GUSTAVO DAVI RABELO

**Efeitos do Ácido Zoledrônico na rede de canais, no sistema lacunocanalicular
e nas propriedades biomecânicas do osso cortical**

São Paulo

2012

GUSTAVO DAVI RABELO

**Efeitos do Ácido Zoledrônico na rede de canais, no sistema lacunocanalicular
e nas propriedades biomecânicas do osso cortical**

Versão Corrigida

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 e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira

São Paulo

2012

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

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

Rabelo, Gustavo Davi

Efeitos do ácido zoledrônico na rede de canais, no sistema lacunocanalicular e nas propriedades biomecânicas do osso cortical / Gustavo Davi Rabelo; orientador Fernando Ricardo Xavier da Silveira. -- São Paulo, 2012.

67 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Osso e ossos. 2. Ácidos. 3. Biomecânica. I. Silveira, Fernando Ricardo Xavier da. II. Título.

Rabelo GD. Efeitos do Ácido Zoledrônico na rede de canais, no sistema lacunocanalicular e nas propriedades biomecânicas do osso cortical. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 04/06/2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese a meus pais João e Lindalva, meus irmãos Raphael e Thiago, minhas cunhadas Andreia e Roberta, minha sobrinha e afilhada Carolina, enfim, a todos meus familiares e amigos, que sempre me apoiaram em todos os sentidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira, por ter me aceitado como aluno nesta instituição, pela ajuda e pelos conselhos na elaboração deste e de outros trabalhos desenvolvidos durante o curso de Doutorado. Agradeço o apoio e incentivo, principalmente quando “comprava” minhas ideias e lutava junto comigo para que tudo desse certo.

Agradeço à Profa. Dra. Marina Helena C. Gallottini pela fundamental colaboração, além da disponibilização de todo material necessário para o desenvolvimento da pesquisa. Foi muito importante poder participar de um dos seus grupos de pesquisa.

Agradeço aos professores Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo e Dr. Marcelo Emílio Beletti, ambos da Universidade Federal de Uberlândia, pela participação essencial no desenvolvimento do trabalho, no desenvolvimento de técnicas e aplicação das metodologias.

Agradeço a Prof. Dra. Paula Dechichi pelos ensinamentos no mestrado, que foram essenciais para o desenvolvimento do projeto de doutorado. Também, a Prof. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki, que me abriu portas e sempre me auxiliou quando precisei.

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Yagüe Ballester e aos alunos Carina Baptiston Tanaka, Alice e Lucas Vinícius Sansana Pabis, do Departamento de Materiais Dentários da FOU SP, pela importante participação no desenvolvimento de parte da tese.

Agradeço aos colegas Márcio Augusto Oliveira e Denise Akiko Asahi, pela ajuda e colaboração no desenvolvimento do projeto, principalmente na parte experimental. Agradeço também à Prof. Dra. Nathalie Rezende que me disponibilizou alguns animais para meu experimento.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal, Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, Profa. Dra. Kareem Ortega, Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto-Júnior, Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins e Prof. Dra. Andrea Mantesso, pelos ensinamentos durante o curso de Doutorado e pelo enorme aprendizado adquirido nas atividades do serviço de Anatomia-Patológica.

Aos professores da Disciplina de Estomatologia Clínica, Prof. Dr. Dante Antonio Migliari, Profa. Dra. Andréa Lusvarghi Witzel, Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Jr, Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves e Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya pelos ensinamentos e aprendizado durante as atividades da disciplina e no atendimento aos pacientes. Um agradecimento especial ao Prof. Fabio Alves, por me incentivar a seguir novos caminhos na busca do estágio do Pós-Doutorado.

Agradeço à Iracema (Nyna), Zilda, Néia, Nair, Elisa, Juvani, Adriana, Cecília, Ritinha, Bia e Cida. Sem vocês este trabalho não teria sido possível.

Agradeço à todos meus amigos e colegas, da Patologia Bucal, Patologia Geral, da Estomatologia Clínica, do departamento de Materiais Dentários e da república. Não vou citar nomes, pois graças a Deus, vocês são muitos. Em especial, agradeço a minha grande amiga Carla Silva Siqueira, pois com você aprendi o sentido da palavra “companheirismo”.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio pecuniário.

Ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pela utilização do laboratório experimental.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para execução deste trabalho.

RESUMO

Rabelo GD. Efeitos do Ácido Zoledrônico na rede de canais, no sistema lacunocanalicular e nas propriedades biomecânicas do osso cortical [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a microarquitetura, caracterizando a rede de canais e o sistema lacunocanalicular, e também, as propriedades biomecânicas, do osso cortical de ratos Wistar tratados com Ácido Zoledrônico. Vinte e um ratos machos foram divididos da seguinte forma: 12 animais alocados no grupo de animais submetidos ao experimento no quarto mês de idade e 9 alocados no grupo de animais submetidos ao experimento no nono mês de idade. Dentro destes grupos, os mesmos foram divididos em grupos controle e teste, sendo que no grupo teste os animais receberam três doses, no esquema de 7,5 µg/kg, semanalmente. Após o uso da medicação, três animais foram eutanasiados nos respectivos períodos, após a última dose: 14 dias, 42 dias e 75 dias. Todos os animais tiveram suas mandíbulas, tíbias e fêmures dissecados. As tíbias e mandíbulas foram descalcificadas e processadas para inclusão em parafina, enquanto que, os fêmures foram armazenados para os testes biomecânicos. Imagens histológicas digitalizadas, provenientes das mandíbulas e tíbias, foram analisadas utilizando o processo de segmentação interativa, acessando as características da microarquitetura da rede de canais. O processo de reconstrução tridimensional, para caracterização do sistema lacunocanalicular, foi realizado nos cortes seriados proveniente das tíbias. Os fêmures foram analisados com os ensaios de microdureza, compressão e flexão em três pontos. Os resultados revelaram que a microarquitetura da rede de canais não foi alterada nas mandíbulas, no entanto, nas tíbias, houve diferença significativa apenas nos animais de 4 meses de idade, nos quesitos área dos canais (p 0.0031), desvio-padrão da área (p 0.0338), perímetro dos canais (p 0.0068), desvio padrão do perímetro (p 0.0297) e porcentagem de matriz (p 0.0235). Os testes biomecânicos revelaram resultados que indicavam uma melhora nas características analisadas, que foi correlacionada apenas com o aumento da idade e não com o uso do ácido zoledrônico. A visualização

tridimensional possibilitou analisar a distribuição dos osteócitos e dos canais, caracterizando o sistema lacunocanalicular, e constatou-se que nos animais de 4 meses o uso da droga causou uma descontinuidade na estabilidade da distribuição dos osteócitos. Conclui-se que o ácido zoledrônico não interferiu na microarquitetura da rede de canais do osso cortical das mandíbulas, enquanto que nas tíbias, nos animais jovens, houve uma modificação na microarquitetura e no sistema lacunocanalicular, revelando uma topologia mais heterogênea quando comparadas ao grupo controle. As propriedades biomecânicas não sofreram alterações quanto ao uso da droga, sendo evidenciada melhora nos parâmetros analisados relacionada apenas ao aumento de idade nos animais.

Palavras-chave: Osso. Bisfosfonato. Ácido Zoledrônico. Microarquitetura. Propriedades biomecânicas.

ABSTRACT

Rabelo GD. Zoledronic acid effects in the cortical bone channels network, lacunocanalicular system and biomechanical properties [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

The aim of this study was to evaluate the microstructure, characterizing the bone channels network and the lacunocanalicular system, also, the biomechanical properties of the cortical bone of Wistar rats treated with Zoledronic Acid. Twenty-one male rats were separated as follows: 4-month-old (12 animals) and 9 month-old (9 animals). For each age they were divided in control and test group, and the test group received a 7.5 $\mu\text{g/kg}$ dose of the drug, once a week, for 3 weeks. In the 4 month-old test group they were euthanized at 14, 42 and 75 days after the drug injection and in the 9-month-old test group they were sacrificed at 14 and 75 days after medication. All animals had their mandible, tibia and femur dissected, and then, the mandible and tibia were decalcified and embedded in paraffin, and, the femur were stored for mechanical tests. Histological images were analyzed through developed algorithms using the SCILAB mathematical environment, getting percentage of bone matrix, ROI areas, ROI perimeters, their standard deviations and Lacunarity, as well, the images were accessed and processed to tridimensional visualization, to characterize the lacunocanalicular system. The femurs were analyzed by microhardness, three point bending and compression testing. The results revealed that the bone channels network in the mandible was not affected by the drug, whereas the tibia in the 4-month-old animals revealed a statistical difference between control and test groups, with the test group revealing more heterogeneity in the channels topography, as seen in results of bone matrix ($p=0.0235$), ROI area ($p=0.0031$), ROI area standard-deviation ($p=0.0338$), ROI perimeter ($p=0.0068$) and ROI perimeter standard-deviation ($p=0.0297$). The biomechanical tests showed an increased in strength, and that this event was age-related and not depending on the use of the drug. The tridimensional visualization allowed to analyze the osteocyte distribution in relation to the channels position, characterizing the lacunocanalicular system, and, it was found that the 4-month-old animals the drug caused a discontinuity in the stability of osteocyte distribution. In

conclusion, the zoledronic acid not interfere in the bone channels network in the cortical bone of the mandible, however, in the tibia of the young animals, there's been an alteration in bone channels network and in the lacunocanalicular system, revealing more heterogeneity in the topography in these animals. The biomechanical properties were not altered after the use of the drugs, and the increased in strength being age-related.

Keywords: Bone. Bisphosphonate. Zoledronic acid. Microstructure. Biomechanical properties.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µm	micrometro
AZ	Ácido Zoledrônico, Zoledronato
BFs	Bisfosfonatos
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	Hematoxilina e Eosina
HK	Microdureza Knoop
Kg	quilograma
mg	miligrama
mm	milímetro
OM	Osteonecrose dos maxilares
r	raio
R3D	Reconstrução Tridimensional
ROIs	Regiões de Interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Tecido Ósseo, Sistemas de Havers, Sistema Lacunocanalicular e a Remodelação Óssea	15
2.2 Bisfosfonatos e o Ácido Zoledrônico	19
2.3 Lacunaridade	24
2.4 Reconstrução Tridimensional	26
2.5 Ensaios Biomecânicos, Tecido Ósseo e Bisfosfonatos	28
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Análise Histomorfométrica	34
4.2 Reconstrução Tridimensional	35
4.3 Análise Biomecânica	37
4.3.1 Microdureza.....	39
4.3.2 Compressão	39
4.3.3 Flexão.....	41
4.4 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO A	66
ANEXO B	67

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BFs) compreendem o grupo padrão de drogas administradas no tratamento da osteoporose e na prevenção e tratamento de complicações ósseas e metástases nos pacientes com câncer (Migliorati et al., 2011). Atualmente, novos estudos têm avaliado também os efeitos destas drogas na aceleração da formação óssea nos procedimentos de regeneração, com uma melhora na mineralização do osso neoformado e um aumento na resistência mecânica na área de reparo, com objetivos de aumentar as taxas de sucesso e diminuir o tempo de tratamento (Tatli et al., 2011).

Os BFs podem variar quanto à potência e vias de administração. Estes medicamentos podem ser administrados por via oral ou endovenosa. A administração endovenosa é frequentemente indicada pelos oncologistas para tratamento de pacientes com lesões ósseas relacionadas ao mieloma múltiplo e metástases ósseas nos pacientes com câncer de próstata e mama. Ainda, são utilizados no manejo da hipercalcemia associada a tumores malignos, indicados para metástases ósseas também de outros tumores primários (que não os de mama e pulmão), doença de Paget e em crianças com desordens esqueléticas tais como osteogênese imperfeita, osteoporose idiopática juvenil ou osteoporose induzida por uso de esteróides (Greenberg, 2004).

Um tipo de bisfosfonato altamente potente é o Ácido Zoledrônico (AZ). Este medicamento é caracterizado como um bisfosfonato nitrogenado, de administração endovenosa e é geralmente usado para prover tratamento de suporte para pacientes com câncer (próstata e mama), reduzindo o risco de metástases. Recentemente, também teve seu uso aprovado em dose única anual para tratamento da osteoporose pós menopausa (Huja et al., 2009). Devido ao uso cada vez mais frequente desta droga, algumas pesquisas, como as de Bilston et al. (2002), Pampu et al. (2008) e Tatli et al. (2011), lançaram mão de estudos experimentais em animais para avaliar o efeito do AZ na tentativa de obter melhores resultados nos procedimentos de regeneração óssea e distração osteogênica, além de tentar entender o efeito que os BFs exercem no tecido e nas células ósseas.

Basicamente, espera-se que os BFs reduzam a perda óssea e o risco de fratura por supressão da atividade osteoclástica. Em algumas regiões, tais como

ossos longos, quadril e crista do íliaco, são relatados efeitos da droga no processo de remodelação e nas propriedades do tecido ósseo (*turnover*, mineralização, micro-defeitos, entre outros), no entanto, estes eventos ainda não estão totalmente esclarecidos (Allen, 2011).

Nos casos de osteoporose em mulheres no período pós-menopausa, os BFs agem aumentando a massa óssea e diminuindo o risco de fraturas. Após o uso destas drogas é evidenciado um aumento na taxa de mineralização no tecido ósseo, proveniente principalmente da diminuição da ação dos osteoclastos e das taxas de remodelação óssea fisiológica, possibilitando maiores graus de mineralização das unidades de remodelação encontradas ao longo do tecido ósseo (Fuchs et al., 2011).

Frente aos benefícios decorrentes do uso destas drogas, alguns efeitos colaterais também são relatados. Com a alteração no *turnover* ósseo, efeitos concomitantes, como a não reparação e aumento na extensão dos micro-danos, podem ser observados. Nestes casos, uma mudança nas taxas de produção de danos e reparo, que acontece no evento de remodelação óssea fisiológica, ficaria alterada a ponto de acumular os danos pelo tecido. Assim, como os bisfosfonatos suprimem o remodelamento ósseo, eles também diminuiriam os reparos dos micro-danos (Mashiba et al., 2001).

Além de micro-danos, o uso de AZ, e também de outros BFs de administração oral e/ou endovenosa, já foi associado à osteonecrose dos maxilares, como um efeito colateral importante. Sabe-se que este evento é limitado aos ossos craniofaciais e sua patofisiologia ainda não está totalmente esclarecida (Bamias et al., 2005; Migliorati et al., 2005).

Alguns fatores foram relacionados com a presença da osteonecrose pelos BFs nos ossos maxilares devido a algumas características pertinentes a estes ossos, que diferem dos ossos longos pela sua origem, composição e resposta a estímulos. Estes ossos são derivados da crista neural, formados por ossificação intramembranosa e contém maior concentração de tecido adiposo em sua parte medular. Também, sofrem maior exposição ao meio externo e à interferência de microrganismos e têm maior taxa de remodelação, quando comparados com ossos longos (Allen, 2011).

Na tentativa de descobrir as mudanças que ocorrem após o uso dos BFs e seus efeitos indesejados, vários estudos histomorfométricos e biomecânicos foram

desenvolvidos em animais. Bilston et al. (2002) relataram que o uso do AZ teria um efeito benéfico na resistência mecânica de um tecido ósseo em regeneração, havendo também ação no osso não submetido à procedimentos visando o reparo, sem aumentar sua fragilidade, o que se entende por um material que deforma pouco antes de haver a fratura. Rodan e Fleisch (1996) observaram que a redução do *turnover* reflete em um maior tempo para mineralização do osso pré-existente, aumentando assim a densidade óssea.

Em contraponto, Day et al. (2004) relataram que uma melhora nas propriedades biomecânicas, relacionadas à mineralização, poderia ser afetada pelo aumento de micro-danos após o tratamento com bisfosfonatos, visto à correlação positiva entre a densidade tecidual e acúmulo de micro-danos.

Quanto aos estudos que lançam mão das características histológicas, encontram-se na literatura principalmente pesquisas sobre os efeitos dos BFs nas células ósseas (Plotkin et al., 2006; Huja et al., 2009; Pozzi et al., 2009) e na arquitetura tecidual (Senel et al., 2010; Tatli et al., 2011). Tatli et al. (2011) relataram que a microarquitetura é um elemento importante na qualidade óssea, e sua integridade contribui para a “competência mecânica” do osso.

A avaliação da microarquitetura, utilizando os parâmetros histomorfométricos, e sua influência nas propriedades biomecânicas ainda não foi pesquisada em sua maior amplitude, havendo a necessidade de estudos mais complexos e de avaliação de diversos parâmetros, concomitantemente, para o entendimento da relação entre o efeito dos BFs no tecido ósseo e o aparecimento de efeitos adversos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão foram discutidos alguns dados referentes ao tecido ósseo e sua microarquitetura, com ênfase na rede de canais ósseos e no sistema de intercomunicação entre os osteócitos e os canais vasculares. Também, foram abordados os aspectos que permitem a avaliação destas características, tais como a análise da lacunaridade e a avaliação da distribuição celular utilizando um modelo de reconstrução tridimensional do sistema lacuno-canalicular e da rede complexa de canais vasculares.

Estudos sobre os bisfosfonatos, principalmente sobre o Ácido Zoledrônico, também foram abordados e foram avaliados os efeitos do medicamento no tecido ósseo, com ênfase nos estudos em modelo animal.

2.1 Tecido Ósseo, Sistemas de Havers, Sistema Lacunocanalicular e a Remodelação Óssea

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto e serve de suporte para as partes moles, protege e aloja órgãos vitais, incluindo a medula óssea, proporciona apoio aos músculos, transformando suas contrações em movimentos úteis. Além destas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons. Este tecido é caracterizado como um tecido conjuntivo especializado formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. Seus constituintes celulares são os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos (Junqueira; Carneiro, 2004).

Na matriz óssea calcificada, a parte inorgânica representa cerca de 50% do seu peso e sua caracterização se dá principalmente pela formação de cristais de cálcio e fósforo que exibem a estrutura da hidroxiapatita. A parte orgânica da matriz é formada por fibras colágenas (95%) constituídas principalmente por colágeno tipo I (Junqueira; Carneiro, 2004).

No desenvolvimento deste tecido, podem ocorrer dois processos: o tecido ósseo pode se desenvolver a partir de uma cartilagem pré-existente (ossificação

endocondral) e pode se desenvolver a partir de uma membrana de tecido conjuntivo (ossificação intramembranosa). Independente do processo de desenvolvimento, os ossos são divididos em dois grupos principais: os ossos achatados (crânio, escápula, clavícula, vértebras, ossos maxilares e pelve) e os ossos longos ou tubulares (tíbia, fêmur, entre outros). Ambos os tipos são compostos por osso cortical (ou compacto) e osso esponjoso (Unni et al., 2004).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário; e o maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. O tecido ósseo secundário, ou lamelar, é a variedade geralmente encontrada no adulto. Sua principal característica é possuir fibras colágenas organizadas em lamelas de 3 a 7 μm de espessura, que ficam paralelas umas às outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers ou ósteons. O tecido ósseo secundário que contém sistemas de Havers é característico da diáfise dos ossos longos, embora sistemas de Havers pequenos sejam encontrados no osso compacto de outros locais (Junqueira; Carneiro, 2004).

Cada sistema de Havers é um cilindro longo, às vezes bifurcado, paralelo à diáfise e formado por quatro a 20 lamelas ósseas concêntricas. No centro desse cilindro ósseo existe um canal revestido de endóstio, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos, os canais de Volkmann. Os osteócitos estão dispostos por todo o ósteon, entre as lamelas e por vezes, dentro das mesmas (Junqueira; Carneiro, 2004).

Estudos atuais têm revelado que pouco se sabe sobre as variações de tamanho dos ósteons, incluindo os canais de Havers e a população de osteócitos nos diferentes ossos. Em uma avaliação histológica dos sistemas de Havers em humanos encontrou-se que o tamanho do ósteon é determinado pela quantidade de osso removida pelos osteoclastos; ainda, que o ósteon é “bem desenhado” para que possam ocorrer trocas moleculares através dele; e, que um ósteon bem definido pode ser produzido a partir da regulação da aposição óssea pelos osteócitos durante o processo de deposição de matriz (Qiu et al., 2003).

Outros estudos avaliam a relação entre os ósteons e a rede de osteócitos e sua influência nas propriedades biomecânicas do osso. Estudos sobre o sistema

lacunoanalicular, entre as lacunas dos osteócitos e os canais vasculares, demonstraram particularidades específicas nos diferentes locais e tipos de osso, com comprovada diferença entre a tensão de cisalhamento, as propriedades biomecânicas e a distribuição de nutrientes em diferentes graus, dentro do sistema lacunocanalicular (Goulet et al., 2009; Himeno-Ando et al., 2012).

No estudo do sistema lacunocanalicular, que mostra a relação dos osteócitos e suas interconexões, quer seja entre suas lacunas e com os canais sanguíneos, é possível entender de forma mais concreta a relação destas células com o processo de remodelação e reparo. Lau et al., (2010) descreveram que os osteócitos já foram caracterizados como os maiores mecanossensores no osso, sendo responsáveis pela emissão dos sinais para as células efectoras, ou seja, os osteoblastos e osteoclastos, que atuam no processo de formação e reabsorção óssea. Também, já foi demonstrado que os osteócitos liberam vários fatores solúveis (por exemplo os fatores de crescimento- β , óxido nítrico e prostaglandinas) que vão influenciar na atividade dos osteoblastos e osteoclastos, quando são submetidos a estímulos mecânicos, incluindo fluxo de flúidos, pressão hidrostática e elasticidade mecânica.

Em suma, sabe-se que o osso é composto de um material constituído principalmente por colágeno e hidroxiapatita, e apresenta em sua estrutura uma rede complexa de lacunas e canalículos ocupados pelos osteócitos e pelos espaços que contém os osteoblastos antes da sua inclusão na matriz. Estas células estão imersas em um fluido intersticial e existem fortes indicações que mudanças na velocidade e pressão deste fluido por esta rede de canalículos e lacunas são ditadas por sinais mediante a força (carga) externa recebida e seus efeitos nas células ósseas (Letchipia et al., 2010). Evidências também demonstraram que a movimentação do fluido pelo sistema lacuno-canalicular pode induzir a oscilação dinâmica da concentração intracelular de cálcio nos osteoblastos, o que refletiria no processo de remodelação (Su et al., 2011).

Ainda, estudos revelaram que as peculiaridades da estrutura do sistema lacuno-canalicular, que compreende os osteócitos, suas lacunas e os canalículos derivados deles, estão diretamente relacionadas com a capacidade da tradução mecânica dos estímulos pelo tecido ósseo e os respectivos osteócitos. Uma análise dos osteócitos, lacunas e canalículos, realizada em diferentes tipos de ossos, submetidos a diferentes cargas e estímulos externos, revelou que os osteócitos

encontrados na tíbia apresentam um citoplasma mais abundante quando comparados com os osteócitos do osso parietal, e mais, o tracejamento da rede complexa do sistema lacuno-canalicular revelou que na tíbia o número de canalículos e suas bifurcações por osteócitos é maior que aqueles encontrados nos osteócitos do osso parietal. No entanto, ainda é desconhecido o fato de como os osteócitos são sensíveis aos estímulos de carga externos ao osso, apesar do que, o processo de mecano-transdução das cargas físicas aplicadas externamente ao osso está altamente influenciado pelas propriedades estruturais do tecido ósseo, incluindo o sistema lacuno-canalicular e a rede complexa da distribuição dos osteócitos na matriz (Himeno-Ando et al., 2012).

Quanto ao processo de remodelação fisiológica, que acontece naturalmente, sabe-se que o *turnover* ósseo representa a renovação que acontece em condições normais, com a existência de reabsorção e aposição de matriz óssea. As taxas do *turnover* ósseo são mais altas nos ossos maxilares quando comparadas com outros ossos do esqueleto. Estudos em cachorros revelaram que a remodelação do osso alveolar apresenta altas taxas de *turnover* quando comparadas ao osso basal na mandíbula e maxila, sendo esta de aproximadamente 25% ao ano, enquanto na basal mandibular é de cerca de 7% ao ano, e nos ossos longos como tíbia e fêmur, é de cerca de 1-2% ao ano (Allen et al., 2010; Allen, 2011).

A remodelação acontece de forma diferente no osso cortical e no osso trabecular. A remodelação do tecido ósseo cortical consiste na reabsorção de sistemas de Havers antigos, seguida da organização de novos sistemas de Havers. Os osteoclastos formam um túnel de reabsorção centrífuga (zona de abertura) que é preenchido novamente de modo centrípeto pelos osteoblastos (zona de fechamento). A zona de reversão entre osteoclastos e osteoblastos ocorre quando a zona de abertura terminou de remover a lamela mais externa do ósteon. Em resumo, nota-se que a zona de abertura é revestida por osteoclastos e a zona de fechamento por osteoblastos, enquanto que os restos das lamelas dos sistemas de Havers que circundam a zona de abertura se transformam em lamelas intersticiais, as quais preenchem o espaço entre ósteons adjacentes, e o canal de Havers vai se tornando mais estreito à medida que novas lamelas concêntricas, que aprisionam osteócitos em lacunas da matriz óssea calcificada, vão se aproximando. Um marcador da zona de reversão é a linha cimentante, que é representado pelo limite das lamelas ósseas recém-formadas. Estas linhas não são apenas um marco do início da remodelação

lamelar, mas também, podem atuar neutralizando uma fratura por uma microfissura, juntamente com o arranjo alternado e orientação das fibras colágenas mineralizadas do tecido ósseo lamelar. Microfissuras limitadas a uma região do ósteon (por exemplo, uma lesão nos canalículos, a qual interrompe a comunicação entre os osteócitos, levando à morte celular) podem ser reparadas por meio do processo de remodelação que envolve os osteoclastos e os osteoblastos. Quando a arquitetura do ósteon apresenta falhas, as microfissuras propagam-se e pode ocorrer uma fratura completa do osso (Kierszenbaum; Tres, 2012).

2.2 Bisfosfonatos e o Ácido Zoledrônico

Os BFs são análogos do pirofosfato, caracterizados pela substituição do oxigênio por carbono, levando a formação estrutural da molécula em fosfato-carbono-fosfato (P-C-P). Os diferentes BFs são desenhados utilizando uma alteração estrutural no átomo de carbono na estrutura P-C-P. A efetividade e afinidade de ligação dos BFs com as estruturas mineralizadas são possíveis pela presença da porção terminal de fosfato da estrutura P-C-P, o que permite a ancoragem do BF na superfície óssea. Em geral, os BFs tem alta afinidade pela hidroxiapatita, permanecendo não metabolizados por um longo período de tempo (Sarin et al., 2008).

Os BFs são internalizados pelos osteoclastos e interferem em processos bioquímicos específicos. Os BFs que contem nitrogênio (pamidronato, alendronato, risedronato, ibandronato e zoledronato) inibem enzimas chaves na biossíntese do colesterol e na via do mevalonato. A principal enzima alvo é a farnesilpirofosfato, ou seja, a inibição desta enzima previne a biossíntese de compostos isoprenoides, que são necessários na prenilação pós-traducional de GTPases como Ras, Rho e Rac, que são essenciais nos eventos intracelulares como manutenção da integridade do citoesqueleto, tráfego intercelular de vesículas e apoptose (Vasconcellos et al., 2004; Russell, 2011).

A presença dos BFs na superfície óssea se dá principalmente pela alta afinidade com a hidroxiapatita, e posteriormente, a aderência dos osteoclastos à superfície óssea recoberta pelos BFs acarreta em fagocitose destas moléculas, que

ganham o meio intracelular dos osteoclastos, levando à interferência na reabsorção óssea. No entanto, estes eventos moleculares não explicam os efeitos dos BFs em outras células, como por exemplo as células epiteliais, que apresentam alterações nos casos de osteonecrose dos maxilares, ou mesmo, não explicam o aumento da sobrevida em pacientes com algumas neoplasias malignas, apesar de que alguns achados evidenciaram que a os BFs agregados à superfície óssea atuam também nas células adjacentes (não componentes do tecido ósseo), inibindo seu crescimento (Cornish et al., 2011).

Os bisfosfonatos diminuem a atividade osteoclástica, induzindo diretamente a apoptose das células neoplásicas, além de promover deposição da matriz mineral, nos casos de seu uso no tratamento adjuvante do câncer. Estas drogas são potentes inibidores da reabsorção óssea normal e patológica, exercendo efeito depressivo sobre a maturação de osteoclastos e inibindo a estimulação dos osteoblastos, diminuindo assim as complicações decorrentes do processo metastático ou do bloqueio androgênico. Evidências também apontam para uma acentuada diminuição da adesão neoplásica ao tecido ósseo, e efeito citotóxico direto nas células neoplásicas, além de promover redução da reabsorção óssea por inibição das collagenases provindas das células neoplásicas, ações sinérgicas que corroboram a aplicação dos BFs (Rodrigues et al., 2006).

Efeitos em células ósseas também são relatados, pois além de afetar os osteoclastos, os bisfosfonatos têm efeito direto sobre os osteócitos. Os efeitos destas drogas na apoptose de osteócitos, em estudo *in vitro*, mostraram ser dose dependentes, ou seja, em baixos níveis nota-se a redução na apoptose e em altas concentrações, nota-se a promoção da apoptose de osteócitos (Plotkin et al., 2006). Em contrapartida, foi também relatado que o ácido zoledrônico não produziu necrose de osteócitos, em períodos de curto prazo de análise, após administração de doses semanais, na proporção de 0.1 mg/Kg, por 9 semanas (Huja et al., 2009).

Plotkin et al. (2006) demonstraram que os BFs, incluindo os de nova geração, atuam de certa forma dissociando efeitos anti-apoptóticos em osteoblastos/osteócitos dos efeitos pró-apoptóticos nos osteoclastos, e ainda, que estes efeitos ocorrem por diferentes mecanismos moleculares nestes dois tipos celulares. Relataram também, que alguns análogos dos bisfosfonatos (BP-1, BP-2, iso-minodronate, IG9402 e BP-5) não causam apoptose de osteoclastos e preservam a viabilidade dos osteoblastos e osteócitos, trazendo assim novas

possibilidades no tratamento da fragilidade óssea em condições em que a diminuição na remodelação óssea não seja necessária.

Além dos efeitos celulares bem descritos na literatura, é importante ressaltar que o uso dos BFs nos pacientes com câncer se dá como um evento essencial na terapia adjuvante. Pacientes com metástase óssea tem média total de sobrevida de trinta meses, elevando os custos de terapias de suporte para alívio da dor ou complicações relacionadas a fraturas patológicas, tais como uso de radioterapia, hormonioterapia, quimioterapia, intervenção ortopédica e analgesia. A prevenção dessa ocorrência com o uso dos BFs tem papel econômico relevante na sobrevida dos pacientes com doença metastática avançada. Ainda, sabe-se que o bloqueio da destruição óssea, com a inerente preservação dos terminais sensitivos no periósteo, promove significativa melhora clínica da dor tão frequentemente observada nesses pacientes (Rodrigues et al., 2006).

Basicamente, os BFs inibem a reabsorção óssea e melhoram a densidade óssea, pelo aprimoramento da porção mineral e a diminuição do *turnover* ósseo. Esta ação não está relacionada com as propriedades físico-químicas da droga, e sim, com os mecanismos celulares que acontecem em decorrência do uso dos BFs, diminuindo a frequência e intensidade das unidades de remodelação óssea (Fleisch, 2002).

O ácido zoledrônico faz parte da nova geração de bisfosfonatos (terceira geração) e parece ser o mais potente. É 10.000 vezes mais potente que o etidronato e 100 vezes mais que o pamidronato, e em contraste com os demais BFs à base de nitrogênio, o ácido zoledrônico possui 2 átomos de nitrogênio em um anel imidazol heterocíclico (Griz et al., 2006). Pela substituição do carbono pelo oxigênio na estrutura da molécula, os bisfosfonatos apresentam a característica de serem resistentes à hidrólise, o que explica o seu acúmulo na matriz óssea e sua meia-vida extremamente longa no osso, de períodos superiores à 11 anos (Marx, 2011).

O AZ (zoledronato), comercialmente conhecido como Zometa, é administrado via intravenosa por um período de 15 minutos, em doses iguais de 4mg a cada 3/4 semanas, nos pacientes em tratamento oncológico (Marx, 2011). Também, o uso do AZ, na dose de 5 mg ao ano em infusão endovenosa para os casos de osteoporose, está sendo preconizado, visto o fato de poder diminuir os efeitos colaterais quando comparados aos dos BFs de uso diário (alendronato, entre

outros), e ainda, poderia influenciar na escolha dos pacientes, frente à sua adesão em relação aos outros tratamentos (Pereira et al., 2009).

Em uma recente revisão, Mazziotti et al. (2012) relataram que no geral, os BFs no tratamento da osteoporose já tem sua eficácia comprovada, entretanto, seu uso prolongado tem sido associado com alguns eventos indesejados, como a osteonecrose e a ocorrência de fraturas femorais atípicas. Ainda, alguns poucos relatos de câncer esofágico e fibrilação atrial, relacionados ao uso dos BFs, também já foram descritos na literatura, embora ainda exista uma falta de consistência desta correlação. O uso dos BFs endovenosos foi associado com um aumento do risco de osteonecrose dos maxilares (OM), que aparentemente está diretamente relacionado com a dose e a duração da terapia. No entanto, esta correlação entre dose e tempo de uso não foi confirmada com os casos de tratamentos nos quais foram utilizadas baixas doses para a osteoporose, por um longo período, pois a frequência dos casos de OM difere modestamente dos casos de OM na população geral. Nas revisões sobre o assunto, o aparecimento de OM foi relacionado com uso dos BFs por mais de 4 anos e os casos de fraturas femorais parecem ocorrer em pacientes em uso prolongado da droga, por mais de 5 anos, independente da dose, apesar do fato de que estas fraturas são eventos raros, particularmente, em proporção ao número de fraturas prevenidas pela terapia com os BFs.

Os estudos em modelo animal têm demonstrado importantes resultados dos efeitos do AZ na estrutura óssea, no processo de remodelação e no processo de reparo, este último em diferentes condições tais como reparo em ossos longos, reparo em cicatrização de lesões em tecido mole e reparo ósseo pós exodontia. Huja et al. (2009), avaliaram os efeitos do AZ em ratos, utilizando esquema de 9 doses, sendo uma dose por semana (0,1 mg/kg em injeção intraperitoneal), e descreveram que não foram encontradas áreas de necrose, tanto nas mandíbulas quanto nos fêmures. Também, encontraram um volume ósseo semelhante entre os grupos estudados, na maxila com 87% e 86,6%, para grupo experimental e controle, respectivamente; e, na mandíbula, nos grupos experimental e controle, os valores do volume ósseo, foram respectivamente de 93% e 94.6%. Também, a taxa de neoformação óssea foi significativamente maior nos grupos controles quando comparados aos experimentais, e ainda, quando comparadas as taxas de neoformação por diferentes ossos, os fêmures apresentaram maiores taxa que a maxila e mandíbula.

Senel et al., (2010) evidenciaram inflamação confinada à mandíbula na região posterior, nos casos de uso de AZ e Pamidronato, enquanto que na mandíbula na região anterior e nos fêmures não foram evidenciadas alterações e/ou diferenças entre os grupos que utilizaram as drogas e o grupo controle. Histologicamente, lacunas vazias de osteócitos e um infiltrado inflamatório misto foram observados em 4 (40%) dos casos analisados na região posterior da mandíbula, que compreendia a região abaixo das raízes do primeiro e terceiro molar, acima do canal mandibular, sendo que dois destes preencheram os critérios para serem classificados como osteonecrose. Um fato interessante foi que os autores encontraram estas evidências apenas nos animais que utilizaram a droga na proporção de 0,1mg/Kg três vezes por semana, em um período de 8 semanas e que em todos os casos não foram realizados procedimentos cirúrgicos de qualquer natureza.

Yu et al. (2012) avaliaram o efeito do AZ no processo de reparo ósseo em mandíbula e osso longo, com modelo de fratura tibial não estável e um modelo de reparo de fratura mandibular. Os animais receberam a droga no esquema de 0,1 mg/kg em duas doses (a primeira 4 semanas antes e a segunda no momento da fratura). Nas tíbias, os autores encontraram redução na formação do calo ósseo e da cartilagem nos estágios iniciais do reparo, e, nos estágios tardios foi observado atraso na formação de calo, cartilagem e também na remodelação óssea. Nas mandíbulas, os autores relataram um atraso na formação do calo, da cartilagem e da remodelação óssea, com diminuição dos osteoclastos, nos períodos intermediário e tardio da reparação. Os autores concluíram que os efeitos do AZ são mais evidentes nas mandíbulas do que nas tíbias, quando se avalia reparo ósseo e formação de cartilagem.

Yamashita et al. (2011) relataram que o AZ exerce influência na medula óssea, suprimindo genes associados à linfangiogênese e remodelação tecidual, tais como o VEGF-C (fator de crescimento vascular endotelial-C) e MMP-13 (metaloproteinase-13). No experimento foi realizada a remoção de um fragmento de gengiva deixando uma área de osso exposta, e o que os autores observaram foi que enquanto era possível notar uma área necrótica no osso exposto, o tecido mole apresentou um aspecto clínico de cicatrização normal. O uso do AZ foi associado com um processo de reparo ósseo comprometido, enquanto que, não foram observados efeitos nos marcadores angiogênicos ou na cicatrização do tecido mole.

Os autores concluem que o AZ atua seletivamente na atenuação do reparo ósseo, mas não afeta a cicatrização do tecido mole na cavidade oral.

Em condições específicas, como os estudos que avaliam a cicatrização pós-exodôntica, alguns autores encontraram peculiaridades e resultados diferenciados, quando comparados aos outros processos de reparo, em outros tipos de ossos. Kobayashi et al. (2010) observaram que o AZ diminui significativamente a angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotelial e a proliferação de células endoteliais em cultura, em um contexto dose-dependente. Ainda, estes autores encontraram supressão da migração de células epiteliais orais e promoção de aderência de *Streptococcus mutans* à hidroxiapatita, além da proliferação de bactérias, obtidas da cavidade oral de indivíduos saudáveis.

Sonis et al. (2009) verificaram que os animais que receberam AZ e dexametasona, em um esquema de uma a três semanas, desenvolveram uma condição semelhante à osteonecrose relacionada aos BFs, após exodontias de molares em maxila e mandíbula. Estas áreas apresentavam-se histologicamente como focos necróticos recobertos por epitélio apresentando áreas de ulceração e moderado infiltrado inflamatório. É interessante ressaltar que ao vigésimo oitavo dia após a exodontia, não se observavam mais alterações e diferenças entre os grupos teste e controle.

2.3 Lacunaridade

A lacunaridade é uma ferramenta utilizada na análise de imagens digitalizadas, ou seja, permite uma análise específica de uma medida orientada da textura da imagem. A textura é definida como um dos principais atributos visuais presentes em uma imagem, sendo capaz de distinguir regiões e contribuir para o processo de reconhecimento, análise, descrição e classificação de imagens digitais (Backes; Bruno, 2006).

A lacunaridade é obtida medindo-se a distribuição espacial dos buracos existentes na imagem digitalizada. Portanto, por meio dela é possível quantificar a homogeneidade de uma imagem ou de parte dela, de modo a torná-la comparável

com outras imagens (Allain; Cloitre, 1991). Estes buracos são denominados Regiões de Interesse (ROIs) e são analisados por meio de métodos e cálculos matemáticos.

Portanto, a lacunaridade é definida como um complemento da dimensão de fractal (também uma propriedade passível de ser calculada em imagens digitais) que descreve a textura de um fractal, ou seja, tem relação com a distribuição e tamanho dos vazios. De maneira geral, se um fractal tem grandes vazios ou buracos, tem lacunaridade alta; por outro lado, se um fractal é quase invariante a translação (deslocamento-invariante), tem baixa lacunaridade. Deve-se considerar que a lacunaridade é uma característica distinta; ela não se relaciona com a topologia do fractal e necessita de mais de um valor numérico para ser perfeitamente determinada (Voss, 1988; Mandelbrot et al., 1996).

Oliveira et al. (2006) padronizaram o cálculo da lacunaridade, utilizando o método *gliding box* (deslizamento), que usa uma janela S com raio r inicialmente posicionado no canto superior esquerdo da imagem binária contendo as ROIs. A somatória dos pixels contidos dentro deste box (S) é calculada conforme este box vai deslizando, pixel por pixel, para a direita. O valor de r calculado pixel por pixel pode variar de um mínimo de 2 e máximo de 10, definido para esta medida em específico. Para cada valor de r, a lacunaridade referente àquela posição é calculada utilizando a fórmula: $L_r = \log(\sigma/m^2)$, na qual σ e m são desvio-padrão e a média do S, respectivamente. A lacunaridade (L) foi então definida como:

$$L = \int_2^{10} L_r ds$$

Equação 2.1 – Integral que calcula a área existente abaixo da curva formada pelo valor das lacunaridades dos r_s (2 a 10).

Dentre as indicações do uso desta medida, encontra-se na literatura o uso da lacunaridade na análise de diversas imagens. Na área das ciências biológicas e da saúde, as principais aplicações são nas imagens histológicas variadas e imagens provenientes de exames radiográficos, tomográficos ou de ressonância magnética. Juntamente com outras características tais como cálculo da área e perímetro dos buracos; cálculo dos valores em porcentagem dos buracos e das áreas circundantes

nas imagens; cálculo da dimensão fractal; dentre outros, pode-se estabelecer parâmetros de comparação e/ou avaliação estrutural. Portanto, a técnica da lacunaridade é utilizada a fim de obter uma assinatura para as texturas analisadas (Rabelo et al., 2010). Estas assinaturas são utilizadas na segmentação das imagens em diferentes regiões de similaridade, sendo essas regiões obtidas através do uso de análise de aglomerados sobre as assinaturas (Backes; Bruno, 2006).

Uma das indicações do uso da lacunaridade é a avaliação da microarquitetura do tecido ósseo. A utilização das imagens histológicas digitalizadas, advindas do tecido ósseo, para acesso da lacunaridade e outras características já foi realizada em estudo prévio (Rabelo et al., 2010). Assim, resultados publicados anteriormente demonstraram que a análise da lacunaridade e outros parâmetros, como porcentagem de matriz óssea, foram efetivas em demonstrar diferenças no tecido ósseo cortical, comparando tecido ósseo normal e alterado após radioterapia.

Oliveira et al. (2006) utilizaram análise da lacunaridade, juntamente com outras dez características avaliadas nas imagens do tecido ósseo proveniente da tíbia de frangos, encontrando diferença histológica entre os grupos estudados, sob diferentes fontes de alimentação.

2.4 Reconstrução Tridimensional

A visualização computacional, área de pesquisa que estuda estratégias e algoritmos para mapear informações em representações gráficas, pode ser usada para reconstrução tridimensional, onde é possível transformar um conjunto de dados numéricos (os *voxels*, correspondentes 3D dos *pixels*) em uma representação gráfica (Travençolo, 2007). Travençolo et al. (2007) identificaram um novo método para caracterização tridimensional de estruturas biológicas, utilizando processamento de imagens digitalizadas. Primeiramente, as imagens são trabalhadas a fim de estabelecer os padrões que permitem seu alinhamento e seu sequenciamento, para a reconstrução tridimensional (R3D), e depois utilizar desta reconstrução para identificar as interações entre as estruturas biológicas.

Utilizando o modelo tridimensional obtido a partir de algumas imagens, foi possível observar as fases do desenvolvimento de um organismo (*Echinococcus*

granulosus). Para que a R3D fosse possível, assumiu-se dois conjuntos de voxels, sendo que cada voxel em uma imagem 3D corresponde a um ponto, e esses dois conjuntos se referiam basicamente à estrutura a ser analisada e ao fundo da imagem, sendo então possível fazer a distinção da estrutura e sua posterior análise (Travençolo et al., 2007).

Figura 2.1 – Visualização tridimensional de uma estrutura biológica retirada do artigo “A new method for quantifying three-dimensional interactions between biological structures” de Travençolo et al. (2007). Em (a), (b) e (c) pode-se observar o organismo em diferentes estágios de evolução e as pequenas esferas representam a distribuição dos núcleos das células e sua respectiva organização de acordo com o estágio analisado. As linhas que delimitam a estrutura separam em diferentes nuances de cores, de acordo com a mudança da distância dos núcleos aos pontos estabelecidos em regiões específicas da estrutura

Os estudos que utilizam metodologias de reconstrução tridimensional já foram também aplicados a material proveniente do osso. Da Fontoura Costa et al. (2006) estabeleceram a reconstrução tridimensional do sistema de canais do tecido ósseo utilizando imagens histológicas e programas de computação gráfica, acessando as informações sobre a distribuição dos canais por uma rede complexa, que exibe uma disposição em comunidades regulares dos mesmos, em um padrão hierárquico, ao longo da estrutura óssea. Ainda, os mesmos autores desenvolveram a R3D a partir de imagens histológicas advindas de tecido ósseo descalcificado de úmero de gato, para acessar os cortes seriados e fazer a reconstrução tridimensional. A partir de programas de computador, a reconstrução foi possível, e a partir dela foi possível observar o intrincamento e a distribuição da rede de canais (Havers e Volkmann) do osso analisado. Os autores concluíram que a diferença na densidade encontrada entre os canais sugere a existência de centros de distribuição

na rede de canais; ainda, que as ramificações encontradas apresentam uma tendência a exibirem nós (pontos que iniciam ramificações) de grau 3; e, a aplicação desta análise por hierarquização da distribuição dos canais pode ajudar a entender como acontece a distribuição dos mesmos pelo tecido.

Viana et al. (2009) acessaram a R3D de um osso por inteiro, utilizando a caracterização da rede complexa, baseada em gráficos, e dos nós e pontos de distribuição encontrados na ramificação dos canais. Os achados sugerem que as subcomunidades encontradas, se comunicam entre si, por vezes de uma forma mais intensa em algumas comunicações do que entre outras, ainda, que estas subcomunidades exibem características topográficas distintas, que podem ser relacionadas com suas funções específicas. Os autores acharam também que, em casos de situações tais como indução de fraturas, estas redes podem exibir maior robustez, quando comparadas à redes regulares semelhantes (com mesmo número de ramificações e nós).

2.5 Ensaio Biomecânicos, Tecido Ósseo e Bisfosfonatos

Os ensaios mecânicos são executados com o objetivo de se determinar a relação existente entre esforços aplicados ao material e sua reação a esses esforços. Basicamente, os principais ensaios mecânicos utilizados são: dureza, flexão e tração. A dureza pode ser definida como a capacidade do material resistir ao risco de ser deformado plasticamente, de ser cortado, de absorver energia no impacto ou de resistir ao desgaste. Além da dureza convencional (macro dureza), existe a microdureza, e a diferença entre o ensaio de dureza convencional e microdureza consiste na intensidade da carga usada para comprimir o penetrador. Trata-se de um teste pelo qual um penetrador acoplado a uma máquina produz uma indentação na superfície da amostra, e que no caso da microdureza, esta marca somente é visível no microscópio (Elias; Lopes, 2007).

A dureza é uma propriedade importante, pois estima o valor aproximado da resistência mecânica dos materiais. Um tipo de microdureza é a microdureza Knoop (HK) e seu cálculo é possível utilizando uma fórmula matemática e os seguintes parâmetros: área da indentação projetada, carga aplicada, comprimento da diagonal

maior de impressão em micrômetro e uma constante do penetrador que relaciona a área da deformação com o comprimento da diagonal maior do penetrador (Elias; Lopes, 2007).

O teste de flexão consiste na aplicação de uma carga compressiva na direção perpendicular ao eixo longitudinal do corpo-de-prova (CP) com o objetivo de avaliar sua resistência ao encurvamento (deformação elástica). No ensaio de flexão determina-se basicamente: limite de resistência à flexão e módulo de elasticidade. O ensaio de flexão em três pontos é realizado com o aumento gradativo da carga seguido de descarregamento. O final da região elástica é determinado quando, após sucessivos carregamentos crescentes e descarregamentos, verifica-se a existência de deformação permanente (Elias; Lopes, 2007).

A análise que utiliza o teste de compressão pode ser feita com algumas formas de se avaliar o módulo de Young. O método mais simples é submeter o material a uma força de compressão e medir sua deformação. O teste de compressão determina o comportamento do material sob cargas compressivas. A amostra é comprimida e as deformações nas diversas cargas são gravadas (Elias; Lopes, 2007).

Bilston et al. (2002) avaliaram o uso do AZ no procedimento de distração osteogênica. Os animais foram submetidos ao procedimento de distração osteogênica, e 28 dias após, foi administrada a droga, em um esquema de 0,1 mg/kg, em dose única ou com repetição caracterizando um subgrupo de duas doses, sendo o intervalo de 14 dias. Para análise biomecânica foi realizado o teste de flexão em 4 pontos, onde foi realizada uma força no esquema da faixa de 2 mm/minuto. A deformação e o módulo de elasticidade foram calculados. Não houve diferença significativa nas tíbias não operadas, no entanto, nas tíbias que foram submetidas ao procedimento cirúrgico, a diferença foi estatisticamente significativa no quesito “carga máxima” (F_{peak} (N)), entre os grupos controle (415), dose única (536) e dose dupla (791) ($p < 0,05$).

Day et al. (2004) utilizaram o teste de compressão para acessar o módulo de Young em vértebras de animais que utilizaram dois tipos de bisfosfonatos, o risedronato e o alendronato. Juntamente com outras técnicas, como microCT (micro tomografia computadorizada) e construção de modelos de elementos finitos, os autores concluíram que o uso dos BFs aparentemente elevaram o módulo de Young, diminuíram o *turnover* ósseo, aumentaram a densidade da matriz descalcificada e

aumentaram os micro-danos. No entanto, é importante ressaltar que os autores utilizaram um esquema de doses de 5 a 6 vezes maior que o esquema utilizado para o tratamento da osteoporose, sendo os animais tratados por 12 meses.

Pereira et al. (2009) avaliaram a tíbia de ratas, após ooforectomia bilateral e uso de AZ, utilizando testes biomecânicos e análise histomorfométrica. Para determinação das propriedades biomecânicas foram realizados ensaios de flexão em três pontos, com os ossos apoiados, horizontal e individualmente, em suas extremidades, sobre dois blocos de madeira. Os animais também foram pesados periodicamente e eutanasiados 12 meses após a administração da droga. Os autores concluem que o AZ não aumentou significativamente a resistência óssea da diáfise tibial ou a área trabecular óssea diafisária, sem diferença significativa entre os valores de média da carga máxima suportada, não tendo sido encontrada ainda influência no peso dos animais.

Pozzi et al. (2009) utilizaram o teste de flexão em 3 pontos nos fêmures de ratos que utilizaram o AZ em três esquemas de administração: 0,05, 0,5 e 1 mg/Kg, e compararam com o grupo controle. Juntamente com outros testes também realizados, os autores concluíram que o grupo AZ apresentou aumento na fragilidade, quando agrupadas as três doses em um único grupo de comparação. Já no cálculo da força máxima, houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo AZ, não havendo diferença entre os subgrupos AZ (0,5 mg/Kg e 1 mg/Kg). No cálculo do módulo de elasticidade, houve diferença significativa entre os grupos controle *versus* AZ 0,5 mg/Kg, e, controle *versus* AZ 1 mg/Kg; sendo que, para os testes biomecânicos, o subgrupo AZ tratado com dose de 0,05 mg/Kg não foi testado.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a microarquitetura, caracterizando a rede de canais e o sistema lacuno-canalicular, e também, as propriedades biomecânicas, do osso cortical de ratos Wistar tratados com Ácido Zoledrônico.

Objetivos Específicos

- Estudar alterações na microarquitetura óssea, avaliando a rede de canais do osso cortical da tíbia e mandíbula de ratos Wistar, submetidos ou não ao tratamento com ácido zoledrônico, em animais de idades diferentes.
- Avaliar as propriedades biomecânicas por meio de ensaios de flexão, compressão e microdureza nos fêmures, para comparação entre os animais que utilizaram o ácido zoledrônico e os animais controle.
- Elaborar a reconstrução tridimensional da rede de canais e do sistema lacunocanalicular do osso cortical da tíbia, a partir de imagens histológicas digitalizadas advindas de cortes seriados, caracterizando a interconectividade dos canais e osteócitos, além da sua distribuição na matriz óssea.
- Comparar os grupos controle e teste usando a reconstrução tridimensional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 21 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*), esqueleticamente maduros, divididos em dois grupos de idades diferentes: um grupo com animais de aproximadamente 4 meses de idade e pesando entre 250 e 350 gramas e outro com animais de aproximadamente 9 meses de idade, pesando entre 380 e 650 gramas (Tabela 4.1). Todos os animais foram alojados em grupos de dois a cinco animais por gaiola e foram alocados em ambiente climatizado, sob ciclo de 12 horas luz/escuro e alimentação com ração e água *ad libitum*.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas, registrado sob número 041, na folha 100 do livro 02 no dia 31/05/2011 com validade de três anos, sob orientação da Prof. Dra. Marina Helena Cury Gallottini e do Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira (Anexo A). Parte dos animais também fazia parte do projeto “A influência dos bisfosfonatos na osseointegração de implantes de titânio: Estudo experimental em ratos” do pesquisador Márcio Augusto de Oliveira, também sob orientação da Prof. Dra. Marina Helena Cury Gallottini, aprovado em 06 de agosto de 2009 (Anexo B).

Para cada grupo de idade (4 e 9 meses), os animais foram subdivididos em grupo teste (n=9 nos animais de 4 meses e n=6 nos animais de 9 meses) e grupo controle (n=3) (Tabela 4.1). Os animais do grupo teste receberam administração de ácido zoledrônico (7,5 µg/kg) diluído em solução salina, sob o esquema de 3 doses, sendo uma dose por semana por via subcutânea em região peritoneal.

Os animais do grupo controle não receberam qualquer droga. Todos os animais foram sacrificados com uso de câmara de CO₂, em períodos específicos. Os dados referentes aos animais, doses administradas e tempos de eutanásia estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Divisão dos grupos, tipo de tratamento e tempo de eutanásia após o uso da medicação

Grupos		Número de animais	Tratamento	Doses	Eutanásia Pós Medicação	Código
1 (4M)	Teste	9	AZ (7,5 µg/kg)	3 doses	14 dias 42 dias 75 dias	Z4M14 Z4M42 Z4M75
	Controle	3	Não realizado	-	-	C4M
2 (9M)	Teste	6	AZ (7,5 µg/kg)	3 doses	14 dias 75 dias	Z9M14 Z9M75
	Controle	3	Não realizado	-	-	C9M

AZ – Ácido Zoledrônico. M – Meses

De cada animal foram removidos a tíbia esquerda, ambos os fêmures e a mandíbula, sendo estes imediatamente fixados em formol 10% por 48 horas, com exceção dos animais do grupo Z4M42, dos quais foram removidas apenas as mandíbulas. As peças provenientes das tíbias e mandíbulas foram descalcificadas utilizando solução de EDTA à 5% (pH 7.4) e seccionadas com auxílio de navalha (Figura 4.1). As peças então foram processadas para inclusão em parafina pela técnica convencional.

Figura 4.1 – Amostras. A) Amostra de mandíbula. O tracejado em vermelho indica o local da segmentação da peça para estabelecer o plano de inclusão. B) Amostra de tíbia. Os dois tracejados em vermelho indicam a delimitação da área escolhida para processamento e inclusão

De cada bloco proveniente das tíbias foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura, compreendendo osso cortical e a parte medular (corte transversal), para análise da lacunaridade. Para reconstrução tridimensional obtinha-se uma média de 15 a 25 cortes seriados de 3 µm de espessura. Das mandíbulas,

obteve-se o esquema de cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura, onde era possível observar a raiz do primeiro molar e internamente o incisivo de crescimento contínuo.

Todos os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e analisados ao Microscópio de Luz. As peças provenientes dos fêmures dos animais não passaram pelo processo de descalcificação e foram utilizadas para análise das propriedades biomecânicas.

4.1 Análise Histomorfométrica

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio binocular, acoplado a câmera de alta resolução (AxioVision, Zeiss) e foram obtidas imagens histológicas digitalizadas. Em cada corte, as regiões selecionadas foram: nas tíbias, foram selecionadas áreas aleatórias na cortical óssea; nas mandíbulas, as áreas selecionadas foram: a) uma área adjacente à raiz do primeiro molar, correspondendo a cortical externa (vestibular) ou interna (lingual); b) uma área aleatória na basal da mandíbula, adjacente ao incisivo de crescimento contínuo (Figura 4.2). As imagens foram capturadas com lente objetiva de aumento original de 40X.

Figura 4.2 – Imagem histológica digitalizada. A) Imagem panorâmica da mandíbula (Hematoxilina e Eosina. 2.5X). As regiões demarcadas em vermelho correspondem às regiões de escolha das áreas a serem capturadas em maior aumento. A seta indica a raiz mesial do primeiro molar. B) Imagem panorâmica do corte transversal da tíbia. A região demarcada em vermelho exemplifica uma área aleatória escolhida para captura da imagem em maior aumento

As imagens digitalizadas foram submetidas ao processo de segmentação interativa (Oliveira et al., 2006). Utilizando o Programa GIMP 2.6.11 GNU Image Manipulation Program (Copyright (C) 1995-2008), foram selecionadas e subtraídas as regiões de interesse (ROIs), que correspondiam principalmente às áreas de canais vasculares, deixando na imagem apenas a área correspondente à matriz óssea. As imagens segmentadas foram transferidas para escala de cinza e inseridas no ambiente de programação SCILAB. Após processamento, foram obtidas imagens binárias e nestas imagens as regiões de matriz óssea foram caracterizadas pela coloração negra e as regiões de canais ósseos pela coloração branca, estas denominadas de Regiões de Interesse (ROI) (Figura 4.3).

Figura 4.3 – A) Imagem histológica digitalizada (Hematoxilina e Eosina. 40X). Os canais ósseos, preenchidos por vasos sanguíneos e nervos, são selecionados e subtraídos da imagem. B) Após a subtração das áreas correspondentes aos canais, a imagem é transferida para escala de cinza. C) A imagem é inserida no ambiente de programação SCILAB e convertida em imagem binária. A seta em vermelho mostra uma das ROIs

Por meio de algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação SCILAB (Oliveira et al., 2006), foram obtidos os seguintes dados relativos à cada imagem: porcentagem de matriz óssea por área, área e perímetro das ROIs, seus respectivos desvios-padrão e lacunaridade. Os valores numéricos obtidos em cada imagem, referentes ao respectivo parâmetro analisado, correspondiam ao número de pixels calculado.

4.2 Reconstrução Tridimensional

Para a reconstrução tridimensional, foram feitos cortes seriados (de 15 a 20) de 3 μm de espessura de 4 blocos, provenientes de amostras significativas dos

respectivos grupos: controle de 4 meses, teste de 4 meses (no tempo de eutanásia de 14 dias), controle de 9 meses e teste de 9 meses (no tempo de eutanásia de 14 dias). Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados em Hematoxilina e Eosina. A partir destes cortes foram capturadas imagens histológicas utilizando microscópio acoplado à câmera de alta resolução, para digitalização. No corte era escolhida uma região aleatória para captura da imagem, respeitando o parâmetro de tentar sempre capturar áreas que sugerissem processo de remodelação prévio. As imagens histológicas digitalizadas, obtidas a partir destes cortes em série, foram agrupadas, formando volumes tridimensionais, conforme a técnica descrita por Travençolo (2007) (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Figura retirada da tese de Doutorado de Bruno Augusto Nassif Travençolo (2007). A figura exemplifica o corte seriado, a partir de um bloco de parafina (a); os cortes feitos no micrótomo e ordenados de forma sequencial; (b) os mesmos são corados em hematoxilina e eosina, devidamente identificados e digitalizados em sequencia; (c) enfim, procede-se o alinhamento e agrupamento das imagens e construção do volume tridimensional

Para a técnica da reconstrução tridimensional, primeiramente foi necessário realizar a reamostragem dos *voxels* (correspondente 3D dos *pixels*), que consistiu em fazer uma padronização para que o tamanho representado pelos *voxels* em todas as direções fosse o mesmo, ou seja, o tamanho do pixel na direção do eixo x seria igual ao tamanho de um pixel na direção do eixo y e que, também, seria igual ao tamanho do pixel na direção de z. Após a reamostragem, foi realizada a segmentação, que consistiu na utilização de programas de computação para trabalhar nas imagens, identificando, por meio da transformação binária (Gonzalez e Woods, 2008), as diferentes estruturas encontradas, ou seja, delimitando e identificando os canais e as lacunas dos osteócitos.

Posteriormente, utilizou-se a transformada distância (Gonzalez e Woods, 2008), que consistiu em determinar os valores da distância mínima, em *voxels*, de

todos os *voxels* na imagem, em relação aos *voxels* que compõem o objeto, neste caso, os canais previamente identificados. Depois dos cálculos realizados, foi estabelecida a visualização da imagem tridimensional, e a partir deste esquema gráfico, foi calculado o centroide das estruturas compatíveis com os osteócitos, e sua distância mínima ao canal mais próximo.

Na imagem tridimensional, foi possível estabelecer as linhas de isosuperfícies de distância, que correspondem a diferentes localizações de estruturas específicas com a mesma distância do objeto, ou seja, neste estudo a isosuperfície representou a mesma distância daqueles osteócitos que se distribuíam no entorno do canal em relação ao canal mais próximo. A partir de todos os dados numéricos encontrados e da análise qualitativa das imagens, pode-se estabelecer indícios que revelavam a distribuição e organização dos osteócitos em relação aos canais de Havers e Volkmann.

4.3 Análise Biomecânica

Para os testes biomecânicos, após a eutanásia, as pernas dos animais eram dissecadas e os fêmures desarticulados, para não haver perda de estrutura dos mesmos. Após a remoção, os fêmures foram fixados em formol 10% por 72 horas e armazenados. Para remoção dos fragmentos de tecido mole adjacentes ao osso, estes foram colocados em solução de Hipoclorito de Sódio 5% por três horas. Após, foram lavados em água destilada e os remanescentes de tecido foram retirados com auxílio de navalha.

Todos os fêmures foram pesados em balança eletrônica e medidos com auxílio de paquímetro (Paquímetro 6" Lee Tools®). Os dados foram anotados em tabela e as peças foram novamente armazenadas em solução de formol 10% para os testes. Para padronização do comprimento todos os fêmures foram seccionados com disco diamantado (isomet), conforme demonstrado na Figura 4.5

Figura 4.5 – Fêmur seccionado com disco diamantado na ISOMET

Em todos os experimentos, os espécimes confeccionados mediam 20mm de comprimento (Figura 4.6). Foram feitas cinco repetições para o teste de microdureza e dois para os testes de compressão e flexão. Nos casos de compressão e flexão foi fixada uma deformação de 0,15% do tamanho inicial do corpo de prova.

Figura 4.6 – Tamanho padrão de 20 mm para os corpos de prova

Foram realizados quatro tipos de experimento para avaliar os seguintes parâmetros: Microdureza, Compressão e Flexão.

4.3.1 Microdureza

Foi realizado o teste de microdureza para determinar as propriedades elásticas e viscoelásticas associadas ao osso. Foi avaliada a dureza Knoop (Figura 4.7). A fim de obter uma superfície plana o espécime foi fixado em resina composta, previamente aplainado e polimerizado por 40 segundos. Os ossos foram polidos com branco de Espanha até a obtenção de uma superfície lisa e brilhante. Para cada corpo de prova foram realizadas cinco endentações e obtida uma média para a análise estatística.

Figura 4.7 – Teste de microdureza Knoop

4.3.2 Compressão

O teste de microcompressão foi realizado na máquina universal de ensaios (INSTRON) (Figura 4.8). As bases metálicas de apoio foram regularizadas e polidas. O corpo foi fixado com uma camada delgada de resina composta nas extremidades. Atentou-se para manter o corpo de prova hidratado desde sua fixação até os testes serem realizados.

Figura 4.8 – Teste de microcompressão

A tensão de compressão e deformação foram calculadas e representadas através do gráfico tensão-deformação (Gráfico 4.1).

Gráfico 4.1 – Gráfico tensão-deformação

Com a finalidade de padronizar os diferentes testes, foi fixada uma deformação de 0,15% do tamanho inicial do corpo de prova. Com os dados extraídos do gráfico tensão-deformação (Gráfico 4.1) foi possível determinar o limite elástico da amostra através da equação abaixo:

$$E = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta l}{l_0}} = \frac{F.l_0}{A.\Delta l}$$

Equação 4.1 – Módulo de elasticidade. “E” é o módulo de Young, medido em pascal; “F” é a força, medida em newton; “A” é a área da secção através da qual é exercida a tensão medida em milímetros quadrados; Δl é a variação do comprimento, medida em milímetros; l_0 é o comprimento inicial, medido em milímetros.

Em decorrência das limitações da amostra, com volumes diferentes de conteúdo mineral e cortical optamos pelo cálculo da área média do espécime. Utilizando-se o Princípio de Arquimedes, foi verificado o volume como parâmetro físico do osso, para cálculo da densidade mineral óssea. A partir de pesagens com o osso imerso em água e livre (em balança eletrônica), chegou-se ao volume ósseo e através da fórmula obteve-se área média ($V = \pi.r^2.h$ - $V = (A).h$ - r = raio de uma face circular, h = altura).

4.3.3 Flexão

O teste biomecânico escolhido foi o de flexão em três pontos (Figura 4.10), devido à forma não uniforme do corpo de prova. Foi confeccionado um dispositivo com rolamentos nas extremidades de apoio, com a finalidade de reduzir o atrito durante a aplicação da carga. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido póstero-anterior, no meio da distância entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com um rolete fixado na sua extremidade. Como no teste de microcompressão foi fixada uma deformação de 0,15% do tamanho inicial do corpo de prova.

Figura 4.9 – Teste de flexão em três pontos

Considerou-se, para análise, a carga máxima. A partir do gráfico, procurou-se relacionar a carga com a deformação óssea (em mm) para a verificação da

rigidez óssea (N/mm), que representa a capacidade do osso de resistir a uma carga considerando-se sua superfície, através da equação:

$$E = F.L^3 / 3d(\pi.h/4)$$

Equação 4.2 - E é o módulo de Young, medido em pascal, F é a força, medida em newton, L é o comprimento do corpo de prova em milímetros, d é a deflexão, medida em milímetros e h é a altura, medida em milímetros

4.4 Análise Estatística

Na análise histomorfométrica, para análise dos dados foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição. Na comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste T não pareado, quando a distribuição foi normal, e Mann Whitney, quando não houve distribuição normal. Na comparação que envolvia três variáveis, foi utilizado o teste ANOVA, para os que seguiram a distribuição normal, e Kruskal-Wallis, para os que não apresentaram distribuição normal. A análise que mostrou diferença significativa entre os grupos, foi reavaliada com o pós teste, sendo o teste de Tukey para os dados com distribuição normal e o teste de Dunn's para os com distribuição não normal. Para os ensaios biomecânicos foi realizado o teste ANOVA.

5 RESULTADOS

No período do estudo foram realizadas observações periódicas nos animais e não foram encontradas alterações em pele e não houve óbito em nenhum dos animais. No momento da dissecação dos ossos, em um dos animais sacrificado no período de 42 dias após o uso da medicação, foi encontrada uma lesão em mandíbula, unilateralmente, que foi interpretada como uma osteonecrose espontânea (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Vista lateral de uma mandíbula no momento da macroscopia. Nota-se a lesão presente na parte superior posterior, caracterizada por uma deformação de bordas irregulares e coloração escurecida

Nos cortes histológicos foi possível observar o tecido ósseo com características de normalidade. Em ambos os grupos, observou-se osso lamelar, com presença de canais e lacunas. Observou-se também a existência de linhas basofílicas e algumas áreas focais de formato irregular, por vezes preenchidas por material de coloração fracamente basofílica, interpretadas como áreas de matriz orgânica não calcificada. Em alguns espécimes, evidenciaram-se também algumas áreas de microtrincas (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Imagens histológicas. (A) Tecido ósseo lamelar, com presença de canais e osteócitos, sem áreas sugestivas de remodelação. (B), (C) e (D) Tecido ósseo com presença de sistemas de Havers, osteócitos incluídos na matriz e áreas compatíveis com características que indicam remodelação.
Seta azul – Linhas basofílicas. Seta vermelha – Micro-trinca. Seta verde – Áreas de matriz não calcificada

Quanto aos resultados da análise da lacunaridade e das demais características avaliadas na histomorfometria, foi observado que na comparação entre a cortical superior e cortical inferior de todas as mandíbulas foi encontrada diferença significativa, mostrando que a cortical mandibular apresentava uma microarquitetura dos canais distinta entre a parte superior, próxima aos molares, da parte inferior, mais precisamente na basal da mandíbula, abaixo do incisivo de crescimento contínuo (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Comparação entre os resultados das médias dos valores da cortical superior *versus* cortical inferior da mandíbula de todos os animais

	Área	DP da Área	Perímetro	DP do Perímetro	Porcentagem de Matriz (DP)	Lacunaridade
Cortical Superior	4051	4826	317.8	213.9	93,13 (4,19)	8.076
Cortical Inferior	1981	1422	227.8	94.77	97,00 (1,85)	12.06
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

DP – Desvio padrão

Os resultados da comparação das corticais, na parte superior e na parte inferior, entre os grupos controle e teste nos animais com idades diferentes, não revelou uma diferença significativa, mostrando uma similaridade na microarquitetura dos canais ósseos, mesmo com o uso do AZ (Tabelas 5.2 até 5.5).

Tabela 5.2 – Comparação entre as médias dos grupos em relação aos resultados da cortical superior da mandíbula, nos animais de quatro meses

Grupo	Área	DP da Área	Perímetro	DP do Perímetro	Porcentagem de Matriz (DP)	Lacunaridade
Controle	4031	4699	328.5	244.8	92,79 (4,28)	5.610
Teste 14D	3722	5368	294.6	206.1	92,55 (5,14)	8.371
Teste 42D	2659	2900	298.2	228.4	95,77 (3,56)	10.81
Teste 75D	4050	3724	343.9	211.7	93,27 (4,18)	8.558
p	0.3926	0.3892	0.6469	0.9052	0.3095	0.1737

DP – Desvio padrão

Tabela 5.3 - Comparação entre as médias dos grupos em relação aos resultados da cortical inferior da mandíbula, nos animais de quatro meses

Grupo	Área	DP da Área	Perímetro	DP do Perímetro	Porcentagem de Matriz (DP)	Lacunaridade
Controle	1677	1998	207.7	138.5	95,50 (2,30)	9.887
Teste 14D	2217	1641	240.1	99.52	96,68 (2,14)	10.12
Teste 42D	1799	1333	253.0	125.4	96,57 (1,98)	11.85
Teste 75D	2147	1406	240.8	89.81	97,12 (1,85)	14.02
p	0.6511	0.2598	0.2859	0.1834	0.4153	0.2824

DP – Desvio padrão

Tabela 5.4 - Comparação entre as médias dos grupos em relação aos resultados da cortical superior da mandíbula, nos animais de nove meses

Grupo	Área	DP da Área	Perímetro	DP do Perímetro	Porcentagem de Matriz (DP)	Lacunaridade
Controle	4389	4674	315.1	182.8	94,87 (3,97)	10.61
Teste 14D	3553	4311	281.3	169.5	93,48 (3,78)	8.705
Teste 75D	4564	6180	343.7	268.4	91,83 (4,23)	6.603
p	0.7396	0.5044	0.6503	0.2576	0.2902	0.2904

DP – Desvio padrão

Tabela 5.5 - Comparação entre as médias dos grupos em relação aos resultados da cortical inferior da mandíbula, nos animais de nove meses

Grupo	Área	DP da Área	Perímetro	DP do Perímetro	Porcentagem de Matriz (DP)	Lacunaridade
Controle	2014	1331	237.3	99.47	97,63 (1,44)	13.89
Teste 14D	1701	1201	193.7	77.56	97,81 (1,37)	10.57
Teste 75D	2132	954.6	247.4	63.76	97,24 (1,24)	13.87
p	0.5235	0.7965	0.2745	0.4024	0.6614	0.4061

DP – Desvio padrão

Na análise das imagens provenientes das tíbias, houve diferença significativa entre os grupos controle e teste, apenas nos animais com 4 meses de idade. Os dados revelam que nos animais de 4 meses a área, perímetro e seus respectivos desvios-padrão foram maiores após o uso da droga, enquanto que, a porcentagem de matriz foi menor. Nos animais de 9 meses, nenhuma diferença significativa foi observada (Tabelas 5.6 e 5.7).

Tabela 5.6 - Comparação entre as médias dos grupos em relação aos resultados da cortical da tíbia, nos animais de quatro meses

Grupo	Área	DP da Área	Perímetro	DP do Perímetro	Porcentagem de Matriz (DP)	Lacunaridade
Controle	899.8 ^b	762.8 ^b	181.1 ^b	93.99 ^b	97,16 (1,12) ^a	13.36
Teste 14D	2180 ^a	2264 ^{a,b}	265,6 ^a	180.0 ^{a,b}	93,47 (3,71) ^b	8.711
Teste 75D	2223 ^a	2685 ^a	283.0 ^a	257.0 ^a	93,57 (3,47) ^b	8.833
p	0.0031*	0.0338*	0.0068*	0.0297*	0.0235*	0.0608

DP – Desvio padrão. * - Representa diferença estatisticamente significativa. Letras iguais representam grupos estatisticamente semelhantes. Área, DP área, Perímetro, DP perímetro – Kruskal Wallis. Porcentagem de matriz – ANOVA.

Tabela 5.7 - Comparação entre as médias dos grupos em relação aos resultados da cortical da tíbia, nos animais de nove meses

Grupo	Área	DP da Área	Perímetro	DP do Perímetro	Porcentagem de Matriz (DP)	Lacunaridade
Controle	1345	1267	210.2	131.6	96,16 (2,15)	12.34
Teste 14D	1378	1339	204.3	136.5	97,18 (0,98)	13.52
Teste 75D	1417	1726	245.7	219.8	95,74 (1,90)	11.67
p	0.3614	0.9044	0.2640	0.9124	0.2197	0.3600

DP – Desvio padrão

Nos testes biomecânicos foi observada diferença significativa entre os grupos nos quesitos densidade, módulo de elasticidade e peso, enquanto que, na propriedade que se refere à dureza do material avaliado (microdureza Knoop), os grupos foram estatisticamente semelhantes. Nota-se que os valores maiores estão presentes nos grupos de animais com mais idade (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Comparação entre os grupos em relação aos resultados encontrados nos testes biomecânicos

Grupo (†)	Dureza HK (DP)	Módulo de Elasticidade da peça anatômica GPa (DP)	Densidade g/cm ³ (DP)	Peso
C4M (6)	21 (3.8) ^a	11.2 (1.4) ^b	1.65 (0.03) ^{b,c}	0,949 ^c
Z4M14 (6)	21 (2.9) ^a	10.3 (1.0) ^b	1.63 (0.02) ^c	0,851 ^c
Z4M75 (8)	23 (5.9) ^a	15.5 (2.5) ^a	1.73 (0.04) ^a	1,095 ^{b,c}
C9M (10)	22 (3.6) ^a	14.3 (3.3) ^{a,b}	1.71 (0.04) ^{a,b}	1,302 ^{a,b}
Z9M14 (10)	19 (2.8) ^a	16.8 (2.1) ^a	1.76 (0.01) ^a	1,320 ^{a,b}
Z9M75 (12)	28 (5.9) ^a	16.7 (3.3) ^a	1.70 (0.01) ^{a,b,c}	1,457 ^a

† - Idade no momento da eutanásia, em meses. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,01$). DP – Desvio padrão.

Para a técnica de reconstrução tridimensional as amostras selecionadas foram provenientes de dois animais do grupo controle, com idade de 4 e 9 meses, e também, foram selecionados animais do grupo teste sacrificados aos 14 dias após o uso do medicamento, também de 4 e 9 meses. Os resultados obtidos estão dispostos nas figuras 5.3 e 5.4, e, nos gráficos 5.1 e 5.2.

Figura 5.3 – Reconstrução tridimensional de duas amostras representativas dos animais com 4 meses de idade. Nota-se a presença dos canais em transparência, permitindo a visualização de seu trajeto. As linhas que circundam os canais e se organizam conforme a distância dos canais representam as isosuperfícies de distância. As pequenas esferas representam os osteócitos. As cores de esferas mais escuras representam os osteócitos mais próximos dos canais, enquanto que as esferas de cor mais clara representam aqueles que estão mais longe dos canais. (A) Grupo controle. (B) Grupo teste

Gráfico 5.1 – O gráfico representa a distribuição dos osteócitos em relação aos canais ósseos, quanto à sua distância, nas amostras analisadas provenientes dos animais de 4 meses de idade. No eixo horizontal estão representadas as linhas de isosuperfícies de distância, da mais próxima para a mais distante. No eixo vertical, está representada a quantidade dos osteócitos

Figura 5.4 – Reconstrução tridimensional de duas amostras representativas dos animais com 9 meses de idade. Nota-se a presença dos canais em transparência, permitindo a visualização de seu trajeto. As linhas que circundam os canais e se organizam conforme a distância dos canais representam as isosuperfícies de distância. As pequenas esferas representam os osteócitos. As cores de esferas mais escuras representam os osteócitos mais próximos dos canais, enquanto que as esferas de cor mais clara representam aqueles que estão mais longe dos canais. (A) Grupo controle. (B) Grupo teste

Gráfico 5.2 – O gráfico representa a distribuição dos osteócitos em relação aos canais ósseos, quanto à sua distância, nas amostras analisadas provenientes dos animais de 9 meses de idade. No eixo horizontal estão representadas as linhas de isosuperfícies de distância, da mais próxima para a mais distante. No eixo vertical, está representada a quantidade dos osteócitos

6 DISCUSSÃO

O uso do ácido zoledrônico no tratamento adjuvante do câncer e no tratamento da osteoporose está cada vez mais sendo preconizado, na tentativa de se estabelecer benefícios com o uso da droga e possibilitar um controle adequado dos efeitos indesejados (Marx, 2011).

Os parâmetros farmacocinéticos e as propriedades moleculares dos bisfosfonatos nitrogenados garantem muitos benefícios, tais como alta especificidade com os osteoclastos, menores efeitos colaterais, e possibilidade de uso intermitente com uma grande gama de variedade em sua aplicabilidade, frente às doenças que enquadram a reabsorção óssea em seu mecanismo (Li et al., 2011).

Allen (2011) relatou que os BFs afetam os ossos maxilares de forma diferente quando comparados aos outros ossos, e que, os efeitos sítio-específicos deveriam ser mais estudados afim de estabelecer parâmetros na descoberta da diferença entre os ossos no esqueleto, e principalmente, tentar estabelecer uma etiologia para a osteonecrose dos maxilares associada ao uso dos BFs.

Os estudos com modelo animal experimental apontam para importância deste tipo de abordagem, para o entendimento das mudanças no tecido ósseo, principalmente frente ao uso de medicamentos e terapias. No estudo dos bisfosfonatos, os autores utilizam variadas doses e vias de administração, para melhor entender os acontecimentos no osso após o uso dos BFs. Allen et al. (2010) relataram que o uso do AZ na dose de 0,067 mg/Kg corresponderia a dose de 4 mg utilizada nos pacientes com câncer, utilizando esquema de ajuste da dose na proporção miligramas por quilo. Pozzi et al. (2009) utilizaram do esquema de que, assumindo que um paciente com mieloma múltiplo, de aproximadamente 70 Kg, recebe uma dose de 4 mg a cada mês, o cálculo seria de 0,05 mg/Kg/mês, e foram testadas então as dosagens de 0,05, 0,5 e 1 mg/Kg, por um período de três semanas, onde relataram que a densidade e o conteúdo mineral foram aumentados com o uso da dose menor, sem aumento significativo com as doses maiores.

Para nosso estudo, a dose foi a mesma utilizada por Sonis et al. (2009), no esquema de 7,5 µg/Kg de ácido zoledrônico, visto que, estes autores protocolaram um esquema para se estabelecer a osteonecrose dos maxilares associada ao uso dos BFs. A dosagem foi escolhida em razão de que uma pequena fração da droga já

refletiria em alterações importantes, visto o acentuado metabolismo dos ratos e consequentemente um rápido *turnover* ósseo, além de, ser um esquema também semelhante às dosagens utilizadas nos pacientes com mieloma múltiplo. No entanto, vale ressaltar que estas alterações foram encontradas porque os autores também lançaram mão de procedimentos, como a exodontia, e a administração conjunta da Dexametasona.

Em nosso experimento, a dose utilizada repercutiu em alterações diferentes e sítio-dependentes, o que evidenciou uma dificuldade para se estabelecer comparações com os outros dados encontrados na literatura, em razão da especificidade e particularidade dos estudos previamente realizados. Ainda, a dose utilizada atentou em acessar os efeitos exclusivos do uso do AZ na microarquitetura óssea, em regimes que refletissem o uso da droga tanto no esquema dos pacientes com câncer quanto naqueles que usam o BF injetável uma vez ao ano no tratamento da osteoporose, avaliando basicamente, o osso normal, sem procedimentos prévios, no que se refere à microarquitetura e o reflexo da sua alteração nas propriedades biomecânicas do osso.

Um dos animais apresentou uma lesão clínica compatível com osteonecrose. No entanto, existe a ressalva de interpretar essa condição como uma osteonecrose espontânea, ou mesmo, se houve algum trauma mínimo ou alguma condição que levaria a instalação de uma infecção seguida de um sequestro ósseo. Migliorati et al. (2005) relataram que os pacientes que estão em uso de BF, particularmente aqueles de uso endovenoso, apresentam a osteonecrose associada à algum trauma, extrações dentais ou infecções. Em um estudo com casuística de 18 pacientes que apresentaram esta condição, apenas dois tiveram seu aparecimento considerado como espontâneo, sem causa aparente.

Na análise histológica foi possível constatar a presença de áreas amorfas, por vezes alongadas e lineares, que foram interpretadas como microfissuras. Notou-se também a presença das linhas basofílicas, sugerindo que em todos os animais, na mandíbula e na tíbia, havia o indicativo de um processo de remodelação prévio. Ambos os ossos, mesmo em animais com idades diferentes e em sítios que apresentam diferentes taxas de *turnover*, esse processo de remodelação fisiológica era constatado. Gabet e Bab (2011) constataram que as microfissuras, ou microtrincas, estão presentes no osso cortical normal, e que, ainda, elas aumentam

com a idade e representam um acúmulo de danos microscópicos decorrentes de stress mecânico associado à carga fisiológica.

Mashiba et al. (2001) encontraram a presença destas microtrincas em animais que utilizaram BFs, de uso oral e endovenoso, na vértebra, íliaco e fêmur, em proporções de 8 a 18% das amostras. No entanto, a dose utilizada foi de 0,5 mg/Kg para o risedronato e 1 mg/Kg para o alendronato (uso oral), no período de 1 ano, o que os autores referem como um esquema que corresponde a 6 vezes a dose aprovada para tratamento da osteoporose em humanos. Day et al. (2004), também usando o esquema de doses 5 a 6 vezes maiores do que aquelas aprovadas para o tratamento da osteoporose, evidenciaram a presença destas microtrincas nas vértebras dos cães utilizados no estudo.

Na análise histomorfométrica, compreendendo os dados relativos à técnica da segmentação interativa e acesso à microarquitetura da rede de canais, primeiramente foi testada a hipótese da diferença na microestrutura na mandíbula, avaliando a distribuição e as características topológicas da rede de canais, em duas áreas distintas: na parte superior e na basal, esta última compreendida pela parte inferior. Foi encontrada diferença significativa, mostrando que estas áreas apresentam redes de canais topograficamente diferentes. Allen et al. (2010) também já haviam realizado análise da mandíbula considerando estas duas áreas separadamente, para avaliação das alterações após o uso do AZ, encontrando resultados diferentes nas respectivas regiões estudadas, com números de ósteons e taxas de aposição mineral maiores na mandíbula alveolar comparada com a basal, tanto no grupo controle quanto no grupo AZ.

Com relação às diferenças na mandíbula, na cortical superior, encontrou-se que em ambos os grupos, a área e perímetro dos canais revelaram valores altos, o que indica uma maior amplitude dos canais nestas áreas. Na cortical inferior, esses valores foram menores, também considerando os grupos controle e teste, ainda, com maiores valores de lacunaridade, revelando que os canais são menos amplos, e em maior número, o que é compatível com o osso basal, uma vez que é considerado mais compacto.

A diferença entre os grupos controle e teste não foi significativa em nenhum dos parâmetros analisados. Sustenta-se a hipótese de que a dose utilizada poderia não refletir em alterações estruturais, que pudessem ser evidenciadas com o uso desta técnica. Foi também considerado o fato de que os ossos maxilares

apresentam alta atividade, e que, o *turnover* ósseo e as taxas de remodelação são altos, quando comparadas com outros ossos (por exemplo, as tíbias). Alguns autores relataram que a taxa de remodelação é de 25% ao ano no osso alveolar e de 7% ao ano na basal mandibular, em cachorros (Allen; Burr, 2008; Allen et al., 2010). Estes achados sugerem que pode ter acontecido uma recuperação e estabilização da microarquitetura da rede de canais, mesmo após uma parada na remodelação, durante um certo tempo com o uso da droga.

Autores que avaliaram os efeitos do AZ em doses maiores encontraram resultados compatíveis com alterações estruturais e instalação de condições como inflamação e infecção. Senel et al. (2010) estudaram os efeitos do AZ em ratos, após esquema de dose de 0,1 mg/Kg, aplicadas três vezes na semana, por dois períodos distintos de 6 e 8 semanas, e verificaram que na parte anterior da mandíbula (área próxima ao forame mentoniano) e no fêmur não foram encontradas alterações histológicas, enquanto que, na parte posterior da mandíbula (área abaixo das raízes dos molares e acima do canal mandibular) foi observada área com presença de lacunas de osteócitos vazias e infiltrado inflamatório misto em 40% das amostras no grupo que utilizou a droga por 8 semanas, sendo que, eles afirmaram que 20% destes compreenderam os critérios para classificação como osteonecrose. Os autores relataram também que um dos animais apresentou necrose do tecido mole que recobria a parte vestibular da mandíbula. Por outro lado, Santamaria et al. (2010) administraram alendronato duas vezes por semana em um período de 3 meses, na dose total de 1 mg/Kg, e não encontraram diferença entre os grupos controle e teste nas maxilas, não havendo alterações na morfologia do osso alveolar.

Nas tíbias, houve diferença significativa nos parâmetros analisados, apenas nos animais de quatro meses de idade. Os valores de área e perímetro foram maiores quando comparados os grupos testes com o grupo controle, evidenciando maior amplitude dos canais. Os respectivos desvios-padrão de ambas as medidas também foram significativamente maiores, sugerindo canais mais disformes e heterogêneos, no grupo teste, tanto nos animais sacrificados 14 dias e 75 dias após o uso do AZ. Estes valores representam uma condição encontrada no grupo teste da presença de canais amplos e disformes, o que sugerem uma “atividade” dos mesmos e uma heterogeneidade na microarquitetura, refletindo na porcentagem de matriz óssea, com valores mais baixos nestes casos. Interessantemente, a diferença

significante e a variação nos dados não foram encontradas nas tíbias dos animais de nove meses de idade.

Em uma análise apropriada dos dados encontrados nas tíbias, sugere-se que a baixa taxa de remodelação intracortical nos ossos longos, em torno de 1% (Allen; Burr, 2008; Allen et al., 2010), poderia influir nos dados encontrados, visto que a mudança incrivelmente lenta na microarquitetura óssea, na rede de canais e na morfologia dos mesmos, poderia ter alguma influência na manutenção estrutural por um longo período, evidenciada assim na análise histológica. Além disso, as diferenças não observadas nos animais mais velhos apontam para diminuições metabólicas e suas consequências estruturais, como efeitos do envelhecimento. Gabet e Bab (2011) relataram que com a idade, os principais acontecimentos no osso cortical seriam a diminuição da densidade óssea e de sua espessura, com aumento na porosidade da cortical e do diâmetro do canal medular. Ainda, que estes efeitos seriam variáveis em relação ao sexo, sendo nos machos mais frequente uma aposição mais pronunciada e nas fêmeas uma porosidade cortical mais severa.

Os resultados do presente estudo apontam para maiores valores de área e perímetro dos canais quando comparados os grupos controles dos animais de 4 meses e de 9 meses, podendo indicar que este fato estaria relacionado com o aumento da idade e o consequente aumento na porosidade cortical. Embora, a análise da microestrutura da rede de canais nos animais mais velhos, tenha revelado similaridade entre os grupos controle e teste, o que poderia sugerir que apesar da remodelação balanceada ser influenciada negativamente com a idade, com aumento na reabsorção, após o uso do AZ, teria acontecido um efeito de estabilização dos níveis de reabsorção, não sendo então possível evidenciar diferenças entre os grupos.

Quanto a distribuição dos osteócitos e a caracterização do sistema lacunocanalicular, a técnica utilizada para visualização tridimensional permitiu avaliar de forma qualitativa e quantitativa a organização dos osteócitos quanto à sua localização em torno dos canais vasculares. Sabe-se que a distribuição destas células e sua localização influem diretamente nas características e nos mecanismos fisiológicos que ocorrem no tecido ósseo.

Qiu et al. (2003) pontuaram que um ósteon tem seu desenho otimizado para permitir trocas moleculares e que na relação entre canais de Havers e osteócitos, a área e perímetro dos canais aumentam significativamente com o aumento do

número de lacunas por ósteon. Himeno-Ando et al. (2012) relataram que variações também são encontradas em ossos diferentes, refletindo em distintas adaptações às variadas cargas fisiológicas, podendo também induzir mecanossensibilidades diferentes. Em exemplo está nas diferenças entre a tíbia e osso parietal, com os dados morfométricos dos osteócitos nas tíbias apresentando maiores valores de diâmetro e volume, quando comparados aos do osso parietal.

Nossos resultados mostraram diferenças entre os grupos controle e teste nos animais de 4 meses, e uma semelhança nos animais de 9 meses. Foram evidenciados indícios de que nos animais de 4 meses, após o uso do AZ, a distribuição dos osteócitos em relação à sua posição no entorno dos canais, seguiu um padrão inconstante, com osteócitos organizados mais próximos ao canal e uma queda abrupta na distribuição dos mesmos, mostrando um outro agrupamento das células mais distantes do canal. No grupo controle, notou-se uma constância na distribuição das lacunas, com o aumento da distância do canal, sem grandes variações. Nos animais de 9 meses, o mesmo padrão da distribuição dos osteócitos foi observado, com uma concentração similar na menor distância, um pequeno aumento na distância intermediária e posteriormente um declínio gradativo com relação às maiores distâncias. Mais uma vez, sugere-se que no grupo AZ nos animais de quatro meses a queda abrupta na concentração de osteócitos por isoárea circundante ao canal revela a parada na remodelação, caracterizando um período em que não houve a inclusão de novos osteoblastos na matriz. Nos animais de nove meses a similaridade foi encontrada, sugerindo que a remodelação prejudicada nos animais mais velhos não foi evidenciada pela técnica, sendo compatível com a atuação da droga, impedindo a reabsorção em maiores níveis, encontrados nos eventos fisiológicos do envelhecimento.

Nos ensaios biomecânicos, foi observado que na avaliação da microdureza, independente do uso ou não da droga e da diferença na idade, o material apresentou características similares, visto que, as possíveis diferenças após o uso do AZ não foram capazes de alterar a propriedade do material por si só, ou seja, não houve alteração do material enquanto tecido ósseo. Nos outros parâmetros avaliados, foi possível observar que as diferenças significantes entre os grupos se davam com os maiores valores alocados sempre nos animais de maior idade. Notou-se que, independente do uso da droga, o fato do animal apresentar mais idade, e consequentemente maior peso e altura, refletiu no aumento das propriedades

biomecânicas, com maior resistência à flexão, maior peso e maior módulo de elasticidade da peça anatômica.

Bilston et al. (2002) utilizaram esquema de dose única e re-dosagem de AZ, no esquema de 0,1 mg/Kg, e não encontraram diferença significativa entre os grupos controle e AZ, nos parâmetros módulo de elasticidade e resistência à fratura. Pozzi et al. (2009) verificaram um aumento na fragilidade após o uso do AZ. No entanto, deve-se considerar que o esquema de três doses semanais foram em regimes de 0,5 mg/Kg e 1 mg/Kg, havendo diferença significativa entre os grupos AZ e controle, mas não entre as duas diferentes dosagens no grupo AZ.

Os dados encontrados nesta pesquisa estão de acordo com a literatura, uma vez que foi demonstrado que em menores doses, as propriedades biomecânicas não são alteradas, e à medida em que as dosagens aumentam e/ou são administradas por tempos prolongados, podem surgir mudanças nas propriedades mecânicas do osso. Também, as características morfológicas e estruturais podem ser encontradas de forma mais expressiva quando um esquema de dosagem e tempo de uso do AZ extrapolar aqueles preconizados para tratamento convencional, quer seja do câncer ou da osteoporose. Em nosso estudo, ficou claro que os maiores valores de peso dos fêmures estavam concentrados nos animais mais velhos, com o maior valor de média de 1,457 gramas no grupo dos animais sacrificados com 12 meses de idade (Z9M75). Interessantemente, analisando o módulo de elasticidade apenas dos animais de 4 meses, nota-se uma melhora significativa quando comparados controle e teste, no entanto, ao comparar com os animais de 9 meses, vê-se que o maior valor adquirido com o uso do AZ, na verdade, aumentou foi devido ao animal ter sido eutanaziado com 2 meses a mais de vida que os animais do grupo controle, com seus valores equiparando aos dos animais controle de 9 meses de idade.

Em uma visão geral dos resultados, observa-se que houve um *cross-talk* entre os dados relativos à microarquitetura e rede de canais com os dados do sistema lacunocanalicular, mostrando que existe uma relação entre as estruturas analisadas em ambas as técnicas. Ainda, foi possível observar que avaliando parâmetros diferentes, as duas análises histomorfométricas se complementaram de certa forma, permitindo a interpretação e caracterização das mudanças após o uso do AZ, nas tíbias dos animais mais jovens. Estas técnicas empregadas concomitantemente permitem uma avaliação multifatorial do tecido ósseo, e na avaliação quanto ao uso do AZ, possibilita a identificação dos efeitos deste

bisfosfonato na topologia óssea, tanto na avaliação dos canais quanto na distribuição das células na matriz, evidenciando sua inter-relação. Observou-se também que as mudanças na microarquitetura, não necessariamente, afetam propriedades macroscópicas do osso, como as propriedades biomecânicas.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o ácido zoledrônico não interferiu na microarquitetura da rede de canais do osso cortical das mandíbulas, enquanto que nas tíbias, nos animais jovens, houve uma modificação na microarquitetura e no sistema lacunocanalicular, revelando uma topologia mais heterogênea quando comparada ao grupo controle. As propriedades biomecânicas não sofreram alterações causadas pelo uso da droga, sendo evidenciada melhora nos parâmetros analisados relacionada apenas ao aumento de idade nos animais.

REFERÊNCIAS¹

Allain, C., Cloitre, M. Characterizing the lacunarity of random and deterministic fractals sets. *Phys Rev A* 1991;44(6):3552-8.

Allen MR. The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing. *Odontology*. 2011;99(1):8-17.

Allen MR, Burr DB. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(5):987-94.

Allen MR, Kubek DJ, Burr DB. Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *J Bone Miner Res*. 2010;25(1):98-105.

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;23(34):8580-7.

Backes AR, Bruno OM. Segmentação de Texturas por Análise de Complexidade. *InfoComp (J Computer Science)* 2006;5(1):87-95.

Bilston LE, Little DG, Smith NC, Williams P, Briody J. Zoledronic acid improves the mechanical properties of normal and healing bone. *Clin Biomech*. 2002;17(9-10):716-8.

Cornish J, Bava U, Callon KE, Bai J, Naot D, Reid IR. Bone-bound bisphosphonate inhibits growth of adjacent non-bone cells. *Bone*. 2011;49(4):710-6.

Da Fontoura Costa L, Viana MP, Beletti ME. Complex channel networks of bone structure. *Appl Phys Lett* 2006;88 (033903).

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Day JS, Ding M, Bednarz P, van der Linden JC, Mashiba T, Hirano T, Johnston CC, Burr DB, Hvid I, Sumner DR, Weinans H. Bisphosphonate treatment affects trabecular bone apparent modulus through micro-architecture rather than matrix properties. *J Orthop Res*. 2004;22(3):465-71.

Elias CN, Lopes HP. *Materiais Dentários – Ensaios Mecânicos*. 1ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2007. 266p.

Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*. 2002;4(1):30-4.

Fuchs RK, Faillace ME, Allen MR, Phipps RJ, Miller LM, Burr DB. Bisphosphonates do not alter the rate of secondary mineralization. *Bone*. 2011;49(4):701-5.

Gabet Y, Bab I. Microarchitectural changes in the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep*. 2011;9(4):177-83.

Gonzalez RC, Woods RE. *Digital Image Processing*. 3rd ed. United States: Prentice Hall. 2008. 954p.

Goulet GC, Coombe D, Martinuzzi RJ, Zernicke RF. Poroelastic evaluation of fluid movement through the lacunocanicular system. *Ann Biomed Eng*. 2009;37(7):1390-402.

Greenberg MS. Intravenous bisphosphonates and osteonecrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98(3):259-60.

Griz L, Colares V, Bandeira F. Tratamento da doença de Paget óssea: importância do ácido zoledrônico. *Arq Bras Endocrinol Metab* [serial on the Internet]. 2006;50(5):845-851.

Himeno-Ando A, Izumi Y, Yamaguchi A, Imura T. Structural differences in the osteocyte network between the calvaria and long bone revealed by three-dimensional fluorescence morphometry, possibly reflecting distinct mechano-adaptations and sensitivities. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(2):765-70.

Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y. Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Arch Oral Biol* 2009;54(9):851-6.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2004. 153p.

Kierszenbaum AL, Tres LL. Histologia e Biologia Celular – Uma introdução à Patologia. 3^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora. 2012. 704p.

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;28(2):165-75.

Lau E, Al-Dujaili S, Guenther A, Liu D, Wang L, You L. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. *Bone.* 2010;46(6):1508-15.

Letchipia JE, Alessi A, Rodriguez G, Asbun J. Would increased interstitial fluid flow through in situ mechanical stimulation enhance bone remodeling? *Med Hypotheses.* 2010;75(2):196-8.

Li B, Ling Chau JF, Wang X, Leong WF. Bisphosphonates, specific inhibitors of osteoclast function and a class of drugs for osteoporosis therapy. *J Cell Biochem.* 2011;112(5):1229-42.

Mandelbrot BB, Pastor-Satorras R, Rauch EM. The geometry of ising clusters: gap independence and global structure. *Physical Review Letters* 1996;77(5):1-22.

Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* 2001;28(5):524-31.

Marx RE. Oral and Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws. Second edition. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc. 2011. 150p.

Mazziotti G, Bilezikian J, Canalis E, Cocchi D, Giustina A. New understanding and treatments for osteoporosis. *Endocrine.* 2012;41(1):58-69.

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;104(1):83-93.

Migliorati CA, Epstein JB, Abt E, Berenson JR. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(1):34-42.

Oliveira RC, Costa LF, Fernandes EA, Alvarenga BO, Mاتيoli SR, Beletti ME. Bone histomorphometry of broilers submitted to different phosphorus sources in growing and finisher rations. *Pesq Agropec Bras* 2006;41(10):1517-23.

Pampu AA, Dolanmaz D, Tüz HH, Avunduk MC, Kişnişci RS. Histomorphometric evaluation of the effects of zoledronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(5):905-10.

Pereira FRA, Dutra RC, Olímpio TCR, Müller SS, Palacio EP. Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas: estudo prospectivo e randomizado. *Rev Bras Ortop*. 2009;44(1):61-8.

Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006;39(3):443-52.

Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, Rosen E, Ikeda H, Okawa Y, Kiziltepe T, Schoonmaker J, Xie W, Hideshima T, Weller E, Boussein ML, Munshi NC, Anderson KC, Raje N. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5829-39.

Qiu S, Fyhrie DP, Palnitkar S, Rao DS. Histomorphometric assessment of Haversian canal and osteocyte lacunae in different-sized osteons in human rib. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272(2):520-5.

Rabelo GD, Beletti ME, Dechichi P. Histological analysis of the alterations on cortical bone channels network after radiotherapy: A rabbit study. *Microsc Res Tech* 2010;73(11):1015-8.

Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2692-6.

Rodrigues PRT, Polegato A, Hering FLO. Ação dos bisfosfonatos nas metástases ósseas prostáticas. In: Guimarães JRQ. Manual de Oncologia. 2ª ed. São Paulo: BBS Editora. 2006.

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

Santamaria M Jr, Fracalossi AC, Consolaro MF, Consolaro A. Influence of bisphosphonates on alveolar bone density: a histomorphometric analysis. *Braz Oral Res*. 2010;24(3):309-15.

Sarin J, DeRossi SS, Akintoye SO. Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. *Oral Dis*. 2008;14(3):277-85.

Senel FC, Kadioglu Duman M, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, Gunhan O. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(3):385-91.

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. *Oral Oncol*. 2009;45(2):164-72.

Su JH, Xu F, Lu XL, Lu TJ. Fluid flow induced calcium response in osteoblasts: mathematical modeling. *J Biomech*. 2011;44(11):2040-6.

Tatli U, Ustün Y, Kürkçü M, Erdoğan O, Gürbüz CC, Özgür H, Polat S. Effects of zoledronic acid on healing of mandibular fractures: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(6):1726-35.

Travençolo BAN. Métodos computacionais para a caracterização e análise da relação entre anatomia e expressão gênica em sistemas biológicos. [tese] Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo; 2007.

Travençolo BA, Martínez Debat C, Beletti ME, Sotelo Silveira JR, Ehrlich R, Costa Lda F. A new method for quantifying three-dimensional interactions between biological structures. *J Anat*. 2007;210(2):221-31.

Unni KK, Inwards CY, Bridge JA, Kindblom L, Wold LE. Tumors of the Bones and Joints. United States: Editor American Registry of Pathology. Series IV . 2004.

- Vasconcellos DV, Duarte MEL, Maia RC. Efeito anti-tumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva terapêutica. *Rev. Bras. Cancerologia*. 2004;50(1):45-54.
- Viana MP, Tanck E, Beletti ME, Costa L da F. Modularity and robustness of bone networks. *Mol Biosyst*. 2009;5(3):255-61.
- Voss RF. Fractals in Nature: From Characterization to Simulation. In: *The Science of Fractal Images*. 1988.
- Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1405-14.
- Yu YY, Lieu S, Hu D, Miclau T, Colnot C. Site specific effects of zoledronic acid during tibial and mandibular fracture repair. *PLoS One*. 2012;7(2):e31771.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa (ICB-USP).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP, Brasil
Telefone (55) (011) 3093.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **041** nas fls. **100** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Helena Cury Gallottini de Magalhães**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Efeitos do ácido Zoledrônico na microarquitetura óssea"** do qual participam o(s) alunos **Gustavo Davi Rabelo, Marcio Augusto de Oliveira, Denise Akiko Asahi** e o pesquisador **Fernando Ricardo Xavier da Silveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **31.05.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

ANEXO B - Parecer do comitê de ética em pesquisa (FOUSP).

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

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 20/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, APROVOU o protocolo de pesquisa: **"A influência dos biofosfonatos na osseointegração de implantes de titânio: Estudo experimental em ratos"**, de responsabilidade do Pesquisador: **Márcio Augusto de Oliveira, sob orientação do Professor Doutor Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães.**

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, 06 de agosto de 2009.

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