JULIETA BACCETTI LABATE

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ALENDRONATO DE SÓDIO
E DA CALCITONINA EM CULTURA DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

São Paulo

2006

Julieta Baccetti Labate

Avaliação da citotoxicidade do alendronato de sódio e da calcitonina em cultura de fibroblastos humanos

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Labate JB. Avaliação da citotoxicidade do alendronato de sódio e da calcitonina em cultura de fibroblastos humanos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, / /2006

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Leonardo e Cornélia**, pelo amor incondicional, apoio constante, serenidade, compreensão e torcida ao longo de toda a minha vida acadêmica.

Ao **Flávio**, companheiro dedicado, que com todo carinho e amor me deu força e ânimo no período final da elaboração deste trabalho.

Ao meu irmão, **Ricardo**, pela eterna amizade e constante presença.

Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação** que fizeram com que as dificuldades se tornassem mais brandas e que novas amizades pudessem florescer.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação** que muito contribuíram para meu aprimoramento científico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu primeiro e sempre orientador **Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques** pelo incentivo ao meu despertar científico, pela paciência, pelo carinho e pelas oportunidades durante minha vida acadêmica e profissional.

À **Profa. Dra. Márcia Martins Marques** por abrir as portas do Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da FOU SP e co-orientar-me com dedicação e ensinamentos fundamentais.

A técnica **Marilene** pelo auxílio no Laboratório e palavras de incentivo.

Labate JB. Avaliação da citotoxicidade do alendronato de sódio e da calcitonina em cultura de fibroblastos humanos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

As reabsorções radiculares externas são conseqüências decorrentes de lesões traumáticas severas como a avulsão e a intrusão. O estudo de medicamentos que possam auxiliar no controle e prevenção desses processos é de grande interesse. O objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade do alendronato de sódio e da calcitonina, aplicados em forma de pasta em cultura de fibroblastos humanos de gengiva. Foi utilizado para o experimento meio condicionado pelas substâncias a serem testadas, divididas em quatro grupos: alendronato de sódio (ALN) a 10^{-6} M; ALN a 10^{-7} M; ALN a 10^{-8} M; e calcitonina (CAL). Como grupos controle usou-se meio de cultura não condicionado e meio de cultura condicionado apenas pelo veículo das pastas (talco farmacêutico e solução salina). A sobrevivência celular foi analisada pelo método de contagem de células viáveis nos tempos experimentais de 1 e 24 horas. Os resultados foram analisados estatisticamente e mostraram que o veículo empregado e as pastas de ALN nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-8} M não apresentaram diferença significativa do grupo controle. Conclui-se que os produtos oriundos das pastas formuladas com ALN a 10^{-6} M e com CAL a 0,002% apresentaram citotoxicidade para fibroblastos de gengiva humana na forma e período empregados.

Palavras-Chave: Trauma Dental; Calcitonina – Alendronato de Sódio; Cultura celular

Labate JB. Citotoxicity analyses of sodium alendronate and calcitonin on cultured human fibroblasts [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

External root resorption is a common consequence of dental trauma injuries, mainly in dental avulsion and extrusion. Doubtful prognoses awake the interesting in studying medications, which could help in controlling and preventing these resorption processes. The aim of this study was to evaluate the citotoxicity of sodium alendronate (ALN) and calcitonin, used in a paste formulation in human gingival fibroblasts. Products leached from the pastes were divided into four experimental groups and had conditioned cellular medium: ALN 10^{-6} M, ALN 10^{-7} M, ALN 10^{-8} M and calcitonin 0,002%. Such groups were taking under: fresh media and conditioned media with vehicle (talcum powder and saline). On experimental times, 1 and 24 hours, citotoxicity analyses were performed using the Trypan blue dye exclusion assay. The results were statistically analyzed and showed that the vehicle used and ALN concentrations 10^{-7} M and 10^{-8} M did not lead to differences from the control group with fresh media. In contrast, the calcitonin and the ALN pastes in a higher concentration, 10^{-6} M, demonstrated cell growth reduction. In conclusion, this research showed that products leached from pastes with calcitonin and ALN 10^{-6} were cytotoxic for human gingival fibroblasts in vitro. Meanwhile, substances leached from ALN 10^{-7} M and 10^{-8} M were biocompatible.

Keywords: Dental trauma; Calcitonin – Sodium alendronate; Cell culture

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALN	alendronato de sódio
CO ₂	dióxido de carbono
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil-sulfóxido
et al.	Eti alii
HBSS	solução salina balanceada de Hank
NaCl	cloreto de sódio
PBSA	solução tampão fosfato salina
P-C-P	fosfato carbono fosfato
PTH	hormônio paratireoideo

LISTA DE SÍMBOLOS

cm² centímetro cuadrado

g grama

g/ml grama por mililitro

°C grau Celsius

μ micro

μm micrometro

μg micrograma

mg miligrama

mg/l miligrama por litro

mg/ml miligrama por mililitros

mg/kg miligrama por quilogramas

ml mililitro

mm milímetro

mM milimolar

M molar

n^o número

% por cento

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Média e desvios padrão para a contagem de células sobreviventes (10 ⁴)	57
Tabela 5.2 – Análise de variância para número celular.....	58
Tabela 5.3 – Níveis descritivos para comparações múltiplas pelo método de Tukey – contagem entre tratamentos e tempos.....	59

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Trauma dental	14
2.2 Calcitonina	21
2.3 Bisfosfonatos	26
2.3.1 bisfosfonatos na odontologia	32
2.4 Cultivo Celular	44
3 PROPOSIÇÃO	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Material	49
4.2 Métodos	50
4.2.1 cultura celular	51
4.2.2 preparo da pasta de alendronato de sódio	53
4.2.3 preparo da pasta de calcitonina	53
4.2.4 grupos experimentais	54
4.2.5 preparo do meio condicionado	54
4.2.6 teste de viabilidade celular	55
4.3 Análise estatística	56
5 RESULTADOS	57
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	80

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos demonstram elevada incidência do traumatismo dental em crianças e adultos jovens. Luxações intrusivas e avulsões são as modalidades que apresentam piores prognósticos, devido à incidência de necrose pulpar e severos danos ao ligamento periodontal. A reabsorção radicular externa inflamatória e a substitutiva são as seqüelas mais comuns nesse tipo de ocorrência.

Atualmente estão disponíveis medicações eficazes para o tratamento das reabsorções radiculares inflamatórias, entre elas o hidróxido de cálcio e as associações de antibiótico-corticosteróide. Porém, na ocorrência da reabsorção substitutiva, nenhum tratamento tem se mostrado totalmente eficaz.

A utilização dos bisfosfonatos e da calcitonina aparece como uma alternativa promissora para o controle de situações clínicas dessa natureza. Estas drogas têm como principal objetivo diminuir a velocidade do processo de reabsorção, oferecendo condições para a permanência do dente na cavidade bucal exercendo suas funções tanto estéticas como desempenhando a fisiologia da mastigação.

Frente à reabsorção do tipo substitutiva, atualmente pode-se considerar como sucesso terapêutico a permanência do dente até que o paciente tenha seu crescimento eaquelético concluído.

Observa-se que na medicina, drogas como a calcitonina e os bisfosfonatos têm sido utilizadas nas situações em que se faz necessário o controle do processo de reabsorção óssea, especialmente na osteoporose.

Diante desse fato, parece lícito aventar a possibilidade de que essas drogas possam ser utilizadas como medicação intracanal nas situações clínicas onde o processo de reabsorção substitutiva esteja presente ou mesmo em caráter preventivo, com o objetivo de atuarem como moduladoras ou inibidoras do processo reabsortivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Trauma Dental

Frente a diversos tipos de traumatismos dento-alveolares, as avulsões e as luxações intrusivas são os que possuem pior prognóstico, gerando severos danos aos tecidos de sustentação (ligamento periodontal e cemento) e aumentando a incidência de rompimento do feixe vaskulo-nervoso apical, com conseqüente mortificação pulpar. Freqüentemente manifesta-se o processo reabsortivo como seqüela fortemente associada.

Andreasen et al. (1995a), por trabalho prospectivo com 400 incisivos permanentes avulsionados, em acompanhamento por um período de 23 anos, identificaram 30% de dentes perdidos, sendo a maior freqüência localizada nos elementos com formação radicular incompleta. Somente 24% (96) apresentaram total reparação do ligamento periodontal, isento de evidência de reabsorção radicular.

Atendo-se aos fatores relacionados à reparação do ligamento periodontal, Andreasen et al. (1995b), ao observarem 400 incisivos permanentes avulsionados, concluíram que quatro fatores apresentaram maior impacto na reparação do ligamento, em ordem decrescente: estágio de formação radicular, período de estocagem extra-alveolar a seco, reimplante imediato e duração do período de armazenagem em umidade (saliva ou soro). Obtiveram ainda uma incidência de

reabsorção superficial de 4,5%, diagnosticada no máximo no primeiro ano após o reimplante, de reabsorção inflamatória de 30%, diagnosticada nos primeiros seis meses, e de reabsorção substitutiva de 61%, diagnosticada primeiramente por aspectos clínicos após 1 a 2 meses, porém radiograficamente detectável após o primeiro ano do reimplante.

Andreasen et al. (2000) salientaram que a lesão traumática dental representa uma transmissão de grande quantidade de energia ao dente e às estruturas de suporte, o que resulta em fratura e/ou deslocamento do dente e/ou rompimento ou esmagamento dos tecidos de sustentação. No caso da lesão provocar rompimento, por exemplo, em situações de extrusão, a maior parte do dano consiste em clivagem das estruturas intercelulares (colágeno e substância intercelular), enquanto ocorre dano limitado às células na área traumatizada. Em contraste, no caso de lesão que provoque esmagamento, caso típico da intrusão, há dano extenso tanto ao sistema celular como intercelular. Os autores ressaltam que o tecido danificado deva ser removido por macrófagos e/ou osteoclastos antes que o tecido traumatizado possa ser restaurado.

Em luxação complicada com esmagamento ou outro dano ao ligamento periodontal, por exemplo, dessecações após avulsão, seqüelas complicadoras podem ocorrer resultando em reabsorção radicular. Nessa situação, Andreasen et al. (2000) explicaram que os processos são desencadeados devido à perda da camada de cementoblastos protetores e restos epiteliais de Malassez ao longo da superfície radicular, em virtude do trauma. O desaparecimento dessa camada de células proporciona livre acesso aos osteoclastos e macrófagos na tarefa de remover o ligamento periodontal danificado e o cemento da superfície radicular.

Os danos infligidos às estruturas periodontais e à polpa pelos traumatismos dos tecidos de sustentação podem resultar em três tipos de reabsorção da superfície radicular descritas na literatura.

A reabsorção superficial ocorre devido a um dano à camada mais interna do ligamento que será reabsorvida por macrófagos e osteoclastos, resultando em uma cavidade na superfície da raiz. Se essa cavidade não estiver em contato com túbulos dentinários e a camada de cementoblastos adjacente estiver intacta, a cavidade de reabsorção é reparada por cemento neoformado e pela inserção de novas fibras de Sharpey. A espessura do ligamento mantém-se normal e segue os contornos do defeito. Esse tipo de reabsorção é autolimitante e mostra um reparo espontâneo (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Devido a seu pequeno tamanho as reabsorções superficiais geralmente não são detectadas radiograficamente (TROPE, 1995; ANDREASEN et al., 2000). A maioria das lacunas é superficial e está restrita ao cemento. No caso das mais profundas, contudo, o reparo ocorre, mas sem a restauração do contorno original da raiz (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

A reabsorção inflamatória, por sua vez, é observada radiograficamente como áreas radiolúcidas progressivas na raiz e no osso adjacente, e defeitos reabsortivos em forma de cuia que penetram na dentina (ANDREASEN; HJORTING-HANSEN, 1966).

Após uma avulsão ou uma luxação intrusiva a superfície de cemento é danificada e sua característica de proteção (barreira física) é perdida. Se o tecido pulpar mortificado em decorrência do trauma se tornar infectado, as toxinas podem passar através dos túbulos e levar a uma resposta inflamatória no ligamento

periodontal correspondente. O resultado é a reabsorção da raiz e da superfície do osso cujo processo é denominado reabsorção radicular inflamatória (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981).

Andreasen (1981a) sugeriu como teoria para explicar o mecanismo de desenvolvimento da reabsorção inflamatória que um tecido mortificado não infectado poderia iniciar e manter o processo. Desta forma, não seria sempre necessária a presença de dentina infectada. Nos seus estudos observou a ocorrência de reabsorção inflamatória em duas semanas após o reimplante, porém os microrganismos não foram identificados no interior dos túbulos nesse estágio inicial.

A literatura esclarece que após uma luxação a reabsorção radicular inflamatória é desencadeada pelo trauma mecânico, que remove invariavelmente cementoblastos, pré-cimento e até cimento em áreas da superfície radicular. O processo mantém-se pelo estímulo microbiano oriundo do sistema de canais infectados. Após algumas semanas o quadro pode ser observado radiograficamente como uma radiolusência perirradicular, englobando tanto áreas de raiz como de osso alveolar, segundo Tronstad (1988).

Para Melo (1998), caracteriza-se uma reabsorção inflamatória quando a pré-dentina ou o pré-cimento são mecanicamente agredidos ou removidos, e nessa área ocorre uma colonização de osteoclastos que darão início ao processo. As células de reabsorção necessitam de um estímulo contínuo, que pode ser mantido através de uma irritação mecânica no tecido e/ou infecção do canal radicular, podendo tornar o processo de reabsorção progressivo, levando à destruição radicular. Nestes casos, bem como no subsequente reposicionamento ou procedimentos de reimplante, podem provocar inevitáveis danos à raiz, resultando

em áreas sem cimento na superfície radicular, tornando-a quimiotática para fagocitose, dando início à reabsorção transitória que, induzida por essa área desnuda, pode expor a dentina tubular. Os produtos bacterianos do canal infectado podem então alcançar áreas de reabsorção na superfície radicular sustentando, dessa forma, o processo reabsortivo.

Histologicamente, a reabsorção inflamatória é caracterizada por cavidades de reabsorção em forma de tigela no cimento e na dentina associadas com alterações inflamatórias no tecido periodontal adjacente (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Acredita-se que o mecanismo de reabsorção dos tecidos duros dentais seja muito semelhante à reabsorção óssea, já que as células envolvidas no processo assemelham-se tanto na forma como em função (PIERCE, 1989).

Andreasen e Andreasen (2001) esclarecem que depois de tratada, a reabsorção inflamatória pode resultar em grandes áreas isentas de ligamento periodontal, desenvolvendo uma competição entre as células ósseas e do ligamento, fator determinante da reabsorção substitutiva.

Nos tecidos duros após um trauma, a resposta inflamatória se instala desencadeando a liberação de citocinas, promovendo a reabsorção tecidual cuja função é remover o tecido ósseo danificado previamente a reparação. Para tal, as camadas de cementoblastos e dentinoblastos devem apresentar-se íntegras. Caso contrário, as camadas subseqüentes de tecido duro serão reabsorvidas devido a uma intensa atividade osteoclástica, resultado da liberação de fatores ativadores dos osteoclastos (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

A ausência de uma cobertura de ligamento periodontal vital sobre a superfície radicular pode levar a uma união anormal desses após a reparação.

Radiograficamente, a distinção entre raiz e osso, lâmina dura, está ausente e há uma aparência de “mordida” (ANDREASEN, 1981b). As células dos arredores da raiz desnuda são as responsáveis pelo repovoamento, segundo Andreasen e Kristerson (1981).

O osso é reabsorvido e depositado fisiologicamente por toda a vida. Os osteoclastos em contato com a raiz reabsorvem a dentina e os osteoblastos depositam osso na área onde estava a raiz, eventualmente substituindo-a. Esse efeito progressivo da anquilose nos dentes traumatizados é chamado reabsorção substitutiva. Contudo, não deve ser considerado um processo patológico, e sim um engano, já que os osteoclastos não conseguem distinguir entre osso, dentina ou cimento (TRONSTAD, 1988).

As células precursoras do osso se movem das paredes do alvéolo e repovoam a raiz danificada ao invés das células do ligamento periodontal, que são mais lentas (TROPE, 1995). O osso assume essa forma, em contato direto com a raiz na ausência de um ligamento intermediário.

Clinicamente, a ausência de mobilidade e um som metálico à percussão são sinais patognomônicos para anquilose, assim como infraoclusão no desenvolvimento da dentição (TROPE, 1995).

Importa aclarar que a anquilose dento-alveolar e a reabsorção substitutiva, muitas vezes tida como sinônimos, não tem origem pulpar, e ocorrem devido à necrose do ligamento periodontal. Para Lage-Marques (1998), o mecanismo da anquilose dento-alveolar ocorre em lesões mais extensas, onde o processo inflamatório tem inicialmente a função de remover os detritos resultantes do dano

causado pelo trauma, e, onde, após essa função, as células disputam o preenchimento do espaço vazio na região periodontal.

Segundo Trope (1998), a reabsorção substitutiva proveniente de um traumatismo dental, pode ser considerada um processo fisiológico, pois não existe alternativa para a reversão deste processo.

Histologicamente tem-se o contato direto entre osso e dentina, sem a separação pelo ligamento periodontal e cemento, a essa fusão dá-se o nome de anquilose (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Andreasen e Andreasen (2001) salientam que a reabsorção substitutiva pode ser transitória ou progressiva dependendo da extensão do dano à cobertura do ligamento periodontal sobre a raiz.

A reabsorção progressiva é sempre induzida quando todo o ligamento periodontal é removido ou após extenso período extra-alveolar acompanhado de intensa desidratação do dente antes do reimplante. Por outro lado, a reabsorção substitutiva transitória possivelmente está relacionada com áreas de danos menores à superfície radicular. Nesse caso, a anquilose é formada inicialmente e depois é reabsorvida por áreas adjacentes de ligamento periodontal vital.

As modalidades terapêuticas atualmente utilizadas para a reabsorção substitutiva têm mais o objetivo de retardar do que de inibir a reabsorção radicular.

2.2 Calcitonina

Pierce, Berg e Lindskog (1988), avaliaram em macacos, os efeitos da aplicação intracanal da calcitonina no controle de reabsorções inflamatórias em dentes reimplantados com contaminação do canal radicular e com ligamento periodontal necrótico. Os autores verificaram que a calcitonina foi eficiente no tratamento das reabsorções inflamatórias instaladas, porém o grupo experimental apresentou maior frequência de anquilose que o grupo controle não tratado e o grupo medicado com solução salina.

Em mais de 15 espécies de mamíferos, aves, anfíbios, peixes e até mesmo organismos unicelulares, como *Candida albicans*, a calcitonina ou substâncias calcino-semelhantes podem ser encontradas. Contudo somente três tipos e uma análoga são utilizados na área médica: a suína – PCT, a humana - HCT, a de salmão – STC e a ETC análoga. Entre estas, a ETC e a de salmão são consideradas quimicamente as mais potentes e mais resistentes às enzimas de degradação, sendo empregadas com maior frequência (AZRIA, 1989).

A calcitonina é um hormônio secretado pelas células parafoliculares da glândula tireóide ou células C da tireóide humana que, em doses farmacológicas, promove a inibição da atividade osteoclástica, levando à queda dos níveis de cálcio plasmático (AZRIA, 1989). É tida por muitos autores como antagonista do paratormônio (PTH), pois está associada a hipocalcemia em resposta a elevações de cálcio no sangue.

A ação farmacológica da calcitonina pode ser resumida pela inibição da reabsorção óssea atuando na redução da atividade, mobilidade (desaparecimento da borda rugosa e da zona clara) e número de osteoclastos, retardando a desmineralização óssea. Por outro lado, pela depressão da atividade osteoclástica a calcitonina pode indiretamente atuar na atividade osteoblástica. A principal função desse hormônio é regular o metabolismo mineral especialmente o do cálcio, ajudando o organismo a lidar com a falta ou excesso deste no plasma sanguíneo. Em várias situações como crescimento, lactação, gravidez, etc, a calcitonina exerce um efeito inibitório direto no osteoclasto, sobre a sua atividade e número, diminuindo assim a reabsorção fisiológica do esqueleto humano. Essas células com alta capacidade de motilidade movem-se ao longo da superfície óssea promovendo a reabsorção do tecido, resultando em escavações denominadas de lacunas de Howship (AZRIA, 1989).

A calcitonina apresenta uma atividade de inibição direta sobre os dentinoclastos, o que é interessante na medida em que não agride células do ligamento periodontal. A calcitonina aparece como uma alternativa interessante quando outras não respondem bem, ou em casos de reabsorções idiopáticas não associadas a fatores bacterianos (PIERCE, 1989)

Prokopowitsch et al. (1990) e Prokopowitsch e Lage-Marques (1991) estudaram em cães a ação da calcitonina quando utilizada como meio de armazenamento de dentes avulsionados intencionalmente antes do reimplante. Os autores verificaram que os dentes avulsionados mantidos fora do alvéolo em calcitonina apresentaram menores índices de reabsorção quando comparados aos

dentes mantidos a seco, em solução fisiológica ou leite por 1 hora antes do reimplante, tanto na avaliação histológica quanto na radiográfica.

Avaliando a capacidade de prevenir o início dos processos reabsortivos radiculares por meio da calcitonina associada ao óxido de zinco, Manotas et al. (1992) observaram histologicamente 35 dentes de cães reimplantados. Após o preparo, os canais receberam pasta medicamentosa de calcitonina e óxido de zinco, que permaneceu por 30 dias. Os cortes histológicos obtidos mostraram que a terapia utilizada foi efetiva no combate à reabsorção inflamatória, quando comparado ao grupo controle, e notou-se também a diminuição da probabilidade de ocorrência de reabsorções substitutivas ativas.

Lage-Marques, Silva e Prokopowitsch (1995) indicam uma conduta clínica frente ao trauma dental para os casos de avulsão, usando a calcitonina sintética de salmão imediatamente após o preparo químico-cirúrgico por dez minutos e posterior colocação de hidróxido de cálcio veiculado nesta medicação. Observaram clinicamente que a calcitonina foi capaz de diminuir significativamente o processo de reabsorção radicular externa frente a esse protocolo.

Patel (1996) afirma que a osteoporose aparece como a doença de metabolismo ósseo mais comum nos países desenvolvidos, e seu aumento de incidência é considerado como um importante problema de saúde pública. Algumas são as drogas que são utilizadas no tratamento dessa doença: hormônios, esteróides anabolizantes, bisfosfonatos, vitamina D e seus análogos e a calcitonina, que agem como supressores do processo de reabsorção óssea.

Essas drogas empregadas na área médica poderiam ser alternativas interessantes no combate dos processos reabsortivos dentais.

A afinidade e difusão da calcitonina nos tecidos duros do dente foram estudadas por Wiebkin et al. (1996), onde utilizaram um marcador radioativo para verificar a liberação da calcitonina através da raiz. Nos dentes com o cimento intacto foi necessário um período de 4 a 5 horas para que a calcitonina fosse detectada, porém uma liberação lenta foi observada durante um período de 9 dias. Para os dentes onde parte do cimento fora removido, a detecção foi mais rápida (2 horas) e foi observada uma quantidade maior do medicamento durante o período de 9 dias.

Prokopowitsch e Andrade (1997), avaliaram qualitativamente, em um período de dois anos, 69 dentes reimplantados e tratados com calcitonina sintética de salmão imediatamente após o preparo químico cirúrgico como medicação intracanal por dez minutos e verificaram que 72,45% dos casos apresentavam prognóstico favorável.

Giora (1997) analisou em um modelo experimental de luxação de molares em ratos a ação de diferentes medicações intracanaís nas alterações teciduais. As medicações foram avaliadas por histometria em quatro tempos experimentais. As medicações empregadas foram: associação antibiótico-corticosteróide, calcitonina, hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio associado a calcitonina. Tanto a associação de antibiótico-corticosteróide quanto a calcitonina apresentaram efetividade no controle da reabsorção inflamatória nas primeiras 24 horas, enquanto o hidróxido de cálcio teve o melhor resultado após 3 semanas.

Camargo (1998), também avaliou a difusão da calcitonina na dentina radicular valendo-se de um teste imunoenzimático e seus resultados comprovaram a capacidade da calcitonina atingir a superfície externa radicular, quando utilizada

como medicação intracanal. Verificou que a ausência de cimento radicular permitiu a passagem de maior quantidade da medicação ao meio externo radicular, e que ao sétimo dia pôde-se medir as maiores concentrações de calcitonina no meio externo para ambos os grupos experimentais.

Silveira (1999) estudou a capacidade de difusão da calcitonina sintética de salmão através da dentina radicular de caninos humanos extraídos, comparando-a com a difusão do alendronato. Desse experimento concluiu-se que as duas medicações avaliadas apresentaram alto poder de difusão na dentina radicular, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

Torresi, Prokopowitsch e Andrade (2001) em estudo de revisão indicaram um protocolo para o uso da calcitonina como medicação intracanal semanalmente, por um período de 60 dias após o reimplante, nos casos em que a viabilidade das células do ligamento periodontal e da polpa está altamente comprometida, a fim de prevenir a instalação de uma reabsorção substitutiva.

Dogăn et al. (2001) confeccionaram cavidades cirúrgicas experimentais em mandíbula de porcos guinea e avaliaram a reparação óssea na presença ou não de calcitonina. Seus resultados sugerem que nos primeiros estágios de reparação, uma semana, a aplicação de calcitonina interferiu de forma positiva na reparação, porém quando avaliada após 3 e 6 semanas não houve diferença quando comparado com o grupo sem calcitonina.

Dani et al. (2002) aplicaram microesferas de calcitonina de salmão em culturas celulares e puderam concluir que os osteoclastos de ratos são inibidos em sua atividade reabsortiva na presença desse fármaco, de modo dose dependente.

2.3 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos aparecem como uma alternativa promissora para o controle do processo de reabsorção radicular substitutiva. Muitos estudos têm sido desenvolvidos avaliando o modo de ação desses fármacos e apresentando resultados animadores.

De acordo com Sato et al. (1991) os bisfosfonatos são substâncias análogas sintéticas do pirofosfato, onde o átomo central, o oxigênio, foi substituído pelo átomo de carbono. Desta forma, possuem resistência à hidrólise enzimática, não sendo metabolizados no organismo e sendo excretados inalteradamente.

Sato et al. (1991) realizaram estudo em ratos usando um bisfosfonato radioativo e verificaram sua localização no tecido ósseo e seus efeitos na ultraestrutura dos osteoclastos. Esses autores demonstraram que o mecanismo de atuação que tem seu início com a liberação do bisfosfonato ligado a hidroxapatita, motivado pela acidificação produzida no início do processo de reabsorção e que essa droga deve atingir uma concentração entre 0,1 e 1 mM na região da zona clara para aumentar a permeabilidade iônica da borda rugosa dos osteoclastos, dessa forma, a reabsorção cessa e as células perdem a borda rugosa sem, contudo, serem destruídas.

Para Sahni et al. (1993), o efeito inibitório dos bisfosfonatos foi atribuído principalmente a uma injúria metabólica dos osteoclastos maduros quando esses englobam os bisfosfonatos aderidos ao osso. Esse modo de ação foi sugerido pelo fato de que os osteoclastos adquirem uma morfologia degenerativa, que altera sua

função, na presença de um bisfosfonato. O estudo realizado pelos autores analisou o efeito de 5 diferentes bisfosfonatos, quanto à sua efetividade em culturas osteoclásticas. As soluções foram aplicadas em cavidades de reabsorção osteoclástica antes e após o isolamento com marfim e foram aplicadas co-culturas de uma linhagem celular de osteoblastos. Os resultados evidenciaram que parte da ação inibitória dos osteoclastos pelos bisfosfonatos foi mediada também pela ação nos osteoblastos. Os autores ainda relatam que achados conflitantes entre estudos *in vivo* e *in vitro*, sugerem que os bisfosfonatos não operam somente através de ações diretas na atividade osteoclástica ou recrutamento, mas também por outros mecanismos relacionados à reabsorção óssea.

Avaliando a administração oral diária de alendronato de sódio, um dos mais potentes amino-bisfosfonatos, em mulheres na menopausa com osteoporose em um período de dois anos Adami et al. (1995) concluíram que essa medicação foi bem tolerada nas doses 10mg/dia e 20mg/dia, aumentando a densidade mineral óssea e diminuindo o *turnover* ósseo.

De modo geral, os autores concordam que em âmbito celular os bisfosfonatos agem direta ou indiretamente nos osteoclastos. O efeito pode ser na formação dessas células e/ou em sua ativação. Uma diminuição no número de osteoclastos pode se dar por ação direta, nos precursores osteoclásticos, ou indiretamente pela estimulação dos osteoblastos em produzir um inibidor de formação de osteoclasto. Os bisfosfonatos podem também agir pela diminuição do tempo de vida dos osteoclasto, possivelmente através de apoptose. Não se sabe ainda, porém, qual é o mecanismo mais importante que ocorre *in vivo* (RODAN; FLEISCH, 1996).

Junto aos tecidos, os bisfosfonatos parecem agir reduzindo o *turnover* ósseo, resultando na diminuição da reabsorção (RODAN; FLEISCH, 1996).

Nishikawa et al. (1996) estudaram *in vitro* o efeito dos bisfosfonatos sobre a formação de osteoclastos e se tal efeito era mediado através de células osteoblásticas. Observaram que não somente a atividade reabsortiva óssea de osteoclastos maduros, mas também o recrutamento de células osteoclásticas é afetado pelos bisfosfonatos testados (YM175, pamidronato e alendronato) através de sua ação nos osteoblastos.

Vitté, Fleisch e Guenther (1996) também estudaram o mecanismo pelo qual os osteoblastos mediam o efeito inibitório dos bisfosfonatos, alendronato e ibandronato, na reabsorção óssea. Os resultados obtidos mostraram que os osteoblastos *in vitro* sintetizam um inibidor de recrutamento osteoclástico e/ou sobrevivência na presença dessas medicações.

É grandemente aceito que células de linhagem osteoblástica controlam o recrutamento e a atividade dos osteoclastos sob condições fisiológicas e patológicas. Tem-se demonstrado que os bisfosfonatos podem agir através da modulação da interação entre osteoclasto-osteoblasto.

Na Medicina, muitos bisfosfonatos são comprovadamente potentes inibidores da reabsorção óssea e constituem tratamento de eleição para prevenção da osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia causada por tumores malignos, redução das complicações associadas à metástase tumoral ósseo, alívio dos sintomas da osteogênese imperfeita, aumento da densidade óssea na fibrodisplasia e prevenção da perda óssea causada pelo tratamento com glicocorticóide (RODAN, 1998).

Os bisfosfonatos são usados na indústria têxtil, de fertilizantes e de óleos, principalmente como agentes inibidores da corrosão. E foi somente nas últimas quatro décadas que foram desenvolvidos como drogas para o uso em diversas doenças ósseas, dentais e do metabolismo do cálcio (FLEISCH, 1998).

A estrutura P–C–P (cadeia fosfato-carbono-fosfato) permite um grande número de variações possíveis, tanto alterando as duas cadeias laterais do carbono ou pela esterificação dos grupos fosfato. Muitos fármacos desse grupo já foram testados em humanos e estão disponíveis comercialmente, entre eles: alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato e tiludronato. Cada um possuindo características químicas, fisicoquímicas e biológicas próprias (FLEISCH, 1998).

Os bisfosfonatos têm dois efeitos biológicos fundamentais: inibição da calcificação, quando em altas doses, e inibição da reabsorção óssea. A inibição da calcificação é bastante eficiente tanto na administração parenteral como tópica, porém doses que inibem a calcificação ectópica de tecidos moles podem prejudicar a mineralização de tecidos normalmente calcificados como o osso e a cartilagem (FLEISCH, 1998).

São poderosos inibidores da reabsorção óssea, e sua potência varia de acordo com a sua estrutura. Vários trabalhos demonstram tal fato tanto *in vitro*, cultura celular e de órgãos, quanto *in vivo* em animais e humanos. E esse efeito está presente tanto em indivíduos normais quanto em condições experimentais onde a reabsorção está aumentada (FLEISCH, 1998).

García-Moreno et al. (1998) avaliaram o efeito do alendronato de sódio sobre osteoblastos humanos e concluíram não afetar viabilidade, proliferação ou capacidade de deposição mineral dessas células quando usada concentrações

capazes de inibir a atividade reabsortiva de osteoclastos. Frente a esses resultados os autores relatam que não é possível sustentar a hipótese de que o aumento na densidade mineral óssea, observada em pacientes tratados com a droga, é devido a um estímulo direto do alendronato na formação do osso mineralizado pelos osteoblastos.

Todos os bisfosfonatos aderem à hidroxiapatita em virtude de sua estrutura P–C–P, o que justifica sua rápida localização no tecido ósseo e sua seletiva ação no esqueleto. Após administração, os bisfosfonatos são rapidamente removidos da corrente sangüínea e eliminados pela urina ou absorvidos pelo esqueleto nas áreas de maior atividade celular óssea. Quando absorvido, o bisfosfonato liga-se à hidroxiapatita do osso exposto nos locais de reabsorção óssea, por sua vez o osteoclasto ativo gera um pH ácido que dissolve a matriz inorgânica liberando desta forma o bisfosfonato ligado a hidroxiapatita (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

O alendronato de sódio é uma medicação quimicamente descrita como: 4-amino-1-hidroxibutilideno-1, 1-ácido bisfosfônico. Porras, Holland e Gertz (1999) salientam que a presença de um grupamento amina na cadeia lateral é responsável pelo grande aumento na potência e seletividade do alendronato para inibição da reabsorção óssea, quando comparado ao etidronato, que foi um dos primeiros bisfosfonatos utilizados clinicamente e que não apresenta nitrogênio.

Estudando a ação direta dos bisfosfonatos sobre os osteoclastos Fisher et al. (1999) sugerem que após a administração, o alendronato liga-se ao mineral ósseo e é liberado pelos osteoclastos durante o início da reabsorção. Dentro dos osteoclastos, ele interfere com a geração de geranilgeranil difosfato pela inibição de enzima(s) na cadeia de biossíntese do colesterol. O alvo da ação do alendronato

provavelmente é, segundo os autores, uma enzima envolvida na conversão do mevalonato a geranilgeranil difosfato, que usa difosfatos como substrato. O resultado é a interrupção da fusão vesicular e da formação da borda rugosa.

Van Beek, Löwik e Papapoulos (2002), usando explante de metatarso de feto de rato, observaram que os bisfosfonatos testados suprimiram a reabsorção osteoclástica *in vitro* por uma ação direta nos precursores osteoclásticos bem iniciais na superfície óssea, e não por um efeito sobre a capacidade osteoclastogênica das células osteogênicas. Concluíram ainda que o mecanismo anti-reabsortivo dos bisfosfonatos nitrogenados envolve a proteína geranilgeranil.

Still, Phipps e Scutt (2003) utilizaram diferentes concentrações de bisfosfonatos em cultura de unidades formadoras de fibroblastos calcificados e notaram que houve uma inibição dose dependente no número de colônias quando usado o alendronato e o risedronato, enquanto que o etidronato não teve nenhum efeito inibitório, nem estimulatório. No âmbito da diferenciação, concentrações altas (10^{-4}M) levaram a quase nenhuma atividade da fosfatase alcalina e formação de cálcio e colágeno, enquanto concentrações entre 10^{-5} e 10^{-6} tanto de alendronato como residronato tiveram maior diferenciação. O etidronato nem estimulou nem inibiu diferenciação.

Im et al. (2004) observaram que o alendronato e o residronato foram capazes de aumentar a proliferação de osteoblasto em cultura primária de trabeculado humano e linhagem celular transformada (MG-63) de forma dose dependente. Os autores sugeriram assim que os bisfosfonatos podem ter um efeito anabólico nos osteoblastos e com isso possuem um importante papel na intensificação da formação óssea.

2.3.1 bisfosfonatos na odontologia

Diante dos bons resultados obtidos com o uso dos bisfosfonatos no âmbito médico, os pesquisadores da área de odontologia interessaram-se pela possibilidade de sua utilização, de início na periodontia e na ortodontia.

Na periodontia as investigações avaliaram a capacidade de diminuir a perda óssea alveolar consequência da periodontite. Para tanto, foram desenvolvidos modelos animais onde era induzida uma periodontite com auxílio de fio de sutura ou anel elástico introduzidos no sulco gengival dos dentes a serem estudados.

Um dos primeiros relatos da utilização dos bisfosfonatos na odontologia foi o estudo realizado por Schmidt e Rowe (1987), que analisaram a possibilidade de uma alternativa para o tratamento de inflamações crônicas periodontais em ratos, usando dois bisfosfonatos diferentes, administrados por via subcutânea. Analisados os valores encontrados nos cortes histológicos, os autores concluíram que os locais tratados com os bisfosfonatos tiveram maior altura de crista óssea.

Uma perda óssea alveolar está claramente associada a uma alteração no equilíbrio entre reabsorção e formação óssea. Desta forma, é lógico se pensar que um agente terapêutico que leve a supressão da reabsorção óssea ou a uma aceleração na formação desse osso poderia prevenir a perda óssea alveolar em quadros de periodontite (BRUNSVOLD et al., 1992).

Em 1992, Brunsvold et al. estudaram o efeito do alendronato administrado por via sistêmica em modelos experimentais de periodontite em macacos e demonstraram o retardamento da perda óssea ao redor dos dentes afetados em

comparação com o controle, não havendo alterações quanto ao índice de placa, índice de inflamação gengival e profundidade de sondagem.

Usando o mesmo método experimental Weinreb et al. (1994) avaliaram histomorfometricamente o efeito do alendronato e sugeriram que uma significativa inibição farmacológica da perda óssea pode ser conseguida sem afetar a presença de inflamação gengival.

Em ortodontia Adachi et al. (1994) examinaram o efeito da administração tópica do risedronato na movimentação e na recidiva ortodôntica em ratos e puderam concluir que a aplicação tópica do bisfosfonato tem efeito sobre a ancoragem e a retenção dental de forma dose dependente.

Igarashi et al. (1994), avaliando a aplicação tópica e sistêmica do AHBuBP (alendronato) em modelos experimentais de movimentação ortodôntica em ratos, observaram que houve inibição dos movimentos tanto de ancoragem como de recidiva de modo dose dependente. Além disso, histologicamente observaram uma redução na reabsorção de cemento e dentina radicular nos grupos de aplicação sistêmica do bisfosfonato. Osteoclastos com formato alterado, arredondado, perda de polaridade e piquenoses também foram visualizados nos grupos experimentais, diferentemente do controle.

Shoji, Horiuchi e Shinoda (1995), usando o risedronato de forma sistêmica em ratos onde foi induzido um quadro de periodontite, observaram que a reabsorção óssea se apresentou dose dependente nos grupos experimentais, sem, no entanto haver diferença quanto ao grau de inflamação. Histologicamente, observaram um menor número de osteoclastos no grupo com maior concentração de risedronato, sendo que muitas dessas células apresentavam-se com aspecto degenerado, tais

como forma arredondada, perda de polaridade e piquenoses. Frente a tal, os autores sugeriram que o residronato agiria pela inibição das funções do osteoclasto.

Usando como modelo experimental periodontite em cães beagle, Reddy et al. (1995) concluíram que o uso do alendronato sistêmico semanalmente em dose de 3,0 mg/kg reduziu a perda óssea associada à progressão da doença, sem, contudo haver uma diferença nos sinais de inflamação e presença de bolsa.

Estudos também foram realizados quanto a uma possível atuação dos bisfosfonatos no controle da reabsorção óssea após a realização de cirurgia periodontal a retalho. Em um primeiro estudo Yaffe et al. (1995), pesquisando em ratos, obtiveram efetividade na redução da reabsorção óssea alveolar quando aminobisfosfonatos foram utilizados de forma sistêmica após retalhos mucoperiostais, porém a aplicação tópica se apresentou ineficiente.

Liewehr et al. (1995) estudaram a capacidade de discos de dentina impregnados por bisfosfonatos resistirem à atividade odontoclástica *in vitro*. Para tanto, utilizaram osteoclastos obtidos através de cultura celular de tibia de frangos pré-natais, que foram cultivadas em fatias de dentina humana. A reabsorção foi mensurada através de microscopia óptica e eletrônica, pela contagem do número de lacunas de reabsorção produzidas pelas células clásticas. Os autores concluíram que a utilização dos bisfosfonatos reduziu significativamente a reabsorção dentinária e sugerem que essas drogas podem ser de grande valia na prevenção ou controle da reabsorção substitutiva em dentes traumatizados.

Em outro estudo em ratos Igarashi et al. (1996) avaliaram o efeito tópico do residronato na reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica e também no reparo das superfícies radiculares reabsorvidas durante a movimentação. Os

resultados mostraram uma inibição significativa e dose dependente da reabsorção radicular quando da aplicação tópica do residronato, sendo evidenciada também a não interferência no processo de reparação das raízes reabsorvidas.

Continuando a investigação na mesma linha, Yaffe et al. (1997) alteraram a forma de aplicação tópica, o tempo e a concentração do fármaco e obtiveram resultados favoráveis quanto a inibição de perda óssea após o retalho. Sendo esse o primeiro relato que demonstrou a efetividade da aplicação tópica do alendronato na prevenção de processos de reabsorção após cirurgias de retalho mucoperiosteal, uma vez que muitos relatos mostravam que a cirurgia periodontal estimulava a atividade osteoclástica com quantidades variáveis de perda da crista óssea alveolar.

Lekic et al. (1997) criaram feridas cirúrgicas em forma de janela na raiz mesial dos primeiros molares inferiores de ratos e administraram diariamente um bisfosfonato, o HEBP. Os resultados demonstraram que o fármaco em estudo teve um potencial terapêutico quando usado no recrutamento de células do ligamento periodontal para a formação de um fenótipo ósseo, portanto promovendo uma formação adiantada de osso alveolar e cemento na reparação da ferida.

O'uchi et al. (1998) observaram que o YM175, um bisfosfonato, preveniu a perda óssea alveolar pela redução do *turnover* ósseo quando administrado oralmente em cães da raça beagle, nos quais foi induzida uma periodontite.

Silveira (1999) estudou a capacidade de difusão do alendronato através da dentina radicular de caninos humanos extraídos, comparando-a com a calcitonina sintética de salmão. A partir dos dados obtidos concluiu-se que as duas medicações empregadas demonstraram alto poder de difusão na dentina radicular.

Na área de implantodontia estudos também foram realizados. Meraw, Reeve e Wollan (1999) demonstraram um aumento significativo na formação óssea precoce ao redor de implantes dentais após aplicação tópica de alendronato de sódio em cães.

Seguindo a mesma linha de experimento, Meraw e Reeve (1999) utilizaram implantes que receberam alendronato em sua superfície comparados com implantes convencionais para regeneração óssea em cães e os resultados demonstraram um aumento significativo da quantidade de osso formada ao redor dos implantes.

Yaffe et al. (1999) mediram a disponibilidade do alendronato marcado radiotivamente nos tecidos duros e moles. Para tanto, realizaram cirurgias mucoperiostais em mandíbula de ratos e procederam à aplicação tópica do fármaco através de esponjas embebidas em solução de 20mg/ml. Feitas as análises do sítio experimental, do sítio de controle contralateral e da tíbia observaram que 10% do total de alendronato aplicado localmente foi absorvido no sítio operado, enquanto que 0,2% foi observado na tíbia e 2% na área contralateral.

Também estudando retalhos mucoperiostais e aplicação tópica de alendronato em ratos Kaynak et al. (2000) observaram histologicamente que a droga não interferiu no infiltrado inflamatório, número de osteoclastos ou atividade osteoblástica, porém havia um maior número de osteoclastos com formato alterado, sem a borda rugosa e arredondados e menos lacunas de reabsorção nos grupos onde o alendronato foi aplicado.

Binderman, Adut e Yaffe (2000) aplicaram alendronato de sódio topicamente em retalhos mucoperiostais e injetaram concentrações idênticas no submucoso da bochecha de ratos em região próxima a operada. Observaram que a dose de 200 µg

foi efetiva na redução da perda óssea pós-cirúrgica quando da aplicação tópica e 400 µg teve melhores resultados quando da aplicação à distância.

Um outro estudo *in vitro* realizado por Sommercorn et al. (2000), avaliou o efeito do alendronato na neoformação de dentina em dentes humanos com ápices imaturos. Dentes molares e pré-molares humanos com ápices não totalmente formados foram cultivados em meio de cultura tecidual por 60 dias. Foi utilizada uma concentração de alendronato a 10^{-9} M. O progresso do crescimento em cultura foi observado usando microscopia óptica invertida e as secções histológicas foram analisadas com microscópio de fluorescência Leitz. Os resultados mostraram que o grupo com alendronato obteve crescimento 57,15% maior na região apical do que o grupo controle e que o crescimento na região apical foi significativamente maior que nas outras áreas de mensuração para ambos os grupos controle e alendronato. Verificaram também, que a deposição de dentina foi mais lenta nos primeiros 30 dias quando comparadas aos 30 dias restantes e que a concentração do alendronato a 10^{-9} M acelerou claramente a deposição de tecido mineralizado nos ápices imaturos.

Com os ótimos resultados observados *in vitro* e *in vivo* em outras áreas da odontologia, investigações foram desenvolvidas visando o aspecto do controle das reabsorções pós-traumatismo dental.

Levin et al. (2001) pesquisaram o efeito tópico do alendronato na reabsorção radicular de dentes reimplantados em cães. Oitenta e duas raízes de pré-molares de 5 cães foram endodonticamente tratadas, restauradas e depois avulsionadas intencionalmente e tratadas da seguinte forma antes do reimplante: em 12 raízes foi feito um sulco na face lingual e reimplantadas imediatamente, sendo que 6 raízes tiveram tratamento prévio por 5 minutos com solução salina balanceada de Hanks

(HBSS) e 6 com HBSS acrescido de alendronato de sódio (ALN); 35 raízes permaneceram a seco por 45 minutos e antes do reimplante 16 receberam HBSS e 19 HBSS + ALN por 5 minutos; e 35 raízes foram mantidas a seco por 60 minutos, sendo que 16 foram tratadas com HBSS e 19 com HBSS + ALN previamente ao reimplante, por 5 minutos.

Após o reimplante, não foram feitas contenções e os cães foram sacrificados após 4 meses, quando suas raízes foram preparadas para análise histológica. Os resultados mostraram que a reparação cementária ocorreu em todas as 12 raízes sulcadas artificialmente, indicando que o meio não inibiu a cementogênese, e que as raízes mantidas no alendronato tiveram uma reparação estatisticamente mais significativa do que as raízes mantidas em HBSS sem alendronato. O meio com alendronato também resultou em perda significativamente menor de massa radicular devido à reabsorção, comparada àqueles dentes embebidos em HBSS sem alendronato. Concluindo dessa forma, que as raízes que permaneceram no alendronato antes do reimplante apresentaram melhores resultados quanto à reparação e também menores perdas de massa radicular por reabsorção. Os autores observaram ainda um significativo processo de reparação do cimento e diminuição na perda de massa radicular após o reimplante de raízes que permaneceram a seco por 45 ou 60 minutos, mas que sofreram prévio tratamento com alendronato antes do reimplante (LEVIN et al.; 2001).

Estudando a prevenção da perda óssea alveolar em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 e doença periodontal Rocha et al. (2001) medicaram um grupo por seis meses com 10mg/dia de alendronato e observaram aumento na altura da crista óssea alveolar em relação ao grupo controle (que recebeu placebo), ou seja, a

distância entre a crista óssea alveolar e a junção amelo-cementária diminuiu no grupo testado e aumentou no grupo controle.

Devido à grande afinidade dos bisfosfonatos por osso recentemente mineralizado ou em atividade de remodelação Tenenbaum et al. (2002) sugeriram que essas drogas são ideais para diagnóstico quando combinadas com radioisótopos, campo esse conhecido como medicina nuclear. Dessa forma, casos onde o escaneamento nuclear indicar a ocorrência de perda óssea ativa uma intervenção terapêutica precoce ou mais agressiva poderia ser instalada.

Estudo realizado por Kum et al. (2003), partiu da premissa de que a reabsorção externa radicular é uma possível consequência do traumatismo dental, e está associada à presença de bactérias, reação inflamatória e intensa atividade osteoclástica. Os autores avaliaram a capacidade do alendronato e da solução Taurine, na inibição *in vitro* de osteoclastos induzidos por *Porphyromonas gingivalis*. As concentrações de alendronato utilizadas foram: 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M, enquanto que as de Taurine foram de 4 mM, 8 mM e 12 mM. Os resultados mostraram que nenhum efeito citotóxico foi evidenciado em todas as concentrações das duas drogas testadas e que houve efeito inibitório pelas duas soluções nos osteoclastos induzidos por essas bactérias.

Matsura (2003) avaliou a aplicação de gel de alendronato de sódio veiculado em carboximetil a 15mg/ml no interior de defeitos infra-ósseos periodontais de 14 pacientes com periodontite crônica. Vinte e oito dentes unirradiculares com reabsorção óssea do tipo vertical de duas a três paredes foram submetidos a procedimentos básicos e 30 dias após o procedimento cirúrgico foi realizado, retalho

de espessura total repostado com ou sem gel de alendronato. Analisando os resultados não se encontrou benefício na aplicação do gel.

Frente aos estudos apresentados, o alendronato de sódio tem sido analisado em diversas áreas da odontologia com resultados bastante promissores. Existem, porém muitas dúvidas quanto a sua capacidade de atuação direta no controle de reabsorções decorrentes dos traumatismos dentais quando utilizada como medicação intracanal (Bezerra, 2003).

Lima (2004) verificou a adesão e a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal humano sobre superfícies radiculares tratadas com raspagem e aplanamento radicular isolados ou associados ao gel de alendronato de sódio a 1,5%, nos períodos experimentais de 1, 3 e 5 dias. Em todos os grupos houve adesão e proliferação celular sobre as raízes, porém o número de células e a velocidade de proliferação foram maiores nas superfícies tratadas apenas com raspagem e aplanamento radicular.

Avaliando a administração sistêmica do alendronato após exodontia em ratos Altundal e Güvener (2004) observaram uma supressão da reabsorção óssea no grupo experimental em relação ao controle, devido à diminuição da atividade osteoclástica sem interferência na mineralização óssea. Além disso, apenas no tempo experimental mais longo, 28 dias, observaram diminuição na atividade osteoblástica e conseqüente diminuição da formação óssea.

Reconhecida a possibilidade de utilização desta medicação, cabe inicialmente considerar alguns estudos de citotoxicidade *in vitro*, por meio de técnicas de cultura celular, que tem o propósito de conhecer o potencial citotóxico, permitindo um

melhor controle das condições experimentais. Alguns estudos na odontologia foram feitos com esse intuito.

Preocupando-se com a biocompatibilidade desta droga com os tecidos periapicais, Katayama (2004) analisou o efeito do alendronato de sódio em polietilenoglicol (2 g/ml) sobre células endoteliais em cultura (*in vitro*) e no subcutâneo de rato (*in vivo*). Para a análise *in vitro* a pasta foi colocada sobre lamínulas de vidro e a seguir em contato com culturas de endoteliócitos (clone CIPs) confluentes e que tiveram sua porcentagem de viabilidade celular analisada após 0, 6, e 12 horas de contato com a droga. Como controles foram utilizadas culturas que receberam as lamínulas sem a droga. Para o estudo *in vivo* a pasta foi introduzida em tubos de polietileno implantados no tecido subcutâneo de 6 ratos. Os animais foram sacrificados 7 e 14 dias após e o tecido foi analisado. *In vitro* o alendronato de sódio causou marcante decréscimo na porcentagem de viabilidade celular em 6 e 12 horas, quando comparado ao controle. *In vivo* a resposta tecidual foi similar nos dois tempos experimentais. Houve necrose em extensa área a partir da extremidade aberta do tubo, presença de micro-abscessos e inflamação intensa infiltrando a hipoderme, separando fibras de musculatura e lobos de adipócitos. Concluiu-se que a pasta de alendronato de sódio em polietilenoglicol nas condições empregadas mostrou-se citotóxica tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Correia (2005) analisou a citotoxicidade do alendronato de sódio sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano em cultura celular. Para tanto acrescentou ao meio de cultura diferentes concentrações do fármaco: 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M. Nos tempos experimentais de 1, 6, 12 e 24 horas (curto prazo) foi analisada a viabilidade celular e em 2, 4, 6 e 8 dias (longo prazo) a sobrevivência celular. Os

resultados em triplicata foram analisados estatisticamente e mostraram que as culturas tratadas com a maior concentração da droga (10^{-5} M), apresentaram porcentagens de viabilidade celular significativamente menores, que as dos outros grupos nos tempos de 12 e 24 horas, e crescimento significativamente menor. Concluiu assim que o alendronato de sódio, em contato direto com fibroblastos de ligamento periodontal humano em cultura, é citotóxico em concentrações mais elevadas (10^{-5} e 10^{-6} M).

Cengiz et al. (2005) compararam histologicamente o alendronato, o hidróxido de cálcio e o formocresol quando aplicados em molares pulpotomizados de ratos, em diferentes períodos experimentais e concluíram que o alendronato tem um potencial indutor da atividade odontoblástica, levando à formação de dentina sem qualquer efeito adverso.

Pereira (2005) testou o alendronato de sódio como substância para tratamento tópico da superfície radicular a fim de evitar a ocorrência do processo reabsortivo. Para tanto, utilizou 54 incisivos superiores de ratos, extraídos e reimplantados, assim divididos: no grupo I, o período extra-alveolar foi de 15 minutos e, após o preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio (CALEN®), via retrógrada, os dentes foram reimplantados. Nos grupos II e III, o tempo de permanência em meio ambiente a seco foi de 30 e 60 minutos, respectivamente. Nestes grupos, os dentes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 30 minutos para remoção do ligamento periodontal cementário, lavados em soro fisiológico por 5 minutos e tiveram a superfície radicular tratada com solução de alendronato de sódio a 3,2 mg/l por 10 minutos. Os canais radiculares foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (CALEN®), via

retrógrada e, em seguida, reimplantados. Transcorridos os períodos de 15, 60 e 90 dias do reimplante, os animais foram sacrificados, as peças obtidas e processadas em laboratório para análise microscópica. Os resultados mostraram que o alendronato de sódio foi capaz de diminuir a incidência de reabsorção radicular, mas não de anquilose dento-alveolar. A variação do tempo extra-alveolar entre os grupos II e III não revelou diferenças significativas nos resultados obtidos.

Mori (2005) avaliou soluções intracanais à base de substâncias anti-reabsortivas em dentes reimplantados tardiamente. Para isso, foram utilizados 60 incisivos centrais superiores de ratos, que foram avulsionados e mantidos a seco por trinta minutos. Todos os dentes tiveram os canais instrumentados e a superfície radicular tratada com hipoclorito de sódio a 1%, seguido de fluoreto de sódio a 2%. Após isso, os dentes foram divididos em quatro grupos de acordo com a medicação intracanal: no grupo I, solução de alendronato; no grupo II, acetazolamida; no grupo III, nitrato de gálio; e no grupo IV, foi usado pasta de hidróxido de cálcio. Todos os dentes foram, então, reimplantados em seus respectivos alvéolos. Passados 15, 30 e 60 dias do reimplante, os animais foram sacrificados e as peças obtidas, processadas em laboratório para análise microscópica e morfométrica. Os resultados mostraram que, tanto as soluções de alendronato e nitrato de gálio, como a pasta de hidróxido de cálcio, limitaram a reabsorção dentária, mas não impediram o aparecimento da mesma. Já com o uso da solução de acetazolamida, a reabsorção radicular esteve ausente aos 60 dias, comprovando a sua eficácia na inibição da reabsorção radicular.

A partir de um modelo *in vitro* de células pluripotentes de medula óssea humana, Von Knoch et al. (2005) testaram três bisfosfonatos adicionados ao meio

de cultivo celular e puderam observar que o alendronato, o risedronato e o zoledronato na concentração de 10^{-8} M foram capazes de aumentar a proliferação celular e iniciar a diferenciação osteoblástica, demonstrando assim o efeito anabólico dessas drogas sobre os osteoblastos.

2.4 Cultivo celular

A cultura celular tem sido uma das tecnologias mais adotadas para estudos de efeitos tóxicos de compostos farmacêuticos e de biomateriais, incluindo os materiais odontológicos.

O dano celular pode ser observado pela alteração na morfologia, efeitos de membrana, atividade e índice de proliferação. Assim, Spångberg (1969) introduziu o método de contagem de células e de mitoses para a avaliação do dano, onde a suspensão celular e a solução teste são misturadas em uma câmara de cultura consistindo de um anel de vidro fixado a uma lâmina. Após fixação e coloração as células e mitoses são contadas.

No estudo de biocompatibilidade de materiais muitos métodos podem ser utilizados. Conforme descrito pela Fédération Dentaire Internationale (1980), as análises de materiais usados no âmbito odontológico devem seguir uma ordenação descrita em testes iniciais, secundários e de uso. Dentre os testes iniciais, o cultivo celular surge como uma das avaliações possíveis, devendo sempre procurar assimilar as condições de uso no tecido de destino.

Ao realizarem experimentos com linhagens de células permanentes e células primárias (células da gengiva, células do ligamento periodontal), Schmalz e Sharaf (1994) observaram uma tendência para as células primárias serem menos sensíveis que as linhagens de células permanentes. Porém, os principais efeitos demonstrados neste teste foram os mesmos, independente do tipo de linhagem celular usado.

As principais vantagens na utilização das culturas celulares estão no controle físico-químico do ambiente de crescimento celular, na manutenção relativamente constante das condições fisiológicas na cultura e na possibilidade de trabalho com linhagens celulares uniformes (FRESHNEY, 1990).

As técnicas de cultivo celular devem ser conduzidas sob condições estritamente assépticas, e os meios de cultura empregados devem estar de acordo com as necessidades celulares específicas, quanto aos nutrientes, hormônios e substratos, para a expressão de suas funções especializadas (FRESHNEY, 1990).

Segundo Freshney (1990) a cultura primária é aquela obtida a partir de um fragmento de tecido ou da dispersão enzimática ou mecânica de um fragmento de tecido. Esse é o primeiro passo para se obter uma linhagem celular relativamente uniforme. As células que forem capazes de proliferar irão se multiplicar formando assim uma monocamada, permitindo uma dispersão enzimática e um novo subcultivo. A esse fato dá-se o nome de passagem.

Para a formação de uma linhagem celular é necessário o aumento do número total de células após várias gerações e que haja um predomínio de células semelhantes, tornando a população celular uniforme (FRESHNEY, 1990).

Schmalz (1994) afirmou que dois tipos de células são usadas: linhagens de células permanentes derivadas de coleções tipo cultura (ou de fontes comerciais) ou linhagem de células primárias, derivadas de explante e estabelecidas em cada laboratório individual. O autor relatou que a escolha do método de registro deve ser baseada na informação desejada. Inicialmente, métodos mais simples, baseados nos efeitos de membranas ou no índice de proliferação celular deveriam ser usados. Posteriormente, se houver necessidade de informação mais detalhada relativas ao mecanismo de ação tóxica, métodos mais sofisticados baseados na atividade celular deveriam ser usados.

Somente quando as células *in vitro* são capazes de expressar suas funções normais é que podemos relacioná-las com seu tecido de origem. A expressão do fenótipo diferenciado pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por agentes químicos ou virais (DEBONI, 1995).

Ao se investigar o mecanismo de resposta biológica de qualquer medicamento é necessário avaliar os efeitos biológicos das substâncias liberadas separadamente e em combinação, a interação destas com o meio biológico e os efeitos sinérgicos ou antagônicos das drogas.

Freshney (2000) descreve um método que consiste no uso de meios condicionados durante a presa, polimerização ou contato com as substâncias, o que, com maior vantagem, seria a simulação de uma situação de contato com camadas mais profundas do tecido, onde não há o contato direto das células com o material e sim com produtos liberados por estes.

Freshney (2000) relatou que os ensaios com cultura celular podem ser divididos em duas classes (1) Respostas imediatas ou de curto prazo, tal como

alteração na permeabilidade da membrana ou perturbação de uma via metabólica; e, (2) Sobrevivência a longo prazo, geralmente medida pela retenção da capacidade de auto renovação ou sobrevivência em estado alterado, como por exemplo, transformação maligna. Os ensaios de curta duração são usados para medir a proporção de células viáveis após procedimento traumático. A maioria dos testes de viabilidade baseia-se no rompimento da integridade da membrana, determinado pela penetração de um corante ao qual a célula normalmente é impermeável (por exemplo, azul de Trypan, eritrosina, nigrosina), ou a liberação de um corante ou isótopo normalmente retido nas células viáveis (por exemplo, diacetato de fluoresceína ou cromo radiotativo). Por sua vez, os testes de longo prazo geralmente são usados para demonstrar a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo objetivo final é medir a sobrevivência das células, uma vez que a sobrevivência implica na retenção da capacidade regenerativa da célula e têm sido a base da maioria dos testes de citotoxicidade.

Assim sendo, de acordo com a literatura pesquisada, sobre a ação da calcitonina e dos bisfosfonatos, mais especificamente sobre o alendronato, justifica-se avaliar a ação e citotoxicidade desses fármacos através de cultura de células, para fornecer embasamento aos futuros trabalhos experimentais relacionados com as alterações celulares que ocorrem quando do emprego dessas drogas em um traumatismo dental severo.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo avaliar in vitro a viabilidade celular de fibroblastos de gengiva humana frente ao condicionamento do meio de cultura com diferentes pastas: de calcitonina sintética de salmão, de alendronato de sódio em três concentrações distintas e do veículo utilizado nas formulações, em dois tempos experimentais: 1 e 24 horas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Alendronato de sódio (Farmácia de Manipulação O Graal, São Paulo, SP)
- Azul de Trypan a 0,4% (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)
- Balança de precisão AB 204 (Mettler Toledo, Suíça)
- Banho maria (Fanem, SP, Brasil)
- Câmara de Neubauer (Baxter, Deerfield, IL, EUA)
- Capela de fluxo laminar (VECO, Campinas, SP, Brasil)
- Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 (Fanem, SP, Brasil)
- Di-metil-sulfóxido – DMSO (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)
- Espátula nº 24 (SSWhite Duflex, Rio de Janeiro, RJ)
- Estufa RM30005-7-ABA (Revco/Lindberg, Ashville, NC, EUA)
- Fibroblastos de gengiva humana (FMM1)
- Filtros Milipore (0,22µm de diâmetro) (Millipore Ind. Com. Ltda., Brasil)
- Frascos plásticos de cultivo celular – 25 e 75 cm² (Costar, Corning, NY, EUA)
- Incubadora com controle de temperatura/pressão (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA)
- Meio de cultura celular Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)

- Microscópio invertido de fase (Nikon –TMS-F, Japão)
- Pasta de calcitonina 0,002% em talco (Fórmula & Ação Ltda., São Paulo, SP)
- Pipetas de vidro graduadas (Costar, Corning, NY, EUA)
- Pipetas Gilson (Costar, Corning, NY, EUA)
- Pipetas Pasteur (Costar, Corning, NY, EUA)
- Placas de Petri (35 mm de diâmetro) (Costar, Corning, NY, EUA)
- Placa de vidro estéril (Jon Com. de Produtos Odontológicos, São Paulo, SP)
- Seringa descartável 20 ml (BD, Curitiba, PR)
- Solução antibiótica/antimicótica (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)
- Solução salina – NaCl a 0,9% (Farmácia O Graal, São Paulo, SP)
- Solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA) (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)
- Solução de tripsina 0,25% (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)
- Soro fetal bovino (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)
- Tubos de ensaio de 15 e 50 ml (Costar, Corning, NY, EUA)
- Talco farmacêutico (Farmácia de Manipulação O Graal, São Paulo, SP)
- Tubos criogênicos (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA)

4.2 Métodos

A reação de fibroblastos de gengiva humana em cultura frente ao alendronato de sódio e a calcitonina foi analisada por ensaio de sobrevivência celular.

4.2.1. cultura celular

Para o experimento foram utilizadas células FMM1, linhagem de fibroblasto de gengiva humana (RUANO; JAEGER; JAEGER, 2000; MARQUES et al., 2004), sendo o trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da FOU SP.

Um tubo criogênico contendo as células foi descongelado em banho-maria a 37°C durante 60 segundos. Para remover a substância crioprotetora (Di-metil-sulfóxido – DMSO) o conteúdo da ampola foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura e centrifugado a 300 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células resultantes da centrifugação, foi ressuspenso em 1 ml de meio de cultura fresco e transferido para um frasco plástico de cultivo celular de 25 cm² contendo 5 ml de meio de cultura fresco. O meio de cultura utilizado foi o de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

As células foram mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. As substituições do meio ocorreram a cada dois dias, bem como a monitoração do crescimento celular realizada a cada 24 horas.

Os subcultivos foram realizados quando a monocamada celular tornava-se subconflente. As células foram separadas com 2 ml de solução de tripsina 0,25% durante 2 minutos a 37°C. A tripsina foi então inativada com 5 ml de meio de cultura

contendo soro fetal bovino e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 300 g durante 5 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células resultantes da centrifugação foi ressuspenso em 1 ml de DMEM fresco. Para a perpetuação da linhagem celular, frações dessa suspensão de células foram subcultivadas em novos frascos, procedimento esse que deu origem a novas passagens da cultura.

Para a determinação do número de células existentes nos frascos originais, os precipitados foram ressuspenso em 1,0 ml de PBSA e 0,1 ml dessa suspensão celular foi dispensado em tubo de ensaio, sendo adicionado 0,8 ml de PBSA e 0,1 ml de azul de Trypan. Posteriormente, algumas gotas desta suspensão celular foram transferidas para o hemocitômetro (câmara de Neubauer) e a seguir, com ajuda do microscópio invertido de fase realizou-se a contagem celular, onde as células mortas foram evidenciadas pela coloração azulada, enquanto as vivas mantiveram-se despigmentadas.

O número total de células provenientes do frasco original foi obtido realizando-se a seguinte equação:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas} \times \text{Diluição} \times 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrados usados para a contagem}}$$

A suspensão celular restante (0,9 ml) foi centrifugada e o sobrenadante foi aspirado e o novo precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspenso em 1 ml de meio de cultura (DMEM) fresco.

Na dependência do número de células existentes nos frascos originais, foi adicionado a essa suspensão uma determinada quantidade de DMEM a fim de obter 1×10^4 células em cada 0,1 ml. Tal suspensão de células foi replaqueada em placas de Petri de 35 mm, e permaneceram em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂, por 24 horas até sua aderência.

4.2.2 preparo da pasta de alendronato de sódio

Para a formulação da pasta de alendronato com diferentes concentrações foram utilizados 0,325g de pó de alendronato para cada 1 ml de solução salina para obtenção de concentração de 10^{-6} , 0,0325g/mL para 10^{-7} e 0,00325g/mL para 10^{-8} .

Em uma placa de vidro estéril foi depositado 1 ml de solução salina a 0,9% e o pó de alendronato de sódio, previamente pesado correspondente à concentração desejada. Esses componentes foram misturados com auxílio de espátula e, em seguida, acrescentou-se talco farmacêutico necessário para obtenção da consistência desejada.

4.2.3 preparo da pasta de calcitonina

A pasta de calcitonina foi preparada em laboratório de manipulação a partir de 6 ampolas de calcitonina de salmão (Calcinar®), contendo 100U cada. A calcitonina em sua forma comercial já está diluída em solução salina e, portanto, foi acrescido talco farmacêutico para a obtenção de uma consistência passível de ser usada como medicação intracanal, formulando-se uma concentração de 0,002%.

Foi também preparada uma pasta contendo apenas talco e solução salina na mesma consistência para ser usada como controle do veículo acrescido do espessante.

4.2.4 grupos experimentais

Grupo I – Controle (meio de cultivo sem condicionamento)

Grupo II – Pasta de talco e solução salina (espessante + veículo)

Grupo III – Alendronato de sódio a 10^{-6} M

Grupo IV – Alendronato de sódio a 10^{-7} M

Grupo V – Alendronato de sódio a 10^{-8} M

Grupo VI – Calcitonina

4.2.5 preparo do meio condicionado

Para a obtenção do meio condicionado, o meio DMEM completo foi colocado em contato com a pasta durante o período de 1 hora em estufa com atmosfera úmida e temperatura a 37°C. Seguindo as normas preconizadas pela American Society for Testing and Materials (1992), os meios condicionados de estoque foram obtidos utilizando-se a proporção de 0,2g de pasta de alendronato de sódio, calcitonina ou pasta controle para cada 1 ml de meio DMEM.

Após o período de condicionamento, os meios foram removidos sem tocar na pasta e, dentro da capela de fluxo laminar, as soluções foram esterilizadas em filtro Milipore (poros de 0,22 µm) e acondicionadas em tubos de ensaio autoclavados. Os meios de estoque foram aplicados à cultura na diluição de 10% .

4.2.6 teste de viabilidade celular

As células foram plaqueadas na proporção de 1×10^4 células em cada 0,1 ml, em placas de Petri de 35mm de diâmetro, contendo 2 ml de meio de cultura fresco.

Decorrido o período de 24 horas, quando as células já estavam aderidas, o meio de cultura das placas foi trocado pelos meios condicionados conforme os grupos descritos. O grupo controle recebeu apenas meio não condicionado.

Após 1 e 24 horas de contato com as soluções descritas as células foram tripsinizadas e contadas em câmara Neubauer, utilizando-se o microscópio invertido de fase, perfazendo um total de 3 placas de Petri por período experimental e 6 placas por grupo.

4.3 Análise estatística

Os dados em triplicata foram submetidos a análise estatística pelo método paramétrico ANOVA, considerando o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os dados originais do experimento, que constam no Apêndice A, foram inicialmente submetidos aos testes de Cochran e de aderência à curva normal para verificar a homogeneidade e a normalidade dos dados obtidos. Confirmada a distribuição normal os resultados em triplicata foram analisados estatisticamente para cada fase desta pesquisa pela análise de variância (ANOVA, com significância de 5%), para dois fatores fixos (tempo x tipo de tratamento), além da verificação das diferenças entre os grupos.

Nesse capítulo os resultados são analisados nas Tabelas de 5.1 a 5.3 e Gráfico 5.1.

Tabela 5.1 – Média e desvios padrão (entre parênteses) para a contagem de células sobreviventes (10^4)

Grupos	1 hora	24 horas
G I (controle)	49,33 (7,02)	78,67 (9,29)
G II (veículo)	63,00 (16,00)	74,67 (18,77)
G III (ALN 10^{-6} M)	61,67 (2,89)	44,67 (7,02)
G IV (ALN 10^{-7} M)	58,00 (2,00)	59,67 (12,34)
G V (ALN 10^{-8} M)	62,33 (8,50)	64,33 (12,05)
G VI (Calcitonina)	52,00 (7,21)	39,33 (1,15)

Gráfico 5.1 – Médias da contagem de células sobreviventes

Na tabela 5.2 temos o resultado do ANOVA observa-se que a coluna importante é a do nível descritivo que possibilita a conclusão que ocorre interação significativa entre os grupos experimentais e o tempo, ou seja, a diferença entre grupos varia ao longo do tempo.

Tabela 5.2 - Análise de variância para número celular

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Estatística F	Nível descritivo
Grupo	5	2113,8020	422,7604	4,13	0,773%
Tempo	1	56,2465	56,2465	0,55	47,222%
Grupo x Tempo	5	2122,9202	424,5840	54,15	0,758%
Resíduo	24	2458,0000	102,4167		
Total	35	6750,9688			

Na tabela 5.3, o teste de comparação múltipla pelo teste de Tukey confronta todos os grupos dois a dois, mostrando o resultado geral da análise experimental.

Tabela 5.3 – Níveis descritivos para comparações múltiplas pelo método de Tukey – Contagem entre tratamentos e tempos

		1 HORA						24 HORAS					
		G I	G II	G III	G IV	G V	G VI	G I	G II	G III	G IV	G V	G VI
1 HORA	G I	13,67	12,34	8,67	13,00	2,67		29,34	25,34	4,66	10,34	15,00	10,00
	G II		1,33	5,00	0,67	11,00		15,67	11,67	18,33	3,33	1,33	23,67
	G III			3,67	0,66	9,67		17,00	13,00	17,00	2,00	2,66	22,34
	G IV				4,33	6,00		20,67	16,67	13,33	1,67	6,33	18,67
	G V					10,33		16,34	12,34	17,66	2,66	2,00	23,00
	G VI							26,67	22,67	7,33	7,67	12,33	12,67
24 HORAS	G I							4,00	34,00	19,00	14,34	39,34	
	G II								30,00	15,00	10,34	35,34	
	G III									15,00	19,66	5,34	
	G IV										4,66	20,34	
	G V											25,00	
	G VI												

■ - diferenças significativas

Analisando a Tabela 5.3: quando comparados os tempos experimentais de 1 hora e 24 horas, não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os grupos I (controle), II (veículo), IV (ALN 10^{-7} M) e V (ALN 10^{-8} M) apresentaram um padrão de crescimento semelhante nos tempos experimentais estudados.

A análise estatística demonstrou, porém, que os grupos III (ALN 10^{-6} M) e VI (Calcitonina) apresentaram diferença estatisticamente significativa no padrão de crescimento em 24 horas, quando comparados ao grupo controle (GI) e de veículo (GII) para o mesmo período experimental.

6 DISCUSSÃO

Os principais cuidados no tratamento das avulsões e intrusões estão relacionados à prevenção e controle dos processos reabsortivos, decorrentes da necrose pulpar e ocorrência de extensos danos às estruturas do ligamento periodontal.

São três as principais modalidades de reabsorção externa decorrentes deste tipo de trauma: reabsorção superficial, reabsorção inflamatória e reabsorção substitutiva.

Vários são os autores que concordam que a reabsorção superficial é auto limitante e, portanto não necessita de tratamento (ANDREASEN, 1981b; TROPE, 1995, 1998; ANDREASEN; ANDREASEN, 2001)

A reabsorção inflamatória possui um componente microbiano e o tratamento relaciona-se com o controle da reação inflamatória inicial e a remoção do agente mantenedor desse processo (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981; LAGE-MARQUES; SILVA; PROKOPOWITSCH, 1995, LAGE-MARQUES, 1998; MELLO, 1998). Porém, Andreasen (1981a) não concorda com a necessária presença de dentina infectada para o desenvolvimento da reabsorção inflamatória. Teoriza que um tecido mortificado não infectado poderia iniciar e manter o processo.

Quando há grande perda do ligamento periodontal, seja pela compressão, prolongado tempo de ressecamento ou manutenção em meio inadequado, ou remoção física das fibras, há grande possibilidade de instalação de reabsorção substitutiva.

No que se refere ao processo de reabsorção, sabe-se que requer a remoção controlada dos componentes orgânicos e inorgânicos por células reabsortivas específicas, denominadas osteoclastos, formadas a partir da fusão de células mononucleares, derivadas de precursores hematopoiéticos do baço e medula óssea (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001). Para os autores Pierce (1989), Andreasen e Andreasen (2001), os dentinoclastos são morfologicamente similares aos osteoclastos e apresentam atividades enzimáticas semelhantes, produzindo lacunas de reabsorção na superfície dentinária e deslocando-se pelos sítios de reabsorção.

As reabsorções substitutivas constituem um grande desafio na busca de medicamentos capazes de preveni-las e controlá-las. O maior problema enfrentado é que uma vez iniciado o processo reabsortivo, esse ocorre de forma contínua e incessante até que todo o dente seja substituído por tecido ósseo.

Tendo conhecimento dos processos que desencadeiam e mantêm a reabsorção, é possível determinar uma conduta clínica mais adequada associada ao uso de medicações que possam atingir a área lesada, na tentativa de bloquear ou até mesmo inibir o processo.

Algumas drogas usadas na medicina para o tratamento da osteoporose e outros distúrbios do metabolismo ósseo surgem como possíveis alternativas para o controle dos processos reabsortivos. A calcitonina e os bisfosfonatos foram desenvolvidos como potentes inibidores da reabsorção óssea (RODAN; FLEISCH, 1996).

Usando uma pasta de calcitonina como medicação intracanal em dentes reimplantados de macaco, Pierce, Berg e Lindskog (1988) obtiveram efetividade no tratamento da reabsorção inflamatória, porém um maior índice de anquiose.

Manotas et al. (1992) e Giora (1997) concordam com a indicação da calcitonina para o tratamento de reabsorções inflamatórias. Porém, Torresi, Prokopowitsch e Andrade (2001) preconizam seu uso também nos casos de reabsorção substitutiva.

A seqüência de raciocínio permitiu que a droga fosse empregada como meio de armazenamento de dentes de cães intencionalmente avulsionados, onde o uso da calcitonina demonstrou menores índices de reabsorção quando comparados a seco, solução fisiológica ou leite por 1 hora, tanto radiograficamente (PROKOPOWITSCH et al.; 1990), como histologicamente (PROKOPOWITSCH; LAGE-MARQUES, 1991).

Fica claro, porém, que a disponibilidade dessa droga nos locais de trauma é bastante difícil, mas sua utilização previamente ao reimplante, no consultório odontológico a fim de preservar as células do ligamento periodontal seria muito interessante.

Alguns experimentos procuraram observar a difusão da calcitonina através da raiz. Wiebkin et al. (1996) e Camargo (1998) compararam a presença ou não de cimento na passagem pela dentina radicular do fármaco e obtiveram resultados semelhantes. Na ausência de cimento a calcitonina atravessou com maior facilidade a raiz, chegando ao meio externo, porém a presença do cimento não impediu sua difusão. Silveira (1999) associou o corante Rodamina B e também observou difusão através da dentina radicular, com resultados positivos.

Estudos clínicos mostram bons resultados quanto à diminuição de incidência de reabsorção radicular quando a calcitonina é usada como medicação intracanal por 10 minutos após o preparo químico-cirúrgico (LAGE-MARQUES; SILVA; PROKOPOWITSCH, 1995; PROKOPOWITSCH; ANDRADE, 1997).

Associações de calcitonina foram feitas com o intuito de obter melhores resultados terapêuticos: com óxido de zinco (MANOTAS et al., 1992) e com hidróxido de cálcio (GIORA, 1997), obtendo-se bons resultados.

Os resultados do presente experimento mostraram que a calcitonina não causou efeito citotóxico sobre a cultura de fibroblastos humanos num primeiro momento, uma hora em contato com o meio condicionado, porém após um período mais longo de observação, 24 horas, o crescimento celular foi inibido por esse fármaco, mostrando um efeito sobre a viabilidade dessas células.

Deve-se dar atenção a essa reação negativa, pois tal fato poderia ser comprometedora da reparação tecidual.

A forma de atuação da calcitonina na reabsorção substitutiva é pouco conhecida e ainda controversa, mas sua eficácia nos casos de reabsorção inflamatória é um consenso entre os autores. Sabe-se, porém que ela atua diminuindo a atividade osteoclástica e, possivelmente, aumentando indiretamente a atividade osteoblástica. Contudo, se faz necessário reavaliar o protocolo de utilização que até então não encontra consenso na literatura.

Os bisfosfonatos, como potentes substâncias anti-reabsortivas, parecem uma opção promissora na tentativa de retardar ou impedir a reabsorção óssea, uma vez que reduzem o índice de dissolução da hidroxiapatita mineral do osso (SILVEIRA, 1999; BEZERRA, 2003).

A estrutura P–C–P dos bisfosfonatos permite um grande número de variações possíveis, podendo alterar as duas cadeias laterais do carbono ou esterificando os grupos fosfato. Pelo menos seis fármacos já foram testados em humanos e estão disponíveis comercialmente, alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato,

pamidronato e tiludronato. Cada um deles possui características químicas, fisicoquímicas e biológicas próprias, o que não permite extrapolar os resultados de um composto para outro em relação à sua ação (FLEISCH, 1998).

Existe extensa informação quanto ao modo de ação dos bisfosfonatos aos níveis tecidual e celular. Esses fármacos são os mais efetivos inibidores da reabsorção osteoclástica conhecidos até hoje.

Ainda não se sabe detalhadamente o mecanismo de ação dos bisfosfonatos, mas nos tecidos eles inibem a reabsorção óssea, o *turnover* e, portanto, a perda desse tecido. Esse efeito é consequência da diminuição na formação de novas unidades de remodelamento ósseo e diminuição também na profundidade das cavidades de erosão. No âmbito celular, essas drogas inativam a reabsorção osteoclástica direta ou indiretamente, induzindo o desaparecimento da borda rugosa (AZRIA, 1989).

Estudos realizados por Nishikawa et al. (1996) e Meraw e Reeve (1999), confirmam que os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea pelo controle direto da ativação dos osteoclastos e controle indireto da função deles pela diminuição dos fatores ativadores de osteoclastos, favorecendo assim o aumento da densidade mineral óssea.

Alguns experimentos observaram a diminuição do número de osteoclastos no sítio de aplicação dos bisfosfonatos testados, sugerindo esse como possível mecanismo de ação (IGARASHI et al., 1994; ADACHI et al. 1994; SHOJI; HORIUCHI; SHINODA, 1995). Igarashi et al. (1996), Kaynak et al. (2000) e Altundal e Güvener (2004) discordam desses achados e sugerem que a alteração na função dos osteoclastos é a responsável pela diminuição da reabsorção radicular.

Na Odontologia vários estudos sobre bisfosfonatos têm sido desenvolvidos em diversas especialidades, com maior ênfase na área de periodontia e cirurgia.

Pesquisas com modelos experimentais de periodontite em animais concordam na eficácia da aplicação sistêmica dos bisfosfonatos na diminuição da perda óssea, porém sem afetar o quadro inflamatório (SCHIMDT; ROWE, 1987; BRUNSVOLD et al., 1992; WEINREB et al., 1994; SHOJI; HORIUCHI; SHINODA, 1995; REDDY et al., 1995; O'UCHI et al., 1998).

Alguns experimentos demonstram os efeitos dos bisfosfonatos aplicados topicamente em cirurgia a retalho tanto em animais, quanto em humanos e os achados são conflitantes. Yaffe et al. (1995) não obtiveram efeito positivo na diminuição da reabsorção óssea com aplicação tópica, somente com administração sistêmica e sugerem que a dose empregada topicamente possa não ter permitido sua absorção pelo osso. Matsura (2003) também não observou qualquer benefício na aplicação tópica em humanos com gel de alendronato. Por outro lado, Yaffe et al. (1997), Lekic et al. (1997), Binderman, Adut e Yaffe (2000) e Kaynak et al. (2000) notaram eficácia na prevenção da reabsorção óssea pós cirurgia muco periostal quando um bisfosfonato foi aplicado localmente.

Assim a literatura atual permite inferir que os bisfosfonatos podem constituir um grande instrumento coadjuvante nos tratamentos da periodontite e na diminuição das possíveis seqüelas pós cirurgia periodontal.

A primeira investigação sobre a provável utilização dos bisfosfonatos no traumatismo dental foi realizada por Liewehr et al. (1995), onde os autores estudaram *in vitro* a capacidade de fatias de dentina imersas em dois tipos de bisfosfonatos, em resistir à atividade de dentinoclastos. Os achados evidenciaram

que os bisfosfonatos foram capazes de reduzir o processo de reabsorção de dentina mediada por dentinoclastos *in vitro*.

Aplicando o alendronato topicamente na superfície radicular antes do reimplante de dentes de cães Levin et al. (2001) observaram inibição da reabsorção radicular, mas não de maneira efetiva, já que as reabsorções foram observadas, porém menos intensamente. Talvez esse resultado tenha ocorrido pelo pouco tempo hábil para se incorporar ao tecido mineralizado da raiz (cimento e/ou dentina) apenas com uma aplicação antes do reimplante. O uso de uma pasta talvez fosse mais indicado, possibilitando maior tempo de contato do alendronato com a raiz dentária.

Muitos são os autores que sugerem o uso do alendronato como medicação intracanal (KUM et al., 2003; PEREIRA, 2005; MORI, 2005) para prevenir e tratar os casos de reabsorções radiculares externas. Além disso, o presente experimento indica também o emprego dessa medicação em forma de pasta, associando solução salina e talco farmacêutico para conseguir obter uma consistência adequada para o preenchimento do sistema de canais radiculares.

Inúmeras pesquisas têm demonstrado que o efeito dos bisfosfonatos também é dependente de sua concentração, justificando a realização de um experimento para que se determinem quais concentrações poderiam ser efetivas em um futuro estudo biológico *in vivo*. Sustenta-se então a necessidade de realizar um estudo que avalie a citotoxicidade do alendronato de sódio em diferentes concentrações e em cultura de fibroblastos.

Os resultados do presente experimento revelam crescimento celular progressivo e similar ao grupo controle nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-8} M, porém

quando usado a 10^{-6} M a pasta demonstrou afetar o crescimento celular normal. Fato esse que difere dos achados de Garcia-Moreno et al. (1998), que não observaram qualquer interferência na proliferação de osteoblastos quando da adição ao meio de cultura de concentrações entre 10^{-5} e 10^{-12} M de alendronato, assim como de Kum et al. (2003), nas concentrações de 10^{-5} a 10^{-7} M. E ainda, de estudos que demonstram efeito no aumento da proliferação celular de osteoblastos quando o alendronato de sódio é aplicado na concentração de 10^{-8} M (IM et al., 2004; VON KNOCH et al., 2005) e também em cultura de fibroblastos (STILL; PHIPPS; SCUTT, 2003). Nesses estudos, porém o fármaco foi aplicado de forma diluída ao meio de cultura celular, sendo que no presente estudo o meio foi condicionado pelos produtos liberados da pasta formulada, podendo isso justificar a diferença entre resultados.

De qualquer forma, fica o alerta aos cirurgiões-dentistas que não devem utilizar o alendronato de sódio inadvertidamente, pelo entusiasmo de conter ou prevenir o processo de reabsorção radicular, porque os efeitos colaterais do uso tópico do alendronato de sódio em concentrações inadequadas podem comprometer sobremaneira a reparação periapical de dentes traumatizados (KATAYAMA, 2004).

Diante da análise de várias pesquisas e de algumas opiniões conflitantes encontradas na literatura, parece lícito afirmar que a administração local, ou seja, usando o canal radicular de um dente avulsionado e reimplantado como um reservatório da medicação, permitindo a sua difusão lenta e gradual pelos túbulos dentinários rumo a superfície externa da raiz, ou imergindo a raiz por um período de tempo nessa mesma medicação, pode constituir um tratamento efetivo para a prevenção e/ou controle da reabsorção substitutiva.

Justifica-se o estudo pela possibilidade que essas drogas utilizadas como medicação intracanal nas situações clínicas de dentes traumatizados e acometidos pelo processo de reabsorção substitutiva, possam atuar como modulador ou inibidor da inevitável instalação da reabsorção radicular.

Cabe aclarar que, nos casos de avulsão, o emprego na forma tópica sobre a superfície radicular também deverá ter seus benefícios analisados.

Diante do exposto, é possível afirmar que novos estudos devam ser realizados no sentido de verificar possibilidade de formulação da calcitonina e do alendronato em pastas, sua permeabilidade através da dentina, tempo para atingir a superfície externa, além de testes em animais e, no futuro, em humanos para fechar a lacuna existente no tratamento e controle das reabsorções substitutivas.

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais e nos resultados obtidos, parece lícito concluir que:

1. As substâncias liberadas pela pasta de alendronato de sódio na maior concentração, 10^{-6} M, foi citotóxica no período de 24 horas, enquanto as concentrações de 10^{-7} e 10^{-8} M foram bem toleradas para as células de fibroblasto de gengiva humana *in vitro*.
2. A pasta de calcitonina influenciou negativamente na viabilidade celular após o período de 24 horas
3. O veículo utilizado para a formulação das pastas apresentou comportamento semelhante ao grupo controle nas células testadas, não proporcionando interferência na avaliação dos fármacos testados.

REFERÊNCIAS¹

Adachi H, Igarashi K, Mitani H, Shinoda H. Effects of topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on orthodontic tooth movements in rats. *J Dent Res* 1994;73(8):1478-86.

Adami S, Passeri M, Ortolani S, Broggin M, Carratelli L, Caruso I, et al. Effects of oral alendronate and intranasal salmon calcitonin on bone mass and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 1995; 17(4):383-90.

Altundal H, Güvener Ö. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(3):286-93.

American Society for Testing and Materials. Annual book of ASTM standards. Medical devices. West Conchohocken: ASTM; 1992.[v.13.01,p. 172-6]

Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1981a;10(1):43-53.

Andreasen JO. Traumatic injuries of the teeth. 2^a. ed. Philadelphia: WB Saunders 1981b.

Andreasen JO, Andreasen FM, Bakland LK, Flores MT. Manual de traumatismo dental. Trad. de Gabriela Soares e Cristiano Boschetto. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000.

Andreasen JO, Andreasen FM. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. Trad. de Gabriela Soares, Cristiano Boschetto e Ilson José Soares. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobson HC, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis and healing complications. *Endod Dent Traumat* 1995a;11(2):51-8.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobson HC, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumat* 1995b;11(2):76-89.

Andreasen JO, Hjorting-Hasen E. Replantation of teeth I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand* 1966; 24(3):236-86.

Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament: Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand* 1981; 39(1):1-13.

Azria M. The calcitonins, physiology and pharmacology. Switzerland: Karger; 1989.

Bezerra AY. Estágio atual e perspectivas futuras do tratamento das reabsorções externas pós traumatismo dental [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol* 2000; 71(8):1236-40.

Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol* 1992; 63(10):825-30.

Camargo SCC. Avaliação in vitro da difusão da calcitonina sintética de salmão através da dentina radicular quando utilizada como medicação intracanal. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1998.

Cengiz SB, Batirbaygil Y, Onur MA, Atilla P, Asan E, Altay N et al. Histological comparison of alendronate, calcium hydroxide and formocresol in amputated rat molar. *Dent Traumatol* 2005;21(5):281-8.

Correia VFP. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do alendronato de sódio sobre fibroblastos de ligamento periodontal de humanos em cultura celular [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Dani BA, Raiche AT, Puleo DA, DeLuca PP. A study of the antiresorptive activity of salmon calcitonin microspheres using cultured osteoclastic cells. AAPS PharmSciTech 2002;3(3):E-21.

Deboni MCZ. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1995.

Dogăn H, Ozcelik B, Gedikoğlu G, Senel S. The effect of calcitonin on osseous healing in guinea pig mandibule. J Endod 2001;27(3):160-3

Fédération Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Int Dent J 1980;30(2):140-88.

Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption and kinase activation *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(1):133-8.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev 1998;19(1):80-100.

Freshney RI. Animal cell culture. A practical approach. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press; 1990.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4^a ed. Indianapolis: Wiley-Liss; 2000.

García-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Mariñoso ML et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. Bone 1998;22(3):233-9.

Giora MLG. Modelo experimental de luxação de molares de ratos e comportamento do periodonto frente a diferentes medicações intracanaís [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1997.

Igarashi K, Adachi H, Mitani H, Shinoda H. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. J Dent Res 1996;75(9):1644-9.

Igarashi K, Mitani H, Adachi H, Shinoda H. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. Am J Orthod Dentofacial Ortop 1994;106(3):279-89.

Im G-I, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. Biomaterials 2004;25(18):4105-15.

Katayama MSM. Análise da citotoxicidade do alendronato de sódio em polietilenoglicol sobre cultura de endoteliócitos e no subcutâneo de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

Kaynak D, Meffert R, Günhan M, Günhan Ö, Özkaya Ö. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. J Periodontol 2000;71(5):790-6.

Kum KY, Park JH, Yoo YJ, Choi BK, Lee HJ, Lee SJ. The Inhibitory effect of alendronate and Taurine on osteoclast differentiation mediated by *Prophyromonas gingivalis* sonicates in vitro. J Endod 2003;29(1):28-30.

Lage-Marques JL. Tratamento do traumatismo dental: conceito atual. In: Gonçalves EAN, Feller C. Atualização na clínica odontológica. São Paulo: APCD Artes Médicas; 1998. cap. 9, p. 201-15.

Lage-Marques JL, Silva JRS, Prokopowitsch I. Traumatismo dental – avulsion - nuevos conceptos. Rev Fola Oral 1995;1(2):68-72.

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

Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. Dent Traumatol 2001;17(3):120-6.

Liewehr FR, Craft DW, Primack PD, Kulild JC, Turgeon DK, Sutherland DE, et al. Effect of bisphosphonates and gallium on dentin resorption *in vitro*. Endod Dent Traumatol 1995;11(1):20-6.

Lima DBGO. Biocompatibilidade de superfícies radiculares comprometidas periodontalmente e tratadas com gel de alendronato [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

Manotas JD, Solano A, Osório M, Guerrero F. Efectividad de la calcitonina para detenes la reabsorción externa posterior a un reimplante. Rev Fed Odontol Col 1992;45(179):19-31.

Marques MM, Pereira NA, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. Lasers Surg Med 2004;34(3):260-5.

Matsura E. Análise clínica do efeito do gel de alendronato de sódio na reparação de defeitos infra-ósseos periodontais, em humanos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Melo LL. Traumatismo alvéolo-dentário. São Paulo: Artes Médicas; 1998. Série EAP-APCD (9),cap. 4, p. 127-53.

Meraw S, Reeve CM. Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. J Periodontol 1999;70(10):1228-33.

Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. J Periodontol 1999;70(2):151-8.

Mori GG. Estudo microscópico e morfométrico do efeito de substâncias anti-reabsortivas usadas como medicação intracanal em dentes de ratos avulsionados e reimplantados tardiamente [Tese de Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo, Y, Kado S, Kugal N, et al. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bone 1996;18(1):9-14.

O'uchi N, Nishikawa H, Yoshino T, Konoh H, Motoie H, Nishimori E, et al. Inhibitory effects of YM175, a bisphosphonate, on the progression of experimental periodontitis in beagle dogs. J Periodont Res 1998;33(4):196-204.

Patel S. Current potential future drug treatments for osteoporosis. Ann Rheum Dis 1996;55(10):700-14.

Pereira AL. Avaliação do efeito tópico do alendronato na superfície radicular de dentes extraídos e reimplantados: análise microscópica em dentes de ratos [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Pierce AM. Experimental basis for the management of dental resorption. Endod Dent Traumatol 1989;5(6):255-65.

Pierce A, Berg JO, Lindskog S. Calcitonin as an alternative therapy in the treatment of root resorption. J Endod 1988;14(9):459-64.

Porras AG, Holland SD, Gertz BI. Pharmacokinetics of alendronate. Clin Pharmacokinet 1999;36(5):315-28.

Prokopowitsch I, Andrade W B. Uso da calcitonina no controle da reabsorção radicular externa substitutiva: a avaliação de 69 dentes tratados. In: Anais do World Congress on Dental Trauma; Guarujá, 1997. São Paulo: World Congress on Dental Trauma; 1997. p. 167.

Prokopowitsch I, Lage-Marques JL. Análise comparativa de algumas soluções armazenadoras usadas para estocagem de dentes de cães submetidos a avulsão dental e posterior reimplante. Uma avaliação histológica. In: Anais da Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1991. São Paulo. São Paulo: SBPqO; 1991. p. 72.

Prokopowitsch I, Lage-Marques JL, Santos M, Davidowics H, Di Girolano Neto J, Carvalho VGP. Análise comparativa de algumas soluções armazenadoras usadas para estocagem de dentes de cães submetidos a avulsão dental e posterior reimplante. Uma avaliação radiográfica. In: Anais da Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1990. São Paulo. São Paulo: SBPqO, 1990. p. 127.

Reddy MS, Weatherford III TW, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. J Periodontol 1995; 66(3):211-7.

Rocha M, Nava LE, Torre CV, Sánchez-Marín F, Garay-Sevilla MA, Malacara JM. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. J Periodontol 2001; 72(2):2004-9.

Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998; 38:375-88.

Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. J Clin Invest 1996; 97(12):2692-96.

Ruano R, Jaeger RG, Jaeger MM. Effect of ceramic and a non-ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts. J Periodontol 2000; 71(4):540-5.

Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. J Clin Invest 1993;91:2004-11.

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. J Clin Invest 1991;88(6):2095-105.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. J Dent 1994;22 Suppl2:S6-S11.

Schmalz G, Sharaf M. Die verwendung unterschiedlicher zellarten im agar-diffusions-test. Apud: Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. J Dent 1994;22 Suppl2:S6-S11.

Schmidt LJ, Rowe DJ. The effects of diphosphonates on alveolar bone loss. Quintessence Int 1987;18(7):497-501.

Shoji K, Horiuchi H, Shinoda H. Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. J Periodont Res 1995;30(4):277-84.

Silveira JCF. Avaliação comparativa da difusão através da dentina radicular da calcitonina sintética de salmão e do alendronato sódico. Estudo “in vitro” [Dissertação de Mestrado]. Taubaté: Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté; 1999.

Sommercorn LM, Di Fiore PM, Dixit SN, Koerber A, Lingen MW, Veis A. Effect of alendronate on immature human dental root explants. J Endod 2000;26(3):133-7.

Spångberg L. Biological effects of root canal filling materials. 1. Media for the investigation of toxic effect of water-soluble substances on human cells *in vitro*. Odontol Revy 1969;20(2):123-32.

Still K, Phipps RJ, Scutt A. Effects of risedronato, alendronate and etidronate on the viability and activity of rat bone marrow stromal cells in vitro. Calcif Tissue Int 2003; 72:143-50.

Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. J Periodontol 2002;73(3):813-22.

Torresi ECB, Prokopowitsch I, Andrade WB. Conduta endodôntica em dentes reimplantados. Espelho Clínico 2001;4(24):8-9.

Tronstad L. Root resorption – etiology, terminology and clinical manifestation. Endod Dent Traumatol 1988;4(6):241-52.

Trope M. Clinical management of avulsed tooth. Dent Clin North Am 1995;39(1):93-112.

Trope M. Root resorption of dental traumatic origin: classification based on etiology. Pract Periodont Aesthet Dent 1998;10(4):515-22.

Van Beek ER, Löwik CWM, Papapoulos SE. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. Bone 2002;30(1):64-70.

Vitté C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996;137(6):2324-33.

Von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005;26:2941-9.

Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, et al. Histomorphometrical analysis of the effect of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodont Res* 1994; 29(1):35-40.

Wiebkin OW, Cardaci SC, Heithersay GS, Pierce AM. Therapeutic delivery of calcitonin to inhibit external inflammatory root resorption. I. Diffusion kinetics of calcitonin through the dental root. *Endod Dent Traumatol* 1996;12(6):265-71.

Yaffe A, Binderman E, Breuer E, Pinto T, Golomb G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. *J Periodontol* 1999;70(8):893-5.

Yaffe A, Fine N, Alt I, Binderman I. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 1995;66(11):999-1003.

Yaffe A, Iztzovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol* 1997;68(9):884-9.

APÊNDICE A – Valores originais correspondentes ao número total de células distribuídos de acordo

com os tempos experimentais obtidos com o experimento contendo meio condicionado

Grupos Tempo	G I (controle)	G II	G III	G IV	G V	G VI
1h	42x10 ⁴	47 x10 ⁴	60 x10 ⁴	58 x10 ⁴	59 x10 ⁴	46 x10 ⁴
	56 x10 ⁴	63 x10 ⁴	60 x10 ⁴	60 x10 ⁴	56 x10 ⁴	50 x10 ⁴
	50 x10 ⁴	79 x10 ⁴	65 x10 ⁴	56 x10 ⁴	72 x10 ⁴	60 x10 ⁴
24h	83 x10 ⁴	53 x10 ⁴	38 x10 ⁴	63 x10 ⁴	53 x10 ⁴	40 x10 ⁴
	68 x10 ⁴	85 x10 ⁴	52 x10 ⁴	46 x10 ⁴	77 x10 ⁴	40 x10 ⁴
	85 x10 ⁴	86 x10 ⁴	44 x10 ⁴	70 x10 ⁴	63 x10 ⁴	38 x10 ⁴

APÊNDICE B – Níveis descritivos para comparações múltiplas pelo método de Tukey – Contagem – entre tratamentos (as diferenças significativas estão hachuradas)

	G I (controle)	G II	G III	G IV	G V	G VI
G I		4,83	10,83	5,17	0,67	18,30
G II	4,83		15,66	10	5,50	23,16
G III	10,83	15,66		5,66	10,16	7,50
G IV	5,17	10	5,66		4,50	13,16
G V	0,67	5,50	10,16	4,5		17,66
G VI	18,30	23,16	7,50	13,16	17,66	

APÊNDICE C – Níveis descritivos para comparações múltiplas pelo método de Tukey – Contagem – entre tempos (as diferenças significativas estão hachuradas)

	1 hora	24 horas
1 hora		2,5
24 horas	2,5	

APÊNDICE D – Níveis descritivos para comparações múltiplas pelo método de Tukey entre tratamentos e tempos

	GI 1h	GII 1h	GIII 1h	GIV 1h	GV 1h	GVI 1h	GI 24h	GII 24h	GIII 24h	GIV 24h	GV 24h	GVI 24h
GI 1h												
GII 1h												
GIII 1h												
GIV 1h												
GV 1h												
GVI 1h												
GI 24h												
GII 24h												
GIII 24h												
GIV 24h												
GV 24h												
GVI 24h												

- diferenças significativas a 5%

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO PROTOCOLO nº 21/05

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***“Avaliação da citotoxicidade do alendronato de sódio em cultura de fibroblasto de ligamento periodontal e subcutâneo de rato”***, de responsabilidade da pesquisadora **Julieta Baccetti Labate**, sob orientação do Professor Doutor **José Luiz Lage-Marques**.

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, 25 de setembro de 2005

Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP