os animais foram divididos em 2 grupos: Grupo Alendronato (ALN) e Grupo Controle (CTL) e em 6 subgrupos, de acordo com os períodos estudados, 3 subgrupos no grupo ALN e 3 subgrupos no grupo CTL.

Subgrupos do Grupo ALN

ALN-7: Cinco animais foram eutanasiados 7 dias após a exodontia.

ALN-14: Cinco animais foram eutanasiados 14 dias após a exodontia.

ALN-21: Cinco animais foram eutanasiados 21 dias após a exodontia.

Subgrupos do Grupo CTL

CTL-7: Cinco animais foram eutanasiados 7 dias após a exodontia.

CTL-14: Cinco animais foram eutanasiados 14 dias após a exodontia.

CTL- 21: Cinco animais foram eutanasiados 21 dias após a exodontia.

4.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para as intervenções cirúrgicas (exodontias) foi utilizada uma solução relaxante muscular e anestésica, constituída de 2% cloridrato de 2-(6,6-xilidina)-5,6-dihidro-4-H-1,3-tiazina (Rompun®) diluída 1:1 em ketamina (Francotar®), 1ml/kg peso corpóreo. Como medicamento pós-operatório, ou seja, após a exodontia, foi administrado analgésico citoprofeno (Profenid®) durante 3 dias, 0,03ml para cada 100g de massa corpórea.

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ com posterior decapitação.

4.5 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Após a eutanásia, a hemi-mandíbula (lado direito) foi rapidamente dissecada (Figura 4.1), e cuidadosamente imersa em solução de glutaraldeído 2% +

formaldeído 2,5% (preparado do paraformaldeído), tamponado com cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 (Arana-Chavez et al., 1995). Todos os tecidos moles foram removidos. Os espécimes imersos em um beaker contendo 40ml de fixador em temperatura ambiente, os quais foram subsequenteemente colocados em um recipiente de vidro cheio de gelo e colocados em um forno de microondas de laboratório Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, CA, USA). A sonda termométrica do forno ficou imersa dentro do fixador e os espécimes foram imediatamente expostos a radiação de microondas por 3 ciclos de 5 minutos cada a temperatura máxima de 37°C (Massa ; Arana-Chavez, 2000; Arana-Chavez ; Nanci, 2001).

A fixação continuou a 4°C de temperatura, *overnight*. Após este período o material é lavado em tampão cacodilato 0,05M pH 7,4 em 6 ciclos de 10 minutos cada e então, seguiu para descalcificação em EDTA a 4,13% pH 7,3 por aproximadamente 30 dias, sob agitação constante

Após a descalcificação, as hemi-mandíbulas foram divididas ao meio no sentido longitudinal (Figura 4.2), sendo que 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 para análise ultra-estrutural.

Para análise histológica, foram obtidos cortes de 5µm corados em hematoxilina e eosina, cortes de 4µm foram obtidos para análise histoquímica para TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) e imuno-histoquímica para as proteínas osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e endogлина (CD 105).

Para análise ultra-estrutural, o material foi incluído em resina Spurr e obtidos cortes semi-finos de 1µm para posterior obtenção de cortes ultra-finos de 70-80nm de espessura.

Figura 4.1 - Hemi-mandíbula (lado direito) dissecada, após remoção de parte do incisivo central e parte do ramo ascendente

Figura 4.2 - Após a descalcificação, as hemi-mandíbulas foram divididas ao meio no sentido longitudinal

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes foram hidratados e corados com HE, posteriormente foram hidratados e diafanizados e as lamínulas montadas com Entellan® (Merk, Alemanha).

4.7 HISTOMETRIA

Para análise histométrica, utilizou-se o software ActionVision 4.7 da Carl Zeiss® e 4 cortes seriados de cada animal dos grupos estudados. Nelas, foram delineados os alvéolos dos dentes extraídos para obtenção da área em μm^2 (Fig. 1) para posterior mensuração do osso neoformado que preenchia esses alvéolos. Calculou-se a média aritmética das 4 medidas feitas em cada grupo e então, para o cálculo da área, os dados foram transformados em porcentagem da área de osso neoformado em relação à área do alvéolo. Realizou-se ainda, medições das cristas alveolares mesial e distal utilizando-se como referência o limite cemento-esmalte dos dentes adjacentes (primeiro molar inferior e terceiro molar inferior respectivamente) até os níveis da crista óssea do segundo molar inferior. Nas 4 medições de cada grupo foram também realizado o cálculo das médias aritméticas. As comparações foram feitas entre os grupos alendronato e controle nos diferentes tempos e entre os diferentes tempos de cada grupo.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística teve como objetivo comparar o Grupo ALN e CTL nos tempos 7, 14 e 21 dias. Os dados confrontados foram: a quantidade de osso formado no interior do alvéolo (em porcentagem), assim como a distância do limite cemento-esmalte do primeiro e terceiro molares até a crista alveolar mesial e distal,

respectivamente. Para isso, utilizou-se o programa SPSS versão 17.0 (*Statistical Package for Social Sciences*) e aplicou-se o teste *Mann-Whitney*.

4.9 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas por um minuto em solução de 3-aminopropytriethoxysilane (Sigma Chemical CO, St Louis, Mo/USA) a 10% em álcool absoluto seguiram desparafinização realizada 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 uma série descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada. Com a finalidade de se remover o pigmento do fixador, os cortes foram imersos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica a 95% durante 10 minutos. Posteriormente, lavadas em água corrente por 10 minutos e passados por dois banhos de água destilada de 5 minutos cada.

As lâminas utilizadas para realização da reação com o anti-corpo anti- CD-105 foram submetidas a recuperação antigênica em ácido cítrico pH 6,0 por 30 minutos em banho Maria e em seguida lavadas em água corrente por 10 minutos. Após essa lavagem, 2 banhos de água destilada foram realizados.

O bloqueio da peroxidase endógena (realizada para todos os anticorpos) 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 então, lavados em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, imersos em três banhos de solução de Tris pH7,4, por cinco minutos cada.

As lâminas foram submetidas a incubação durante 60 minutos em soro suíno (Sigma) para posteriormente serem incubados com os anticorpos primários que foram diluídos em solução BSA (mistura da solução A, contendo água destilada e albumina, com solução B contendo água destilada e azida sódica).

Para identificação da proteína osteopontina, foi utilizado o anticorpo anti-OPN, (policlonal, LF166 1:1200, Larry Fisher, NIH) e para identificação da proteína

sialoproteína óssea, foi utilizado o anticorpo anti-BSP, (policlonal LF100, 1:1.200, Larry Fisher, NIH) por 60 minutos, enquanto que para endoglina, o anticorpo anti-CD105 (BD Pharmingen, 1:50), *overnight*.

Para revelação foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St Luis MO/USA) por 7 minutos. Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada por 10 minutos.

Finalizada a coloração, os cortes foram desidratados em uma cadeia ascendente de etanol seguindo a seqüência de 70%, 90% e 100% durante 2 minutos cada banho e diafanização em xilol (2 banhos de 5 minutos cada).

As lâminas foram montadas em Permount (Fisher Scientific, Fair Law, NJ/USA) para exame em microscopia de luz.

A reação foi considerada positiva quando houve a presença da coloração castanha, condição caracterizadora da presença do cromógeno DAB, na reação de imuno-histoquímica, e negativa para os locais que não apresentavam coloração acastanhada. As lâminas foram observadas em microscópio de luz, modelo Olympus CX40. Utilizou-se a análise qualitativa dos resultados, evidenciando o local e o padrão de marcação das proteínas.

4.11 TÉCNICA DE HISTOQUÍMICA PARA FOSFASE ÁCIDA RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP)

Com o intuito de identificar células clásticas e seus precursores no osso alveolar, foi realizado o procedimento histoquímico para evidenciação da fosfatase ácida tartarato-resistente. Os cortes foram hidratados em uma série descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada. Em seguida, foi preparada a solução completa de Burstone, dissolvendo-se 4 mg de “naphotol AS-BI phosphate substrate” em 0,25 ml de N,N-dimetil-formamida, seguido da adição de 25 mL de tampão acetato 0,2M pH5,0, 35mg de Fast Red Violet LB ou Fast Garner GBC, e 60 µL de MgCl a 10%. Em seguida, 25 mL de solução em jarra Coplin foi filtrada e aquecida a 37°C, e à mesma foi adicionado D(-) ácido tartárico 50 mM. As lâminas de vidro contendo o material,

foram incubadas por 3h. Depois da incubação, as lâminas foram desidratados em uma cadeia ascendente de etanol seguindo a seqüência de 70%, 90% e 100% durante 2 minutos cada banho e diafanização em xilol (2 banhos de 5 minutos cada) e depois lavadas por 30 minutos em água corrente, deixadas pra secar a 25° C e contra-coradas com solução alcoólica de hematoxilina de Harris a 10% por aproximadamente 7 minutos (Bonafe-Oliveira et al., 2003).

Todas as lâminas foram cobertas com lamínula utilizando Entellan e observadas em microscópio de luz Nikon Optiphot II.

4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após o período de descalcificação, os espécimes foram novamente lavados em solução tampão, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 hora a temperatura ambiente, desidratados em crescentes concentrações de etanol, infiltrados e incluídos em resina Spurr. Corte semifinos de 1 µm de espessura foram obtidos em um micrótomo Microm HM 360 e corados com solução alcoólica de azul de toluidina e examinados em um microscópio de luz para seleção da região do alvéolo a serem analisadas. Cortes ultrafinos (70-80 nm de espessura) obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracut R ultramicrotome (Leica, Buffalo, NY, USA), foram coletados em telas de cobre. Os cortes coletados nas telas de cobre foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010, operado a 80 kV.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA TRAP

5.1.1 Grupo ALN-7

Nos cortes histológicos de todos os animais deste grupo foi possível observar o alvéolo sem recobrimento epitelial, preenchido por infiltrado inflamatório agudo na região cervical subjacente a área de necrose superficial e de colônia bacteriana (Tabela 5.1 e Figura 5.1A). Notou-se ainda, ausência de formação óssea no interior do alvéolo (Figura 5.1 A e Gráfico 5.1) e cristas alveolares não reabsorvidas (Figura 5.1-B; Gráficos 5.2 e 5.3). Inseridas a esta parede, notou-se, fibras do ligamento periodontal. Em maior detalhe, notamos que a crista alveolar que estava próxima a colônia bacteriana exibia lacunas de osteócitos vazias, características de necrose (Figuras 5.1 B e C). Adjacente ao alvéolo observou-se osteoclastos latentes, com formato arredondando e distantes das trabéculas ósseas, onde não foram vistas lacunas de Howship (Figura 5.1 D). Os osteoclastos latentes foram evidenciados na técnica histoquímica TRAP (Figura 5.1 E).

Tabela 5.1 - Aspectos histológicos de cada animal do Grupo ALN-7 avaliando-se cada item

ALN-7	Inflamação	Necrose	Epitélio	Bactéria
1	Presente	Sim	Ausente	Presente
2	Presente	Sim	Ausente	Presente
3	Presente	Sim	Ausente	Presente
4	Presente	Sim	Ausente	Presente
5	Presente	Sim	Ausente	Presente

Figura 5.1 - Fotomicrografias do Grupo ALN-7- A) Alvéolo (Al) preenchido por infiltrado inflamatório na porção cervical subjacente a área de necrose (*) em proximidade a bactérias (Bac). Osso alveolar (OA) não reabsorvido 25X. Osso alveolar (OA) necrótico adjacente ao infiltrado inflamatório presente no alvéolo (Al) 100X. C) Osso necrótico permeado por colônia bacteriana (Bac) (400X). D) Osso alveolar (OA) adjacente a osteoclastos latentes (OcL)(100x). Osteoclastos latentes (OcL) evidenciados na cor vermelha na histoquímica para TRAP (100X)

5.1.2 Grupo CTL-7

Nos cortes histológicos notou-se a formação de osso imaturo preenchendo aproximadamente 40% do alvéolo em todos os animais (Gráfico 5.1), além da reabsorção das cristas alveolares (Figura 5.2 A e Gráficos 5.2 e 5.3), mesmo nos animais que não exibiam epitélio recobrindo o alvéolo. As presenças de bactéria e inflamação, não impediram a reparação alveolar (Tabela 5.2). O osso imaturo que preenchia o alvéolo apresentava-se em remodelação, caracterizado por osteoblastos adjacentes às trabéculas e osteoclastos ativos formando lacunas de Howship (Figura 5.2 B). Os osteoclastos ativos foram observados também reabsorvendo cristas alveolares (Figura 5.2 C). O osso em remodelação exibia osteoclastos ativos (Figura 5.2.D) evidenciados através do método de histoquímica para TRAP (Figura 5.2 E).

Tabela 5.2 - Aspectos histológicos de cada animal do Grupo CTL-7 avaliando-se cada item

CTL-7	Inflamação	Necrose	Epitélio	Bactéria
1	Ausente	Nao	Presente	Ausente
2	Presente	Não	Ausente	Presente
3	Presente	Não	Presente	Presente
4	Presente	Não	Ausente	Presente
5	Ausente	Não	Presente	Presente

Figura 5.2 - Fotomicrografias do Grupo CTL-7 – A) Alvéolo (Al) exibindo recobrimento epitelial (E) e preenchimento com osso imaturo (OI). Observar setas (25X). B) Osso imaturo em remodelação, apresentando osteoclastos ativos (OcA) e osteoblastos (Ob) próximos ao osso imaturo (100X). Crista alveolar (CA) em processo de reabsorção adjacente a osteoclastos ativos (OcA) (100X). Osso imaturo em remodelação, osteoclastos ativos (OcA) aderidos a superfície trabecular (100X). Osteoclastos ativos (OcA) TRAP-positivos aderidos a trabéculas ósseas

5.1.3 Grupo ALN-14

Nos cortes histológicos observou-se o alvéolo recoberto por epitélio e preenchido por infiltrado inflamatório crônico na porção cervical, na minoria dos animais (Tabela 5.3). No interior do alvéolo, houve uma pequena quantidade de osso neoformado. (Gráfico 5.1), além da presença constante de bactéria (5/5) (Tabela 5.3 e Figura 5.3 A). Essas bactérias eram vistas em cristas alveolares não reabsorvidas que se apresentaram necróticas, mesmo nos alvéolos recobertos por epitélio, os quais apresentavam exocitose (Figura 5.3 B). Em maior detalhe notou-se que a formação óssea estava presente no fundo do alvéolo e lateralmente à parede alveolar (Figura 5.3 C), na região do ligamento periodontal (Figura 5.3 D). Em proximidade ao alvéolo, osteoclastos latentes e apoptóticos foram evidenciados na histoquímica para TRAP (Figura 5.3 E).

Tabela 5.3 Aspectos histológicos de cada animal do Grupo ALN-14 avaliando-se cada item

ALN-14	Inflamação	Necrose	Epitélio	Bactéria
1	Ausente	Sim	Presente	Presente
2	Presente	Sim	Ausente	Presente
3	Presente	Sim	Ausente	Presente
4	Presente	Sim	Ausente	Presente
5	Presente	Não	Presente	Presente

Figura 5.3 – Fotomicrografias do Grupo ALN-14 - A) Alvéolo (Al) exibindo recobrimento epitelial (E) subjacente a colônia bacteriana (Bac). Nota-se ainda, a crista alveolar (CA) não reabsorvida 25X. B) Crista alveolar em maior detalhe, apresentando infiltrado inflamatório e ausência de osteócitos (necrótico)(ON)100X. C) Região apical do alvéolo, observar setas direcionadas ao osso neoformado 25X. D) Parede lateral do alvéolo (Al) exibindo osso imaturo (OI) circundado por osteoblastos (Ob), em proximidade, nota-se osteoclasto latente (OcL)100X. E) Em histoquímica TRAP, observa-se osteoclastos latentes evidenciados em vermelho, assim como o osteoclasto apoptótico (OcAp)100X

5.1.4 Grupo CTL-14

Em cortes histológicos observaram-se alvéolos recobertos por epitélio e ausentes de inflamação em todos os animais (Tabela 5.4 e Figura 5.4 A). Aproximadamente 59,15% do alvéolo apresentaram-se preenchido por osso imaturo (Figura 5.4 B; Gráfico 5.1) além da reabsorção das cristas alveolares (Gráficos 5.2 e 5.3). A presença de bactéria em 2 animais não foi relacionada a nenhuma alteração óssea (Tabela 5.4). Os osteoclastos ativos puderam ser vistos em histoquímica para TRAP (Figura 5.4 C).

Tabela 5.4 - Aspectos histológicos de cada animal do Grupo CTL-14 avaliando-se cada item

CTL-14	Inflamação	Necrose	Epitélio	Bactéria
1	Ausente	Não	Presente	Presente
2	Ausente	Não	Presente	Ausente
3	Ausente	Não	Presente	Ausente
4	Ausente	Não	Presente	Ausente
5	Ausente	Não	Presente	Presente

Figura 5.4 – Fotomicrografias Grupo CTL-14 - A) Alvéolo apresentando recobrimento epitelial (E) e osso imaturo (OI) preenchendo o alvéolo, observar setas. B) Maior detalhe do osso imaturo (OI) adjacente a rimas de osteoblastos (Ob) 100X. Região próxima ao osso imaturo do alvéolo em remodelação. Osteoclastos TRAP-positivos adjacentes a trabécula óssea 100X

5.1.5 Grupo ALN-21

Os cortes histológicos exibiam alvéolo recoberto por epitélio e ausência de inflamação na maioria dos animais (Figura 5.5 A e Tabela 5.5), no entanto, o preenchimento alveolar não ultrapassou 25% do alvéolo (Gráfico 5.1). Apesar da presença do epitélio, notou-se crista alveolar necrótica em 4 animais (Tabela 5.5 e Figuras 5.5 B e C) em proximidade a colônia bacteriana, vista em todos os animais (Tabela 5.5). O osso necrótico foi observado em proximidade a bactérias. Osteoclastos latentes foram vistos na técnica de histoquímica para TRAP (Figura 5.5 E).

Tabela 5.5 - Aspectos histológicos de cada animal do Grupo ALN-21 avaliando-se cada item

ALN-21	Inflamação	Necrose	Epitélio	Bactéria
1	Presente	Sim	Ausente	Presente
2	Ausente	Sim	Presente	Presente
3	Ausente	Sim	Presente	Presente
4	Ausente	Sim	Presente	Presente
5	Presente	Não	Presente	Presente

Figura 5.5 – Fotomicrografias do Grupo ALN-21 – A) Alvéolo (Al) apresentando-se recoberto por epitélio (E), exibindo no seu interior pequena quantidade de osso imaturo evidenciado pelas setas. A crista alveolar (CA) permanece não reabsorvida 25X. B) Em maior detalhe, nota-se osso necrótico (ON) da crista alveolar subjacente ao epitélio (E) 400X. C) Crista alveolar do lado oposto, também necrótico (ON) subjacente ao recobrimento epitelial (E) 400X. Osso alveolar necrótico (ON) circundado por bactérias (Bac) 400x. Osteoclastos latentes (OcL) TRAP-positivos na região do osso alveolar 100X

5.1.6 Grupo CTL-21

Os cortes histológicos exibiram o alvéolo recoberto por epitélio e preenchido quase em sua totalidade por osso neoformado (Gráfico 5.1), ausentes de inflamação, de fibras remanescentes do ligamento periodontal e de necrose óssea (Tabela 5.6 e Figura 5.6 A), e cristas alveolares em remodelação (Gráficos 5.2 e 5.3 e Figuras 5.6 B e C), exibindo osteoclastos ativos, também observados em TRAP (Figura 5.6 E). A presença de bactéria em um animal não foi relacionada a nenhuma alteração óssea (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 Aspectos histológicos de cada animal do Grupo CTL-21 avaliando-se cada item

CTL-21	Inflamação	Necrose	Epitélio	Bactéria
1	Ausente	Não	Presente	Presente
2	Ausente	Não	Presente	Ausente
3	Ausente	Não	Presente	Ausente
4	Ausente	Não	Presente	Ausente
5	Ausente	Não	presente	Ausente

Figura 5.6 – Fotomicrografias do Grupo CTL-21 – A) Alvéolo (Al) recoberto por epitélio e preenchido quase em sua totalidade por osso imaturo (OI) evidenciados por setas 25X. B) Maior detalhe da crista alveolar (CA) em remodelação, nota-se osteoblastos (Ob) ativos 400X. C) Osso imaturo (OI) circundado por osteoblastos (Ob) 400X. Osteoclastos ativos (OcA) reabsorvendo osso em remodelação na região do alvéolo 400X. E) Osteoclastos TRAP-positivos (Oc) adjacentes a trabéculas ósseas

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

5.2.1 Análise do preenchimento alveolar com osso neoformado

Os resultados das quantidades de osso neoformado em porcentagem em relação ao tamanho do alvéolo estão na tabela 5.8 e no Gráfico 5.1, comparando-se os diferentes grupos nos diferentes períodos estudados.

Para análise dos dados, aplicou-se o teste de *Mann-Whitney*, considerando diferença estatisticamente significativa quando o valor de $p < 0,05$.

Tabela 5.7 – Quantidade de osso neoformado em relação ao tamanho do alvéolo, em porcentagem

	7 dias	14 dias	21 dias
Alendrontato	0	7,31%	24,75%
Controle	38,56%	59,15%	59,69%

Gráfico 5.1 - Quantidade de osso neoformado que preencheu o alvéolo nos diferentes períodos. (7 dias $p=0,028$; 14 dias $p=0,014$; 21 dias $p=0,021$)

5.2.2 Análise da crista mesial

As distâncias dos limites cemento-esmalte do primeiro molar até a crista mesial do segundo molar estão na tabela 5.8 e a comparação dessas distâncias entre os grupos nos diferentes períodos estão no gráfico 5.2.

Tabela 5.8 – Distâncias do limites cemento-esmalte do primeiro molar até a crista mesial do segundo molar

	7 dias	14 dias	21 dias
Alendronato	256,66	217,93	186,38
Controle	327,74	330,19	340,68

Gráfico 5.2 - Distância do limite cemento-esmalte dos primeiros molares até a crista mesial do segundo molar em μm . 7 dias $p=0,275$; 14 dias $p=0,083$; 21 dias $p=0,049$)

5.2.3 Análise da crista distal

A distância do limite cemento-esmalte do terceiro molar até a crista distal do segundo molar estão na tabela 5.9 e a comparação dessas distâncias entre os grupos nos diferentes períodos estão no gráfico 5.3.

Tabela 5.9 – Distâncias do limites cemento-esmalte do primeiro molar até a crista mesial do segundo molar

	7 dias	14 dias	21 dias
Alendronato	223,42	105	174,72
Controle	266,11	342,09	369,90

Gráfico 5.3 - Distância do limite cemento-esmalte dos terceiros molares até a crista distal do segundo molar em μm . 7 dias $p=0,513$; 14 dias $p=0,035$; 21 dias $p=0,049$)

5.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os resultados das reações de imuno-histoquímica foram analisadas qualitativamente averiguando-se a localização e o padrão de marcação das proteínas osteopontina e sialoproteína óssea nos diferentes estágios da reparação alveolar.

5.3.1 Osteopontina (OPN) e Sialoproteína óssea (BSP)

A expressão das proteínas OPN e BSP foi observada no tecido ósseo evidenciada pela coloração acastanhada, encontrada tanto circundando os molares, como também no tecido ósseo neoformado, local onde a análise foi realizada.

Como previamente descrito, nos animais controles, a produção de matriz óssea e conseqüentemente, de osso imaturo no interior do alvéolo iniciou-se após 7 dias da exodontia, diferente do grupo ALN e por isso, a reação de imuno-histoquímica foi realizada em todos os animais de todos os grupos CTL, diferente dos grupos ALN, os quais a reação foi realizada somente nos grupos ALN-14 e 21.

A expressão da proteína OPN nos animais CTL-7, mostrou-se heterogênea: evidente na região de osso imaturo (espaços interfibrilares) e em linhas cimentantes e pouco evidente em região de osso maduro (Figura 5.7 A).

A expressão da proteína BSP mostrou-se granular e heterogênea. Observou-se uma marcação tênue na região de osso maduro e mais evidente nas áreas de osso imaturo das trabéculas ósseas (Figura 5.7 B).

No 14º dia em ambos os grupos para ambas as proteínas, a marcação permaneceu com o mesmo padrão, ou seja, nas áreas de osso imaturo e linhas cimentantes, nota-se maior concentração das proteínas. Eventualmente nota-se osteoblastos imunopositivos (Figuras 5.8 A e B e 5.9 A e B).

No 21º dia, a marcação mostrou-se semelhante ao 14º dia, observando-se o mesmo padrão de marcação nos diferentes grupos e em ambas as proteínas (Figuras 5.10 A e B e 5.11 A e B).

Nos animais tratados, a formação de tecido ósseo só foi observada no 14º dia, porém o padrão de distribuição das proteínas se mostrou semelhante aos animais controles.

Figura 5.7 – Fotomicrografias do Grupo CTL-7 – A) Marcação imuno-histoquímica para a proteína OPN. Marcação evidente em linhas cimentantes e regiões de osso imaturo 400X. B) Marcação imuno-histoquímica para a proteína BSP. Marcação granular evidente em todo osso imaturo e tênue no osso maduro 400X

Figura 5.8 – Fotomicrografias do Grupo ALN-14 – A) Marcação imuno-histoquímica da proteína OPN evidente em linhas cimentantes (lc) 400x. B) Marcação imuno-histoquímica para BSP evidente na região de osso imaturo (OI) e tênue em regiões de osso maduro (OM) 400X

Figura 5.9 – Fotomicrografia do Grupo CTL-14 – A) Marcação imuno-histoquímica para proteína OPN. Marcação evidente no osso imaturo (OI) e em linhas cimentantes (Ic) e tênue em região de osso maduro (OM). Observa-se ainda, alguns osteoblastos positivos (Ob) 400X. B) Marcação imuno-histoquímica para BSP. Marcação em linhas cimentantes (Ic) e osso imaturo (OI) 400X

Figura 5.10– Fotomicrografias do Grupo ALN-21 – A) Marcação imuno-histoquímica para proteína OPN, marcação evidente em linhas cimentantes (lc) e osso imaturo (OI) e marcação tênue em regiões de osso maduro (OM) 400X. Marcação imuno-histoquímica para a proteína BSP, nota-se marcação granular distribuída em região de osso maduro. Nota-se ainda, marcação tênue em região de osso maduro (OM)

Figura 5.11 – Fotomicrografia do Grupo CTL-21 – A) Marcação imuno-histoquímica evidente para OPN em região de osso imaturo e linhas cimentantes (Ic) e marcação tênue em região de osso maduro (OM) 400X. B) Marcação imuno-histoquímica para BSP evidente em osso imaturo (Ol) e linhas cimentantes (Ic) e tênue em osso maduro (OM)

5.3.2 Endogлина

Os resultados das reações de imuno-histoquímica para a proteína endogлина, imunoexpressas em vasos sanguíneos neoformados, foram analisados quantitativamente, comparando-se a média da quantidade de vasos neoformados entre os grupos ALN-7 com CTL-7 e ALN-14 com ALN-21 (Tabela 5.10).

Os animais do Grupo ALN-7, mostraram menor quantidade de vasos sanguíneos imunopositivos para anti-endogлина quando comparados ao animais do Grupo CTL-7 (Figura 5.12).

No entanto, nos Grupo ALN-14 e CTL-14 a quantidade de vasos sanguíneos mostrou-se semelhantes entre os grupos (Figura 5.13).

Tabela 5.10 - Número de vasos sanguíneos em cada grupo, nos períodos: 7 e 14 dias

	7 dias	14 dias
ALN	22	14
CTL	35	17

Figura 5.12 – Fotomicrografia de reações de imuno-histoquímica para a proteína endoglina (Cd-105) dos grupos: CTL-7 e ALN-7 - A) Grupo CTL-7 -marcação positiva para diversos vasos sanguíneos (vs) neoformados do interior do alvéolo 400X. B) Grupo ALN-7 - Marcação positiva em poucos vasos sanguíneos (vs) neoformados 400X

Figura 5.13 – Fotomicrografia de reações de imuno-histoquímica para a proteína endoglina (CD-105) nos grupos CTL-14 e ALN-14 - A) Grupo CTL-14, marcação imuno-histoquímica positiva para vasos sanguíneos (vs) neoformados. B) Grupo ALN-14, marcação imuno-histoquímica para os vasos sanguíneos (vs) neoformados 400X

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

5.4.1 Grupo ALN-7

Nos cortes ultrafinos foi possível observar no Grupo ALN-7 o alvéolo preenchido por infiltrado inflamatório com presença de macrófagos exibindo fibrilas colágenas em fagossomos (Figura 5.14 A). Ao examinar-se a parede lateral do osso alveolar observaram-se áreas de osso alveolar não reabsorvido com fibras de Sharpey inseridas (Figura 5.14 B). Em proximidade a este osso alveolar, observou-se alguns osteoclastos, porém, com curta zona de adesão e sem borda em escova evidente (Figura 5.14 C). Por vezes, observaram-se camadas de material amorfo sobre a matriz óssea, caracterizando uma área hialinizada (Figura 5.14 D).

5.4.2 Grupo CTL-7

Nos animais controles notaram-se osteoblastos ativos e polarizados arranjados de forma epitelióide na superfície do osso alveolar. Estas células apresentaram retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi bem desenvolvidos, núcleo na região basal com cromatina frouxa, característicos de células em intensa atividade de síntese e secreção. Os osteoblastos apresentaram-se adjacentes a matriz de osso imaturo, caracterizado pela desorganização de suas fibrilas colágenas com numerosos espaços interfibrilares contendo osteócitos. Entre os osteoblastos e a matriz óssea, notou-se uma evidente camada de osteóide (Figura 5.15 A).

Foram claramente observadas linhas cimentantes entre o osso maduro e o osso imaturo posteriormente secretado (Figura 5.15 B).

Figura 5.14 – Eletronmicrografias de transmissão do Grupo ALN-7 – A) Interior do alvéolo (Al) exibindo células inflamatórias e macrófago com fibras colágenas em seu fagossomo 3.000X. B) Parede lateral do osso alveolar (AO) exibindo fibras de Sharpey (fs) inseridas 2675X. C) Osteoclasto latente (OcL) apresentando pequena zona de adesão no osso alveolar, o qual exibe fibras de Sharpey (fs) remanescentes inseridas 2.750X. D) fibras de Sharpey (fs) inseridas no osso alveolar que apresenta faixa de hialinização (h) 3.600X

Figura 5.15 – Eletronmicrografia de transmissão do Grupo CTL-7 – A) Osso imaturo (OI) exibindo osteócitos em lacuna (Ot) e osteoblastos (Ob) na superfície, com uma típica disposição epitelióide . Entre o osso imaturo e os osteoblastos, nota-se camada de osteóide (o) 3.600X. B) Linha cimentante (lc) presente entre o osso imaturo (OI) e osso maduro (OM) 8.800X

5.4.3 Grupo ALN-14

Nos animais tratados, notou-se o alvéolo preenchido por células conjutivas reparativas, além de inúmeros fibroblastos (Figura 5.16 A). Ainda neste período, notaram-se fibras de Sharpey inseridas na parede lateral do osso alveolar não remodelado. Observou-se ainda, uma pequena faixa de tecido ósseo imaturo caracterizado por inúmeros espaços interfibrilares (Figura 5.16 B).

Em algumas áreas foi possível observar osso alveolar exibindo lacunas de osteócitos vazias, caracterizando sua necrose. Neste período também foi possível observar área amorfa de hialinização, adjacentes a osso alveolar não reabsorvido contendo fibras de Sharpey (Figura 5.16 C e D). Adjacente ao osso alveolar notou-se osteoclastos sem borda em escova (Figura 5.16 E).

5.4.4 Grupo CTL-14

Neste grupo, observou-se numerosas áreas de matriz de osso imaturo com osteócitos recém englobados em lacunas, indicando atividade osteoblástica (Figura 5.17 A). Adjacente ao osso alveolar, notaram-se osteoclastos com borda em escova desenvolvida (Figura 5.17 B).

Figura 5.16 – Eletronmicrografia do Grupo ALN-14 – A) Fibroblastos (fb) no interior do alvéolo (Al). B) Parede do osso alveolar (OA) em proximidade a camada de osso imaturo (OI) recém formado no interior do alvéolo (Al) 7.500X. C) camada hialinizada (h) recobrendo osso alveolar necrótico (ON) exibindo lacuna de osteócito vazia (*)2500X. D) Fibras de Sharpey (fs) do osso alveolar adjacente a área hialinizada (h) 8000X. E) Parede lateral do osso alveolar com fibras de Sharpey (fs) circundada por área hialinizada (h). F) Osteoclasto latente (OcL) adjacente ao osso alveolar 2500X

Figura 5.17 – Eletronmicrografia de transmissão do Grupo CTL-14 – A) Osso imaturo (OI) exibindo osteócito em lacuna (Ot) 4.600X. B) Osteoclasto ativo (OcA) exibindo borda em escova (be) adjacente ao osso alveolar (OA)4.400X

5.4.5 – Grupo ALN-21

Os aspectos ultra-estruturais dos animais deste grupo foram semelhantes ao do grupo ALN-14

5.4.6 – Grupo CTL-21

Os aspectos ultra-estruturais dos animais deste grupo foram semelhantes do do grupo CTL-14.

6 DISCUSSÃO

O alendronato de sódio (ALN) provocou áreas de leve osteonecrose dos ossos maxilares relacionada a bisfosfonatos (OMRB) nos alvéolos da mandíbula de ratos após exodontia do segundo molar, a qual foi detectada em todos os períodos estudados. Por outro lado, a interferência do medicamento na formação de osso na reparação alveolar, sugere um efeito na diferenciação de osteoblastos, além da conhecida supressão na atividade osteoclástica.

O presente trabalho é o primeiro a mostrar evidências experimentais de algum grau de OMRB após o tratamento com ALN. Essa desordem correspondeu ao estágio zero, representado, em pacientes, pela permanência da lâmina dura (isto é, o osso alveolar) por um longo período após a exodontia observado em exames radiográficos (Ruggiero et al., 2009). Para tanto se utilizou um modelo em ratos associando alendronato de sódio a um procedimento cirúrgico na mandíbula, a exodontia. Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da OMRB é o procedimento cirúrgico e a mandíbula é o local mais acometido pela OMRB (Diel et al., 2007), provavelmente pela diferença na vascularização entre a maxila e a mandíbula e pela presença de áreas de osso compacto mais espessas na mandíbula do que na maxila. O segundo molar inferior foi selecionado com o intuito de aumentar o índice de sucesso cirúrgico, diminuindo a possibilidade de fraturas radiculares e de trauma local, levando-se em consideração a anatomia deste dente, que ao contrário do primeiro molar, não possui raízes divergentes, enquanto que o alvéolo do terceiro molar é o de menor tamanho, limitando o estudo.

Além das importantes considerações em relação à presença de OMRB devido à associação entre o tratamento com o bisfosfonato alendronato e um procedimento cirúrgico na mandíbula de ratos, cuja discussão será enfatizada em maior detalhe, o presente estudo avalia os eventos da reparação alveolar comparáveis àqueles que ocorrem em humanos. Alguns trabalhos utilizam o alvéolo do incisivo superior do rato como modelo experimental para o estudo da reparação alveolar (Luvizuto et al., 2010; Ricieri et al., 2009; Okamoto et al., 2006). Entretanto, devido ao seu crescimento contínuo, o incisivo do rato possui características especiais diferentes dos dentes humanos e seus tecidos dentários e periodontais se dispõem de maneira

particular: na sua face palatina (ou lingual), a dentina é revestida por cimento, que está em contato com ligamento periodontal; diferentemente, na sua face vestibular a dentina é revestida por esmalte, que é recoberto por um órgão do esmalte e está em contato com um folículo dentário, constituído por células indiferenciadas (Marks ; Schroeder, 1996). Por essa razão, após a extração do incisivo de rato, seu alvéolo apresenta populações diferentes de células remanescentes.

O bisfosfonato utilizado foi o alendronato de sódio, por ser o medicamento mais utilizado para o tratamento da osteoporose e segundo Ruggiero et al. (2009) cerca de 190 milhões de pessoas fazem uso desse medicamento em todo o mundo. No entanto, a casuística de OMRB é maior em pacientes que fazem tratamento com o ácido zoledrônico, devido a sua potência e afinidade ao osso (Marx et al., 2005; Migliorati et al., 2005; Woo et al., 2006).

Além do procedimento cirúrgico, os outros fatores de risco para a OMRB são a dose e o tempo de exposição ao bisfosfonato (Dannemann et al., 2007). No entanto, é difícil mensurar o efeito dose-tempo do medicamento em animais, principalmente quando administrado oralmente, sendo impossível calcular a quantidade efetivamente ingerida pelos ratos. Outra dificuldade é transmitir a dose do humano aos animais, sabendo da diferença da taxa metabólica basal de cada organismo (Brito, 2004), e a diferença de absorção do medicamento nas diferentes vias de administração. Nosso trabalho objetivou utilizar uma dose que certamente provocaria efeitos em osso; por isso, utilizamos uma dose inicialmente padronizada por Massa et al. (2006) e posteriormente por Bradaschia-Correa et al. (2007), sendo que neste último foi constatado a inibição da atividade osteoclástica e a falta de remodelação do osso primário, que persistiu ao redor do germe dentário. Trabalhos anteriores com ALN em ratos, não causaram OMRB, justificada pelo uso de doses menores (1,0 a 150 mg/kg peso) que do presente estudo, tendo como resultado, atraso na reparação alveolar nos períodos iniciais (Azuma et al., 1998; Grier ; Wise 1998; Hikita et al., 2009; Aguirre et al., 2010).

A ausência de remodelação óssea dos animais tratados com ALN, caracterizada pela presença de osteoclastos latentes TRAP-positivos, foi observada também em proximidade a áreas de com aspecto hialinizado (área necrótica isentas de elementos celulares) vista somente em microscopia eletrônica de transmissão. Essas áreas podem também ser vistas ultra-estruturalmente em regiões do osso

alvolar em dentes submetidos a força ortodôntica contínua (Bonafe-Oliveira et al., 2003; Mateus, 2009).

Em adição a estes eventos, notou-se a supressão da diferenciação osteoblástica, evidenciada pelo claro atraso na neoformação óssea nos animais tratados, que só foi observada em pouca quantidade, após 14 dias da exodontia (30%) e discretamente aumentada no 21º dia, concordando com outros estudos *in vivo* (Evans, 2002). No entanto, Xiong et al. (2009), descrevem que o ALN aumenta a proliferação e maturação de osteoblastos *in vitro*, assim como Von Knoch et al (2005), e Shindeler e Little (2005), que descreveram que osteoblastos em cultura com diferentes protocolos de ácido zoledrônico resultaram em pequeno aumento na expressão de fosfatase alcalina, concluindo que o ácido zoledrônico não interfere diretamente nesta célula, ao contrário de trabalhos *in vivo* e em observações em pacientes (Rauch et al., 2002; Odvina et al., 2005), onde foi relatada a diminuição da formação óssea.

A discordância dos resultados encontrados em trabalhos *in vivo* e *in vitro*, pode ser justificada pela análise isolada de osteoblastos, esquecendo-se da relação entre osteoclastos e osteoblastos no processo de remodelação óssea. Nossos resultados sugerem que é possível que o alendronato de sódio apresente um efeito indireto nos osteoblastos, através da interferência na comunicação osteoclasto-osteoblasto (atividade *coupling*), em concordância com Evans (2002) que observou que quando essas células estão em co-cultura em contato com bisfosfonatos, a atividade de osteoblastos apresenta-se diminuída, o que não é observado, por exemplo, em pacientes com osteopetrose, onde a inatividade de osteoclastos não inibe a atividade osteoblástica (Alatalo et al., 2004).. o que mostra que nem sempre as desordens ósseas, alteram a função de ambas as células. Estudos com a via do IGF e TGF- β são necessários para confirmação desse dado (Hayden et al., 1995; Centrella et al., 1991). Outra hipótese sugerida, é que o efeito antiosteogênico seja em decorrência da diminuição da angiogênese, (que será discutida posteriormente) que pode minimizar a diferenciação de osteoblastos (Gerber ; Ferrara, 2000).

Adicionalmente, nos animais tratados, notaram-se áreas de osteóide circundadas por osteoblastos na parede lateral do osso alveolar não reabsorvida, indicando que a diferenciação de células do ligamento periodontal, essencial para a reparação alveolar (Todo, 1968a) não foi afetada, mesmo quando o ALN é administrado por um tempo prolongado em altas doses. Resultados semelhantes

foram obtidos por Lekic et al. (1997) que demonstraram que o etidronato (bisfosfonato de baixa potência,) modula a proliferação de células do ligamento periodontal em osteoblastos, contribuindo para formação de osso alveolar, sugerindo que os demais efeitos osteogênicos possivelmente tenham sofrido interferência do medicamento, como descrito anteriormente.

Em contraste, nos animais controles, a presença de colônias bacterianas e infiltrado inflamatório não impediu a reparação alveolar. Aproximadamente 30% do alvéolo, sete dias após a exodontia, apresentava-se preenchido por osso imaturo em fase de remodelação óssea, caracterizado por osteoclastos e osteoblastos ativos. Todo et al. (1968 a, b) descreveram que trabéculas ósseas imaturas são vistas no fundo do alvéolo, já nos primeiros dias da reparação alveolar, assim como inúmeros osteoclastos adjacentes as paredes alveolares. Este processo ocorreu também nas cristas do osso alveolar que apresentou seu pico de reabsorção neste período e manteve-se até o último dia estudado, confirmado na análise histomorfométrica, concordando com o estudo de Weinreb et al. (1994) que constataram a preservação da altura óssea em macacos com periodontite induzida, os quais eram posteriormente tratados com ALN.

Todavia, após 14 e 21 dias da exodontia nos animais controles, foi possível observar aproximadamente 60% do alvéolo preenchido por osso neoformado, recobrimento epitelial e na minoria deles, a presença de bactérias, o que não esteve relacionado com OMRB ou com outra alteração óssea. Os osteoclastos TRAP-positivos mostraram-se ativos, assim como os osteoblastos, os quais estavam presentes na interface processo alveolar-alvéolo secretando matriz óssea, exibindo características ultra-estruturais típicas de células sintetizadoras e secretoras de proteínas.

A imunopositividade heterogênea das proteínas OPN e BSP nas trabéculas ósseas neoformadas é explicada pela diferença nos estágios de remodelação óssea. O osso imaturo apresenta maior número de espaços interfibrilares, locais onde as proteínas não colágenas são abundantes (Katchiburian ; Arana-Chavez, 2004) e, portanto, a marcação imuno-histoquímica nesta região foi mais evidente. Na área mais madura (área periférica), os espaços interfibrilares são menores, refletindo na marcação mais tênue das proteínas estudadas (Zohar et al.,1997).

A presença do osso alveolar não remodelado nos animais tratados, que permaneceu praticamente com a mesma altura desde a extração até o último

período estudado, explica-se pela notável inatividade dos osteoclastos, os quais se mostravam TRAP-positivos, porém, distantes das trabéculas ósseas, com formato arredondado e por vezes, com núcleo picnótico, de menor tamanho, caracterizando o processo de apoptose. Esse achado não é esperado nestas fases, já que o osso alveolar é reabsorvido nos primeiros dias subseqüentes à extração dentária. De fato, o osso alveolar constitui ao lado do ligamento periodontal e do cimento, o periodonto de inserção ou sustentação do dente, formado na fase de dentinogênese radicular. Assim, na ausência do dente, o osso alveolar perde sua função, e então, é rapidamente reabsorvido (Katchburian ; Arana-Chavez, 2004). Todavia, neste caso, o osso alveolar permaneceu em contato com colônias bacterianas, o que provavelmente ocasionou a necrose superficial observada na crista alveolar desses animais, características essas, vistas radiograficamente em pacientes com OMRB em estágio inicial (Ruggiero et al., 2009), que neste estudo, foi observada histologicamente. Diferentemente dos animais tratados com ALN, a presença de bactérias nos animais controles em todos os períodos teve distribuição variável no alvéolo, sem causar efeito no osso remanescente.

A necessidade da infecção bactérias na OMRB parece ser essencial, já que a cavidade oral é o local de acometimento da OMRB e propícia para este fato. Kobayashi et al., 2010, descreveram que devido ao fato dos ratos viverem em ambiente livre de germes, não observou a presença de bactérias no alvéolo após a exodontia e por este motivo, sua análise microbiológica baseou-se no efeito do ácido zoledrônico em cultura de bactérias de humanos em contato com tecido mineralizado, concluindo que este medicamento proporciona maior proliferação e aderência de *streptococcus mutans* na hidroxiapatita, aumentando a infecção bacteriana.

Hansen et al. (2007) descreveram que em exames histológicos de seqüestro ósseo de pacientes com OMRB observa-se um quadro heterogêneo: áreas de osso necrótico e áreas de osso vital, que apresentavam-se, invariavelmente, infectados. Esses achados corroboram com o estudo de Kumar et al., 2010 que descrevem que a presença de bactéria é essencial para o desenvolvimento da ONC, que segundo os autores, se trata de um tipo de osteomielite.

Em contraste Sonis et al. (2009) e Bi et al. (2010), reportaram modelos de OMRB em ratos tratados com ácido zoledrônico associado ou não a dexametasona, onde não eram observados a presença de bactéria e inflamação. Essa observação é

improvável de ser vista em pacientes com OMRB já que a maioria dos casos é subsequente a exodontia de dentes comprometidos periodontalmente e, portanto, a região apresenta-se colonizada por microorganismos patogênicos. No entanto, Etminan et al. (2009) observaram uma associação entre bisfosfonatos orais e OMRB asséptica não específica em um grupo de pacientes idosos com distúrbios cardiovasculares.

Outro aspecto relacionado à OMRB é a participação da vascularização e, portanto, dos eventos de angiogênese. No presente estudo, principalmente nos estágios iniciais da reparação alveolar, notou-se vasos sanguíneos imunopositivos para endogлина, em número reduzido nos animais tratados, quando comparado com os animais controles, efeito esperado do bisfosfonato, observado e descrito mesmo antes dos casos de OMRB serem relatados (Nemoto et al., 1990; Fournier et al., 2002; Wood et al., 2002). Assim, sabendo-se que a angiogênese é um processo fisiológico essencial para a adequada reparação alveolar (Wood et al., 2002), o presente estudo corrobora os trabalhos de Kobayashi et al. (2010); Aguirre et al. (2010) e Bi et al. (2010), os quais observaram a supressão da angiogênese em ratos tratados com bisfosfonatos afirmando que este seria uma das causas da osteonecrose.

Os benefícios do tratamento com o ALN são indiscutíveis, por isso, a hipótese de descontinuação do uso deste medicamento não deve ser considerada. Nesse sentido, os achados do estágio inicial desse efeito colateral encontrados no presente estudo, colaboram para a compreensão da OMRO. Estudos futuros devem ser considerados utilizando-se maior tempo de exposição ao ALN para a possível análise da progressão do estágio inicial visto neste trabalho, até estágios mais avançados de OMRB, na tentativa de delinear o tratamento e possivelmente a prevenção desse efeito colateral.

7 CONCLUSÕES

- A dose e o tempo de administração do alendronato de sódio causaram grau leve de osteonecrose na mandíbula dos ratos, após a exodontia do segundo molar.
- O tratamento com alendronato de sódio atrasou a formação óssea no interior do alvéolo;
- O tratamento com alendronato sugeriu a diminuição da angiogênese nos estágios iniciais da reparação alveolar;
- A expressão das proteínas OPN e BSP não pareceu alterada no osso neoformado nos animais tratados com alendronato em nenhum período estudado.

REFERÊNCIAS²

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 May 30. [Epub ahead of print]

Alakangas A, Selander K, Mulari M, et al. Alendronate disturbs vesicular trafficking in osteoclasts. *Calcif Tissue Int*. 2002 Jan;70(1):40-7.

Alatalo SL, Ivaska KK, Waguespack SG, Econs MJ, Väänänen HK, Halleen JM. Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis). *Clin Chem*. 2004 May;50(5):883-90.

Allen MR, Kubek DJ, Burr DB, Ruggiero SL, Chu TM. Compromised osseous healing of dental extraction sites in zoledronic acid-treated dogs. *Osteoporos Int*. 2010 May 11. [Epub ahead of print]

Almazrooa SA, Woo SB. Bisphosphonate and nonbisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review. *J Am Dent Assoc*. 2009 Jul;140(7):864-75.

Arai N, Ohya K, Kasugai S, Shimokawa H, Ohida S, Ogura H, Amagasa T. Expression of bone sialoprotein mRNA during bone formation and resorption induced by colchicine in rat tibial bone marrow cavity. *J Bone Miner Res*. 1995 Aug;10(8):1209-17.

Arana-Chavez VE, Soares AM, Katchburian E. Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 1995 Aug;58(3):285-92.

Arana-Chavez VE, Nanci A. High-resolution immunocytochemistry of noncollagenous matrix proteins in rat mandibles processed with microwave irradiation. *J Histochem Cytochem*. 2001 Sep;49(9):1099-109.

Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, Tsuji K, Shinomiya K, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology*. 2001 Mar;142(3):1325-32.

² De acordo com Estilo Vancouver.

Azuma Y, Oue Y, Kanatani H, Ohta T, Kiyoki M, Komoriya K. Effects of continuous alendronate treatment on bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats: comparison with pamidronate and etidronate in growing rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Jul;286(1):128-35.

Bamias A, Kastitis E, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukou V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C, Terpos E, Dimopoulos MA. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 1;23(34):8580-7.

Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):584-94.

Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Mar;8(3):212-26.

Bi Y, Gao Y, Ehrichtou D, Cao C, Kikuri T, Le A, Shi S, Zhang L. Bisphosphonates Cause Osteonecrosis of the Jaw-Like Disease in Mice. *Am J Pathol.* 2010 May 14. [Epub ahead of print]

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int.* 1991 Dec;49(6):421-6.

Bonafe-Oliveira L, Faltin RM, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and histochemical examination of alveolar bone at the pressure areas of rat molars submitted to continuous orthodontic force. *Eur J Oral Sci.* 2003 Oct;111(5):410-6.

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 Dec;330(3):475-85.

Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, Fenton R, Gahres N, Sausville E, Ord R, Meiller T. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncol.* 2006 Feb 20;24(6):945-52.

Brito, H. F. V. Determinação da taxa metabólica basal em *Dasyprocta azarae* por calorimetria indireta [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2004.

Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*. 1995 Dec;1(12):1623-34.

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1991 Oct;73(9):1418-28.

Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res*. 1992 Aug;7(8):987-97.

Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Jun;6(3):307-12.

Dannemann C, Grätz KW, Riener MO, Zwahlen RA. Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy: a severe secondary disorder. *Bone*. 2007 Apr;40(4):828-34.

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*. 1993 Dec;7(15):1475-82.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*. 2001 May;107(9):1055-61.

Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:92-102.

Derynck R, Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 24;1333(2):F105-50.

Diel IJ, Bergner R, Grötz KA. Adverse effects of bisphosphonates: current issues. *J Support Oncol*. 2007 Nov-Dec;5(10):475-82.

Dimopoulos MA, Kastritis E, Anagnostopoulos A, Melakopoulos I, Gika D, Mouloupoulos LA, Bamia C, Terpos E, Tsionos K, Bamias A. Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: evidence of increased risk after treatment with zoledronic acid. *Haematologica*. 2006 Jul;91(7):968-71.

Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res.* 1995 Nov;10(11):1666-80.

Durie BGM, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate (Letter). *N Engl J Med* 2005; 353:99.

Ebetino FH, Bayless AV, Amburgey J, Ibbotson KJ, Dansereau S, Ebrahimpour A. Elucidation of a pharmacore for the bisphosphonate mechanism of bone antiresorptive activity. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 1996;109/110:217–20.

Ebrahimpour A, Francis MD. Bisphosphonate therapy in acute and chronic bone loss: physical chemical considerations in bisphosphonate-related therapies. In: Bijvoet O, Fleisch HA, Canfield RE, Russell RGG eds. *Bisphosphonates on Bones*. Amsterdam, Holland: Elsevier Science; 1995:125–36.

Etminan M, Aminzadeh K, Matthew IR, Brophy JM. Use of oral bisphosphonates and the risk of aseptic osteonecrosis: a nested case-control study. *J Rheumatol* 2009; 35:691-5.

Evans CE. Bisphosphonates modulate the effect of macrophage-like cells on osteoblast. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 May;34(5):554-63.

Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1990 265:2347-51.

Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, Natali PG, Altomonte M, Maio M. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):2037-43.

Fournier P, Boissier S, Filleur S, . Bisphosphonates inhibit angiogenesis *in vitro* and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6538-44.

Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals *in vitro* and pathological calcification *in vivo*. *Science.* 1969. Sep 19;165(899):1264-6.

Franzén A, Heinegård D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*. 1985 Dec 15;232(3):715-24.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-98.

Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 Jul;10(5):223-8.

Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1990 May 25;265(15):8361-4.

Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Sep;302(3):1055-61.

Grier RL 4th, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res*. 1998 Jan;77(1):8-15.

Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1985 May;43(5):359-64.

Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Reszka AA. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone*. 2001;29:553-9.

Hansen T, Kunkel M, Springer E, Walter C, Weber A, Siegel E, Kirkpatrick CJ. Actinomycosis of the jaws--histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Arch*. 2007 Dec;451(6):1009-17.

Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ. The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone*. 1995 Aug;17(2 Suppl):93S-98S.

Helfrich MH, Nesbitt SA, Dorey EL, Horton MA. Rat osteoclasts adhere to a widerange of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin. *J Bone Miner Res*. 1992 Mar;7(3):335-43.

Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(6):663-72.

Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, Cui J, Adamus A, Gagel RF, Hortobagyi GN. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 2008 Jun;23(6):826-36.

Ishijima M, Ezura Y, Tsuji K, Rittling SR, Kurosawa H, Denhardt DT, Emi M, Nifuji A, Noda M. Osteopontin is associated with nuclear factor kappaB gene expression during tail-suspension-induced bone loss. *Exp Cell Res.* 2006 Oct 1;312(16):3075-83.

Kaji H, Sugimoto T, Miyauchi A, Fukase M, Tezuka K, Hakeda Y, et al. Calcitonin inhibits osteopontin mRNA expression in isolated rabbit osteoclasts. *Endocrinology.* 1994 Jul;135(1):484-7.

Kassolis JD, Scheper M, Jham B, Reynolds MA. Histopathologic findings in bone from edentulous alveolar ridges: a role in osteonecrosis of the jaws? *Bone.* 2010 Jul;47(1):127-30.

Katchburian, E; Arana-Chavez, VE. *Histologia e ebrilogia oral: texto-atlas-correlações clínicas.* 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2004, p. 372.

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB, Shane E; American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007 Oct;22(10):1479-91.

Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* 2010 Mar;28(2):165-75.

Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):856-61.

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.

Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo KV, Mönkkönen J, Rogers MJ, Azharyev A, Väänänen HK, Hassinen IE. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, denine-containing metabolite. *Mol Pharmacol.* 2002 May;61(5):1255-62.

Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, Kogan R. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws, bone markers, and a hypothesized candidate gene. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Jan;67(1):159-61.

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.

Letarte M, McDonald ML, Li C, Kathirkamathamby K, Vera S, Pece-Barbara N, Kumar S. Reduced endothelial secretion and plasma levels of transforming growth factor-beta1 in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Cardiovasc Res.* 2005 Oct 1;68(1):155-64.

Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone.* 1996 Feb;18(2):75-85.

Lo JC, O'Ryan FS, Gordon NP, Yang J, Hui RL, Martin D, Hutchinson M, Lathon PV, Sanchez G, Silver P, Chandra M, McCloskey CA, Staffa JA, Willy M, Selby JV, Go AS; Predicting Risk of Osteonecrosis of the Jaw with Oral Bisphosphonate Exposure (PROBE) Investigators. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Feb;68(2):243-53.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010 Jan;55(1):52-9.

Malaval L, Wade-Guéye NM, Boudiffa M, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2008 May 12;205(5):1145-53.

Marks SC Jr, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec*. 1996 Jun;245(2):374-93.

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

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone(osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Nov;63(11):1567-75.

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 Feb;108(1):74-7.

Mateus ND. Estudo ultra-estrutural e imunocitoquímico das reações do periodonto de molares de ratos submetidos a estímulos contínuos de vestibularização em tempos prolongados [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009.

Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Mar;65(3):415-23.

McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*. 1994 Dec;8(4):345-51.

McKee MD, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Apr 21;760:177-89.

McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech*. 1996 Feb 1;33(2):141-64

Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Müller R, Adamkiewicz J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer*. 1999 May 17;81(4):568-72.

Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer*. 2005 Jul 1;104(1):83-93.

Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc Res Tech*. 2003 Aug 15;61(6):496-503.

Moreira MS, Katayama E, Bombana AC, Marques MM. Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue. A pilot study. *Dental Traumatol* 2005;21:329–35.

Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain JC, Chassande O. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone*. 2010 Feb;46(2):447-52.

Nanci A, Wazen RM, Zalzal SF, Fortin M, Goldberg HA, Hunter GK, Ghitescu DL. A tracer study with systemically and locally administered dinitrophenylated osteopontin. *J Histochem Cytochem*. 2004 Dec;52(12):1591-600.

Nemoto R, Sato S, Nishijima Y, Miyakawa I, Koiso K, Harada M. Effects of a new bisphosphonate (AHBuBP) on osteolysis induced by human prostate cancer cells innude mice. *J Urol*. 1990 Sep;144(3):770-4.

Oades GM, Senaratne SG, Clarke IA, Kirby RS, Colston KW. Nitrogen containing bisphosphonates induce apoptosis and inhibit the mevalonate pathway, impairing Ras membrane localization in prostate cancer cells. *J Urol*. 2003 Jul;170(1):246-52.

Odvin CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Mar;90(3):1294-301.

Okamoto T, Alves-Rezende MC, Cláudio CC, Rodrigues Tda S, Okamoto R. Effects of Tissucol and epsilon aminocaproic acid in the healing process following dental extraction in dehydrated rats. *Braz Oral Res*. 2006 Jan-Mar;20(1):33-9.

Pavlos NJ, Xu J, Riedel D, Yeoh JS, Teitelbaum SL, Papadimitriou JM, Jahn R, Ross FP, Zheng MH. Rab3D regulates a novel vesicular trafficking pathway that is required for osteoclastic bone resorption. *Mol Cell Biol*. 2005 Jun;25(12):5253-69.

Peterson, LJ; Ellis, E.; Hupp, JR.; Tucker, MR. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 250-252.

Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, alpha 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Arch Oral Biol*. 1995 Feb;40(2):145-55.

Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jun 4;15(3):126-36.

Rauch F, Travers R, Plotkin H, Glorieux FH. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(9):1293-9.

Raynal C, Delmas PD, Chenu C. Bone sialoprotein stimulates *in vitro* bone resorption. *Endocrinology*. 1996 Jun;137(6):2347-54.

Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone*. 2007 Sep;41(3):318-20.

Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4473-5.

Reszka AA, Halasy-Nagy J, Rodan GA. Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation. *Mol Pharmacol*. 2001 Feb;59(2):193-202.

Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundfeld ML, Okamoto T. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol*. 2009 Jun;25(3):284-9.

Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int*. 1994 Jun;18(6):617-28.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2961-78.

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, Bisaz S, Fleisch H, Currey HL, Rubinstein HM, Dietz AA, Boussina I, Micheli A, Fallet G. Inorganic pyrophosphate in plasma, urine, and synovial fluid of patients with pyrophosphate arthropathy (chondrocalcinosis or pseudogout). *Lancet*. 1970 Oct 31;2(7679):899-902.

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

Sarasquete ME, García-Sanz R, Marín L, Alcoceba M, Chillón MC, Balanzategui A, Santamaria C, Rosiñol L, de la Rubia J, Hernandez MT, Garcia-Navarro I, Lahuerta JJ, González M, San Miguel JF. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2709-12.

Sato H, Takeda Y. Proliferative activity, apoptosis, and histogenesis in the early stages of rat tooth extraction wound healing. *Cells Tissues Organs*. 2007;186(2):104-11.

Schindeler A, Little DG. Osteoclasts but not osteoblasts are affected by a calcified surface treated with zoledronic acid in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 16;338(2):710-6.

Selander KS, Mönkkönen J, Karhukorpi EK, Härkönen P, Hannuniemi R, Väänänen HK. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. *Mol Pharmacol*. 1996 Nov;50(5):1127-38.

Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 1979 Apr;16(4):885-93.

Shen ZX, Heinegard D, Sommarin Y. Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral-head development. *Matrix Biol* 1995 14:773-781.

Smith N. A comparative histological and radiographic study of extraction socket healing in the rat. *Aust Dent J*. 1974 Aug;19(4):250-4.

Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R Jr, Li IW, Kim RH. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Apr 21;760:223-41.

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.

Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *OralOncol*. 2009 Feb;45(2):164-72.

Todo H. Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats. I. Initial cellular response to tooth extraction in rats studied with 3H-thymidine. *Arch Oral Biol*. 1968a Dec;13(12):1421-7.

Todo H. Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats. II. Histochemical observations on hydrolytic and oxidative enzymes in tooth extraction wounds in the rat. *Arch Oral Biol*. 1968b Dec;13(12):1429-43.

Thorpe PE, Burrows FJ. Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36(2):237-51.

Valverde P, Zhang J, Fix A, Zhu J, Ma W, Tu Q, Chen J. Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice. *J Bone Miner Res*. 2008 Nov;23(11):1775-88.

van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Oct 14;264(1):108-11.

von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, Rubash HE, Shanbhag AS. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2005 Dec;26(34):6941-9.

Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, Kornman KS, Rodan GA. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res*. 1994 Jan;29(1):35-40.

Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Sep;302(3):1055-61.

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006 May 16;144(10):753-61. Review. Erratum in: *Ann Intern Med*. 2006 Aug 1;145(3):235.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994 Aug 4;370(6488):341-7.

Xiong Y, Yang HJ, Feng J, Shi ZL, Wu LD. Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *J Int Med Res*. 2009 Mar-Apr;37(2):407-16.

Yingling JM, Wang XF, Bassing CH. Signaling by the transforming growth factor-beta receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Dec 18;1242(2):115-36.

Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8156-60

Ziebart T, Pabst A, Klein MO, Kämmerer P, Gauss L, Brüllmann D, Al-Nawas B, Walter C. Bisphosphonates: restrictions for vasculogenesis and angiogenesis: inhibition of cell function of endothelial progenitor cells and mature endothelial cells in vitro. *Clin Oral Investig*. 2009 Dec 19.

Zhang D, Udagawa N, Nakamura I, Murakami H, Saito S, Yamasaki K, Shibasaki Y, Morii N, Narumiya S, Takahashi N, et al. The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J Cell Sci*. 1995 Jun;108.

Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Physiol.* 1997 Jan;170(1):88-100.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 10/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, APROVOU o protocolo de pesquisa: **"AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ALVEOLAR APÓS EXODONTIA DE MOLARES DE RATOS SOB ADMINISTRAÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO"**, de responsabilidade da Pesquisadora: Fernanda Paula Yamamoto, sob orientação do Professor Doutor Victor Elías Arana-Chavez.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01 (um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 28 de abril de 2009.

Prof. Dr. **CELSONO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP