ALEXANDRE GOMES BEZERRA

**ANÁLISE DA ADSORÇÃO DENTAL DO ALENDRONATO DE SÓDIO
ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
VISANDO A UTILIZAÇÃO TÓPICA ANTES DO REIMPLANTE TARDIO**

São Paulo

2008

Alexandre Gomes Bezerra

**Análise da adsorção dental do alendronato de sódio através da
cromatografia líquida de alta eficiência visando a utilização tópica
antes do reimplante tardio**

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira

São Paulo

2008

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

Bezerra, Alexandre Gomes

Análise da adsorção dental do alendronato de sódio através da cromatografia líquida de alta eficiência visando a utilização tópica antes do reimplante tardio/ Alexandre Gomes Bezerra; orientador Celso Luiz Caldeira. -- São Paulo, 2008.

109p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Endodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Reabsorção dental – Alendronato de sódio 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Endodontia 3. Reimplante dentário

CDD 617.6342

BLACK D24

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail: abezerra@usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bezerra AG. Análise da adsorção dental do alendronato de sódio através da cromatografia líquida de alta eficiência visando a utilização tópica antes do reimplante tardio [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, ____/____/2008

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: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus que permite que nossas vidas sejam maravilhosas e cheia de conquistas.

À minha querida esposa Marina que sempre me deu toda força que precisei em todos os momentos de nossa caminhada. Por nem um minuto deixei de te amar desde que estamos juntos. Te amo para sempre.

Aos Luiz Henrique e João Guilherme, filhos queridos que me ensinaram a entender realmente o que é amar.

Aos meus queridos pais Carlos e Solange, só quando temos nossos filhos é que realmente conseguimos imaginar a dimensão do que é ser pai. Essa conquista só foi possível pelo esforço de vocês.

Aos meus estimados irmãos Zi, Dedé, Nando, Ariki e Estevão. Conviver com vocês e dividir nossas conquistas é uma das grandes alegrias da minha vida.

Aos queridos sogros Marlei e Laurindo que sempre me trataram como um filho e me deram suporte e tranquilidade quando o trabalho exigiu mais tempo do que dispunha.

Aos meus queridos avós Laerte, Cida e Alzira que sempre torcem e ficam felizes com nossas conquistas. Vocês também são responsáveis por estas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso, meu orientador, pela amizade e tranquilidade com que conduziu esta orientação, confiando em minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Giulio Gavini pela amizade e sinceridade com que sempre me tratou. Agradeço também as oportunidades e confiança que deposita em mim, espero que possa sempre corresponde-lá.

Aos professores João Humberto Antoniazzi e Antonio Carlos Bombana, estimados mestres que sempre colaboraram com meu desenvolvimento científico.

Aos demais professores da disciplina de endodontia da FOU SP: Carlos Eduardo Aun, Abílio Albuquerque M. de Moura, Marcelo dos Santos, Manuel E. de Lima Machado, José Luiz Lage Marques e Igor Prokopowitsch.

A Prof. Silvia Regina C. J. Santos por me acolher em seu laboratório, mesmo com tantas atribuições, tornando possível a execução deste trabalho.

A Karin pela imensa colaboração no desenvolvimento da metodologia e da parte experimental deste trabalho.

Ao Edgar e Adriana pelo inestimável auxílio na execução da parte experimental e também pela amizade.

Aos amigos professores de nossa equipe: Shima, Érico, Dirce, Jacob, Calil, Akisue, Carmo e Maurílio pelo convívio e experiências compartilhadas.

Aos colegas de Doutorado: Denise, Sueli, Isabel e especialmente a Adriana e Carmo pelo convívio, amizade e conhecimento compartilhado.

A Lisete pelo valioso auxílio nas revisões do idioma inglês.

A bibliotecária Glauci pela cuidadosa revisão do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Dentística: Ana, Luizinho, Aldo, Arnaldo, Sonia, Davi e Leandro.

Bezerra AG. Análise da adsorção dental do alendronato de sódio através da cromatografia líquida de alta eficiência visando a utilização tópica antes do reimplante tardio [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

Os casos de reimplante tardio são considerados de prognóstico duvidoso pois a ocorrência de anquilose e reabsorções são fatos comuns para esta condição. Neste sentido, é proposta a utilização de drogas para imersão do dente antes do reimplante visando um favorecimento no prognóstico. Recentemente, o alendronato de sódio tem sido experimentalmente indicado com esta finalidade; porém, a capacidade de adsorção deste medicamento pelo dente é desconhecida. Neste estudo foi avaliada a adsorção de alendronato de sódio pelo dente utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para isto, realizou-se a imersão do dente em frascos contendo soluções deste medicamento nas concentrações de 3,2 µg/ml (10^{-5} M) e 32,0 µg/ml (10^{-4} M). Após períodos experimentais de 10, 15 e 30 minutos foram retiradas amostras das soluções para análise da concentração que foi comparada com a do controle que continha apenas a solução, sem presença do dente. Os resultados obtidos mostram que o dente adsorve alendronato de sódio quando imerso em solução e que para a concentração de 3,2 µg/ml são necessários 15 minutos para que a saturação ocorra, já para a concentração de 32,0 µg/ml uma elevada média de adsorção foi observada após 10 minutos de imersão.

Palavras-chave: Traumatismo dental; Avulsão; Reimplante tardio; Reabsorções; Alendronato de sódio

Bezerra AG. Sodium alendronate dental adsorption analysis through high performance liquid chromatography, considering the topical use before delayed replantation [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Delayed tooth replantation is considered a poor prognosis because of ankylosis and root resorption occurrence. The use of drugs for topical treatment before replantation is recommended expecting better prognosis. Recently, the sodium alendronate has been experimentally indicated for this purpose; but tooth adsorption capability of this drug is unknown. The aim of this study was to evaluate the tooth adsorption of sodium alendronate utilizing the High Performance Liquid Chromatography. Six maxillary central incisors were immersed in solutions of alendronate in concentrations of 10^{-5} and 10^{-4} M; after experimental times of 10, 15 e 30 minutes samples of solutions were obtained for concentration analysis. The concentrations obtained were compared with control concentrations (solutions without tooth immersion). The results showed the occurrence of adsorption when teeth were immersed in sodium alendronate solutions. At the concentration of 10^{-5} M it is necessary to keep the tooth immersed for at least 15 minutes, while at the concentration of 10^{-4} M after 10 minutes a high adsorption value is observed.

Keywords: Dental trauma; Avulsion; Delayed replantation; Resorptions; Sodium alendronate

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Grupos experimentais	61
Figura 4.2 - Obtenção de amostra.....	62
Figura 4.3 - Reação de derivatização do alendronato (a) com FMOC (b), originando produto cromóforo (c).....	66
Figura 4.4 - Cromatógrafo líquido SHIMADZU®	69
Figura 4.5 - Injetor Automático SIL10A VP.....	69
Figura 4.6 - Coluna analítica Symmetry® C-18	70
Figura 4.7 - Registrador-integrador Chromatopac CR-6A	70
Figura 4.8 - Cromatograma Alendronato de sódio	71
Figura 5.1 - Curva de calibração	73
Figura 5.2 - Cromatograma de amostra do G1 (dente 2 tempo 1)	74
Fluxograma 4.1 – Quantificação de alendronato através de CLAE-F	68
Gráfico 5.1 – Média das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 1	75

Gráfico 5.2 – Média das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 2	76
---	----

Quadro 6.1 – Pesquisas sobre o tratamento da superfície radicular com alendronato de sódio antes do reimplante tardio	89
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Dados da curva de calibração	73
Tabela 5.2 - Média das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 1	75
Tabela 5.3 - Média das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 2	76
Tabela 5.4 - Porcentagem adsorvida em relação ao controle no grupo 1	77
Tabela 5.5 - Porcentagem adsorvida em relação ao controle no grupo 2	77

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

G1	grupo 1
G2	grupo 2
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
Fmoc	9-fluorenilmetil cloroformato
LTDA	limitada
HPLC	high performance liquid chromatography

LISTA DE SÍMBOLOS

ml	mililitro
μ L	microlitro
mg	miligrama
mg/ml	miligrama por mililitro
μ g	micrograma
μ g/ml	micrograma por mililitro
M	molar
h	hora
min	minutos
seg	segundo
nm	nanometro
pH	potencial hidrogeniônico
%	por cento
°C	Graus Celsius
rpm	rotações por minuto
®	Marca registrada

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Avulsão.....	21
2.2 Reabsorções	33
2.2.1 Mecanismos das Reabsorções.....	33
2.3 Tratamento da superfície radicular	38
2.3.1 Remoção do ligamento necrótico	38
2.3.2 Fluoreto de sódio	39
2.3.3 Fluoreto estanhoso	40
2.3.4 Ácido cítrico	42
2.3.5 Dexametasona.....	43
2.3.6 Minociclina	44
2.3.7 Derivado da matriz de esmalte (EMDOGAIN®).....	45
2.3.8 Alendronato de sódio	48
2.4 Bifosfonatos.....	50
3 PROPOSIÇÃO	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 Material	58
4.2 Métodos.....	59
4.2.1 Preparo dos dentes	60
4.2.2 Preparo das soluções de alendronato de sódio.....	60

4.2.3 Obtenção das amostras.....	61
4.2.4 Análise das amostras	63
4.2.4.1 padrões e reagentes.....	64
4.2.4.2 preparação de padrões e controles de qualidade.....	65
4.2.4.3 instrumentação e condições cromatográficas.....	67
5 RESULTADOS	73
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

A incidência do traumatismo dental é alta na população em geral, principalmente em crianças e adultos jovens. Isso ocorre, pelo fato deste grupo estar mais sujeito a quedas, batidas e acidentes, causados por diversos fatores como a prática de esportes e até mesmo simples brincadeiras.

Na grande maioria desses traumatismos os dentes mais afetados são os incisivos centrais superiores. Os danos podem atingir não só os tecidos duros e a polpa dental, mas também os tecidos de sustentação, isoladamente ou de maneira associada.

Frente às diversas modalidades de injúria aos tecidos dentais, a mais comum é a fratura coronária, que geralmente apresenta um prognóstico favorável. Já a avulsão e a luxação intrusiva podem ser consideradas como as modalidades que apresentam as conseqüências mais severas.

Neste sentido, destaque especial deve ser dado aos casos de avulsão pela incidência relativamente alta e necessidade de condutas imediatas que podem favorecer o prognóstico. A demora na manobra de reimplante faz com que as fibras e células do ligamento periodontal, primordiais para o sucesso do reimplante sejam perdidas, favorecendo a ocorrência de anquilose e das reabsorções. Desta maneira, os casos denominados de reimplante tardio podem ser considerados como os casos que mais desafiam o tratamento do dente traumatizado.

A anquilose e as reabsorções externas, principalmente as do tipo inflamatória e substitutiva, são consideradas as conseqüências de maior gravidade após os traumatismos dentários.

A reabsorção inflamatória é estimulada e mantida por restos necróticos provenientes do ligamento periodontal ou polpa e contaminação presente nos túbulos dentinários, portanto seu controle está diretamente relacionado com manobras de limpeza e desinfecção do canal radicular. Medicamentos como o hidróxido de cálcio e as associações corticosteroide-antibiótico têm mostrado importante valor no controle dessas reabsorções.

A reabsorção substitutiva é originada por extensos danos ao ligamento periodontal, caracterizada por uma gradativa substituição do tecido dental por tecido ósseo, que culmina com a perda dentária, podendo ocorrer em curto espaço de tempo.

Para os casos de reimplante tardio, diversos tratamentos tópicos foram propostos para a superfície radicular antes da manobra de reimplante. Esses tratamentos visam sempre o favorecimento do processo de reparo do ligamento periodontal, almejando menor incidência de anquilose e principalmente de reabsorções inflamatórias e substitutivas.

Neste sentido, pode-se citar as seguintes substâncias: fluoreto de sódio, tetraciclina, fluoreto estanhoso, ácido cítrico, ácido hipocloroso, formalina, álcool, indometacina, dexametasona e mais recentemente o Emdogain® e o alendronato de sódio.

Almejar o prolongamento da permanência do dente em função é fundamental uma vez que, a pouca idade dos pacientes não permite que a solução estética e funcional definitiva adequada seja tomada antes que o crescimento do indivíduo esteja completo.

Nesse caso, é fundamental que tratamentos eficazes para a superfície radicular antes do reimplante sejam propostos. Atualmente a imersão do dente em

solução de fluoreto é a única alternativa comprovadamente aceita, entretanto, seus efeitos a longo prazo não são satisfatórios.

Recentemente, a imersão do dente em solução de alendronato de sódio antes do reimplante tem sido estudada como uma alternativa para diminuir a incidência das reabsorções. O alendronato de sódio é um medicamento pertencente ao grupo dos bifosfonatos, utilizado na área médica para tratamento de doenças do metabolismo ósseo, como a osteoporose.

Entretanto, existem poucos estudos que avaliam este medicamento e observa-se uma falta de consenso quanto a concentração a ser utilizada e o tempo de imersão na medicação antes do reimplante; não se sabe também se ocorre adsorção da droga quando em contato com o dente. Desta maneira é preciso avançar no conhecimento, principalmente com relação a capacidade de adsorção do medicamento pelo dente, para que posteriormente concentrações e tempos de imersão ideais possam ser estabelecidos, o que pode favorecer, a longo prazo, o controle das reabsorções.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Diversos acidentes, tais como: quedas, batidas, acidentes ciclísticos, automobilísticos e práticas desportivas podem levar a diferentes tipos de traumatismo dental. Por estarem mais relacionados com essas atividades, crianças e adolescentes são as faixas da população mais afetadas pelo traumatismo dental.

Neste sentido, Andreassen (1970) avaliou material referente a 1.298 pacientes, apresentando 3.026 dentes traumatizados que foram atendidos no Departamento Dental do Hospital Universitário de Copenhagen, entre os anos de 1955 e 1967. O autor observou que a incidência do trauma dental foi maior no sexo masculino (70%), que 24% dos pacientes sofreram reincidência do trauma dental e que as faixas etárias mais atingidas foram entre 0 e 5 anos (323 pacientes) e entre 6 e 10 anos (306 pacientes). Observou ainda, que o dente mais freqüentemente envolvido no trauma dental é o incisivo central superior (57,5%).

Moura, Prokopowitsch e Dawidowicz (1994) avaliaram 492 casos de traumatismo dental tratados no período entre 1988 e 1992 na disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, frente aos diversos aspectos de etiologia, predisposição e ocorrência das lesões traumáticas. Observaram então, que a ocorrência foi maior no sexo masculino (66%), sendo a faixa etária mais atingida a de 7 a 10 anos (37,8%). Os dentes que apresentaram maior predisposição foram os incisivos centrais superiores (59%).

Resultados semelhantes foram observados por Rocha e Cardoso (2001), que realizaram um estudo para determinar fatores relacionados a ocorrência de traumatismo dental em dentes permanentes, de crianças atendidas na Universidade

Federal de Santa Catarina. Durante um período de 18 meses, 36 crianças com idade entre 7 e 12 anos tiveram 72 dentes traumatizados. Os autores relatam que: a ocorrência do trauma foi maior no sexo masculino (61,3%); 63,9% das crianças apresentaram mais de um dente traumatizado, estando a reincidência de trauma presente em 19,4% dos casos. As fraturas de esmalte e dentina corresponderam a 51,4% do total de dentes traumatizados, sendo as quedas a causa mais comum (83,3%).

Em outro estudo da prevalência e causas do traumatismo dental, Nicolau et al. (2001) examinaram 652 adolescentes com 13 anos de idade que freqüentam escolas particulares e públicas da região urbana de Cianorte, no Brasil. Segundo os autores, a prevalência de injúrias traumáticas em incisivos permanentes foi de 20,4%. As causas mais comuns de traumatismo dental foram as quedas (24,1%), seguidas por colisões com pessoas ou objetos inanimados (15%), acidentes de trânsito (10,5%), uso indevido dos dentes (6%), esportes (2,3%) e violência (1,5%). As causas desconhecidas corresponderam a 40,6%.

Recentemente, Bezerra et al. (2006) ao avaliarem material referente a 1359 dentes traumatizados em 614 pacientes atendidos no Centro de Traumatismo Dental da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CADE-trauma), observaram que a incidência é maior no sexo masculino (68,73%) e que os incisivos centrais superiores são os dentes mais acometidos (65,56%). Observaram ainda que a faixa etária mais acometida está entre 7 e 13 anos de idade (44,46%) e, com relação as modalidades de trauma, destacam-se a fratura de esmalte e dentina sem exposição pulpar (26,49%), a avulsão (15,45%) e a subluxação (13,83%).

Confirmando a alta incidência dos traumatismos dentais, Kaste et al. (1996) afirmam que pelo menos 25% dos americanos com idade entre 6 e 50 anos sofreu

algum tipo de injúria nos incisivos superiores e inferiores. Os dados foram obtidos em um levantamento realizado pelo National Institute of Dental Research. O levantamento aponta ainda a fratura coronária como a injúria que ocorre com maior frequência.

Segundo Diangelis e Bakland (1998), os traumatismos dentais foram inicialmente classificados, de forma universal, na década de 50. Somente na década seguinte a Organização Mundial de Saúde desenvolveu uma classificação descritiva, de fácil entendimento e que ganhou uma boa aceitação internacional. Essa classificação foi modificada mais tarde, dividindo os traumatismos dentais em dois grandes grupos: lesões dos tecidos duros e lesões dos tecidos de suporte.

As diferentes modalidades de traumatismo dental podem causar injúrias não só aos tecidos duros e à polpa, mas também aos tecidos de sustentação, onde o ligamento periodontal desempenha função primordial na manutenção do dente. A cicatrização da lesão após o trauma dental é complicada pela multiplicidade de sistemas celulares envolvidos.

A polpa pode responder a um espectro de eventos traumáticos, tais como a dentina exposta devido a uma fratura, com subsequente invasão bacteriana para o interior dos túbulos dentinários. Além disso, a polpa pode ser diretamente exposta a uma contaminação bacteriana a partir da saliva, após uma fratura que envolve esmalte e dentina. Outra exposição, geralmente estéril, ocorre durante uma fratura radicular, quando a polpa é exposta ao ligamento periodontal através da linha de fratura. Finalmente, a polpa pode ser parcial ou totalmente rompida e algumas vezes esmagada na região do forame apical (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Essas diferentes agressões traumáticas, que interferem com o suprimento neurovascular da polpa, dão origem a várias respostas de cicatrização e defesa, que variam desde a formação localizada ou generalizada de dentina secundária até uma inflamação pulpar, reabsorção interna, assim como necrose pulpar com e sem infecção (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Após um traumatismo dental severo, o ligamento periodontal deve responder a uma variedade de agressões. Dentre estas, observamos estresses de compressão, tensão ou cisalhamento temporários, que resultam em hemorragia e edema, ruptura ou contusão do ligamento periodontal. Cada um desses traumatismos pode induzir sinais variáveis de cicatrização da lesão (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Dentre as diferentes modalidades de traumatismo dental, as que apresentam os piores prognósticos são as intrusões (JACOBSEN, 1983; ANDREASEN; VESTERGAARD PEDERSEN, 1985; EBELESEDER et al., 2000; AL-BRADI; KINIRONS; WELBURY, 2002) e as avulsões (ANDREASEN; HJORTING-HANSEN, 1966; ANDERSON; BODIN; SÖRENSEN, 1981; GONDA et al., 1990; ANDREASEN et al., 1995a; EBELESEDER et al., 1998; KINIRONS; BOYD; GREGG, 1999; CHAPPUIS; VON ARX, 2005). Este prognóstico ruim está relacionado com a severidade dos danos provocados aos tecidos pulpar e periodontal. A manifestação de processos reabsortivos aparece como seqüela freqüente associada a essas modalidades de trauma dental.

Neste sentido, destaque especial deve ser dado aos casos de avulsão, pela incidência relativamente alta e necessidade de medidas de urgência para que um prognóstico bom seja favorecido. A demora na manobra de reimplante faz com que as fibras e células do ligamento periodontal, primordiais para o sucesso do

reimplante, sejam perdidas, favorecendo a ocorrência de anquilose e das reabsorções. Desta maneira, os casos denominados de reimplante tardio podem ser considerados como os casos que mais desafiam o tratamento do dente traumatizado.

2.1 Avulsão

A avulsão pode ser definida como o deslocamento total do dente para fora de seu alvéolo. Segundo Andreasen e Andreasen (2001), a incidência da avulsão está entre 0,5 e 16% das lesões traumáticas na dentição permanente e entre 7 e 13% na dentição decídua. A avulsão ocorre principalmente em crianças com idade entre 7 a 9 anos, quando os incisivos permanentes estão em fase de erupção. Nesta idade, a frouxa estrutura das fibras do ligamento periodontal ao redor do dente em erupção oferece pouca resistência a uma força extrusiva.

Ainda com relação à incidência das avulsões, Bezerra et al. (2006) avaliando material referente aos pacientes acometidos por trauma dental entre os anos de 2003 e 2005, atendidos no Centro de Trauma da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CADE-trauma), observaram uma incidência de 15,45% sobre um total de 1359 dentes traumatizados.

Tanto a polpa quanto o ligamento periodontal sofrem danos extensos durante o período extra-alveolar, sendo que as reações de reparo dependem de fatores como: período extra-alveolar, meio de armazenamento, manipulação extra-alveolar e grau de desenvolvimento radicular.

A cura pulpar para os casos de avulsão é definida pela revascularização. Esta condição só é possível para casos onde a rizogênese ainda não esta completa. Segundo Andreasen et al. (1995b), a revascularização após reimplante é mais freqüente em dentes com menor distância entre o forame apical e os cornos pulpaes. A chance de revascularização diminui à medida em que o tempo de permanência do dente a seco aumenta.

Andreasen et al. (1995a) coletaram dados referentes a 322 pacientes com 400 dentes permanentes avulsionados e reimplantados, no período de 1965 a 1988. Analisando esse material, os autores observaram que 32 dentes reimplantados (8%) mostraram revascularização. Porém, considerando que dos 400 dentes apenas 94 apresentavam ápice incompletamente formado, condição que permite a revascularização, a freqüência de revascularização aumentou para 34%.

Relacionada à possibilidade de revascularização, Cvek et al. (1990) estudaram em macacos os efeitos da imersão do dente em doxiciclina antes do reimplante. Os autores relataram que a imersão do dente em uma solução contendo doxiciclina (1 mg para 20 ml de solução salina) por um período de 5 minutos antes do reimplante aumentou significativamente a ocorrência de revascularização.

O término da formação radicular subsequente ao reimplante é um fenômeno que pode ser observado, sendo freqüentemente associado ao processo de revascularização e ocorrendo raramente em casos de necrose pulpar. Esse fenômeno é explicado pela preservação da bainha epitelial de Hertwig. Nos casos onde ocorreu o comprometimento dessa bainha, observou-se uma invaginação de tecido ósseo com formação de um ligamento periodontal interno (ANDREASEN et al., 1995c).

Com relação ao ligamento periodontal, as três principais injúrias que ocorrem durante o processo de avulsão e reimplante são: secagem, compressão contra parede óssea e remoção física do ligamento da superfície radicular durante a avulsão ou manipulação extra-oral. A extensão desses danos está diretamente relacionada com o aparecimento das reabsorções, principalmente do tipo substitutiva e ainda pela definição entre um processo transitório ou progressivo (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981).

Imediatamente após o reimplante, um coágulo é observado entre as duas partes do ligamento periodontal rompido. A linha de separação está situada com maior frequência no centro do ligamento periodontal, embora a separação possa ocorrer na inserção das fibras de Sharpey no cimento ou no osso alveolar. A proliferação das células do tecido conjuntivo ocorre logo e, após 3 a 4 dias, a lacuna no ligamento periodontal é obliterada por um tecido conjuntivo jovem. Depois de 1 semana, o epitélio reinsere-se na junção cimento-esmalte. Clinicamente, tal fato pode significar um menor risco de infecção gengival e de invasão bacteriana no canal radicular ou no ligamento periodontal, através de uma bolsa gengival. As fibras colágenas gengivais estão geralmente unidas, enquanto as fibras infra-ósseas estão unidas apenas em algumas poucas áreas. O primeiro ataque superficial de osteoclastos pode ser visto neste momento ao longo da superfície radicular (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Após duas semanas, a linha de rompimento no ligamento periodontal é reparada e as fibras colágenas são vistas prolongando-se da superfície do cimento até o osso alveolar. A atividade de reabsorção pode ser identificada neste instante ao longo da superfície radicular (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

De acordo com Andreasen e Andreasen (2001), o exame histológico de dentes humanos e de animais reimplantados revelou quatro diferentes modalidades de reparo no ligamento periodontal, a saber:

- Reparo com ligamento periodontal normal:

Ocorre a regeneração completa do ligamento periodontal que geralmente leva cerca de 2 a 4 semanas para completar-se. Este tipo de reparo ocorrerá apenas se as camadas celulares mais internas ao longo da superfície radicular estiverem vitais. Este tipo de reparo nunca acontecerá após uma avulsão dental, já que o traumatismo resultará numa lesão mínima à camada mais interna do ligamento periodontal, levando à reabsorção de superfície.

- Reparo com reabsorção de superfície:

Observa-se a presença de áreas localizadas ao longo da superfície radicular que mostram lacunas de reabsorção de superfície reparadas com cemento neoformado, representando áreas localizadas de danos ao ligamento periodontal ou ao cemento, que foram reparadas por células do ligamento periodontal. A reabsorção de superfície é autolimitante. A maioria das lacunas de reabsorção é superficial e está restrita ao cemento. Henry e Weinmann (1951) realizaram um estudo histológico de 261 dentes humanos com tecidos de suporte, sem histórico de traumatismo dental, no qual observaram a presença de reabsorções com morfologia e localização semelhantes, em superfícies radiculares não traumatizadas com uma frequência de 90% entre todos os dentes examinados.

- Reparo com reabsorção inflamatória:

Verifica-se a presença de cavidades de reabsorção em forma de “tigela” no cemento e na dentina, associados com alterações inflamatórias no tecido periodontal

adjacente, onde a superfície radicular sofre uma intensa reabsorção com numerosas lacunas de Howship e osteoclastos.

Lesões menores do ligamento periodontal e do cimento, em virtude de traumatismos ou contaminação com bactérias, induzem a formação de pequenas cavidades de reabsorção na superfície radicular, presumivelmente da mesma maneira que na reabsorção de superfície. Se essas cavidades de reabsorção expuserem túbulos dentinários e o canal radicular contiver tecido necrótico infectado, toxinas penetrarão, via túbulos dentinários, e provocarão uma resposta inflamatória. Isto, por sua vez intensificará o processo de reabsorção que avança em direção ao canal radicular. O processo de reabsorção pode progredir muito rapidamente e em poucos meses toda a raiz pode ser reabsorvida (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

A reabsorção inflamatória é especialmente freqüente e agressiva após o reimplante em pacientes de 6 a 10 anos de idade. A explicação provável para este fato é uma combinação de amplos túbulos dentinários e uma fina cobertura de cimento, associada a um metabolismo mais rápido. Em faixas etárias mais avançadas, o processo de reabsorção segue um curso mais lento (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

- Reparo com anquilose e reabsorção por substituição:

Histologicamente, a anquilose representa uma fusão do osso alveolar e da superfície radicular, podendo ser constatada duas semanas após o reimplante. A etiologia está relacionada com a ausência de ligamento periodontal vital na superfície radicular. A reabsorção por substituição desenvolve-se em duas direções diferentes, dependendo da extensão do dano à cobertura do ligamento periodontal sobre a raiz: uma reabsorção substitutiva progressiva, que gradualmente reabsorve

toda a raiz ou uma reabsorção substitutiva transitória, em que uma anquilose já estabelecida desaparece mais tarde (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Melcher (1970) e Line, Polson e Zander (1974) desenvolveram estudos em ratos e macacos respectivamente, que permitiram investigar a repopularização celular após lesão traumática ao ligamento periodontal. Os autores concluíram que o tipo de célula que irá repopular a região de necrose de ligamento periodontal, determina a ocorrência ou não de anquilose. Dessa maneira, áreas repopuladas com células de origem óssea sofrem anquilose, enquanto que as repopuladas por células do ligamento periodontal regeneram normalmente.

A reabsorção por substituição transitória está possivelmente relacionada com áreas de danos menores à superfície radicular. Nestes casos, a anquilose é formada e mais tarde é reabsorvida por áreas de ligamento periodontal vital. Esta teoria é sustentada experimentalmente por pesquisas como a de Andreasen e Kristerson (1981), que avaliaram em macacos o efeito da secagem e remoção de ligamento periodontal limitadas, na cicatrização periodontal de dentes reimplantados. Com relação a secagem limitada, foram isoladas áreas de 2 e 4 mm que eram secas com jato de ar enquanto que o restante da raiz permanecia em soro fisiológico antes do reimplante, com períodos de secagem variando entre 60, 90 e 120 minutos. Já com relação à remoção do ligamento foram padronizadas áreas de 1, 4, 9 e 16 mm² onde o ligamento foi removido com auxílio de cinzéis, o tempo extra-alveolar foi de 18 minutos. Baseados nos resultados, os autores postulam que a remoção física ou secagem prolongada do ligamento periodontal inicia uma rápida atividade osteogênica no alvéolo, estabelecendo uma anquilose. Porém, se a área danificada está próxima de uma região da superfície radicular com ligamento periodontal vital,

um processo reabsortivo a partir dessa região é estabelecido, sendo a anquilose gradualmente eliminada.

A anquilose progressiva é sempre induzida quando todo o ligamento periodontal é removido antes do reimplante ou após uma secagem extensa do dente antes do reimplante. Lindskog e Hammarström (1980) utilizando um método caseína-ágar para detecção de inibidores de protease, comprovaram a presença de um potente inibidor da collagenase na membrana periodontal ou no cimento. A presença desse inibidor teria como função prevenir a reabsorção da raiz. Com a necrose do ligamento periodontal esse fator de proteção é perdido.

A presença das reabsorções são seqüelas comuns relacionadas ao tratamento de dentes avulsionados e diversos estudos clínicos confirmam essa afirmação.

Andreasen e Hjorting-Hansen (1966) conduziram um estudo clínico e radiográfico de 110 dentes reimplantados no Hospital Universitário de Copenhague, observando a presença de reabsorção substitutiva em 44 dentes. Os autores observaram ainda que 90% dos dentes reimplantados num período máximo de 30 minutos não apresentavam reabsorções, porém, após períodos iguais ou superiores a 90 minutos, as reabsorções não foram observadas em apenas 7% dos casos.

Andersson, Bodin e Sörensen (1981) acompanharam 39 dentes reimplantados após uma permanência mínima de 1 hora a seco, durante um período aproximado de 5 anos. Os autores observaram que o índice de reabsorção radicular está relacionado com a idade. Pacientes situados numa faixa etária entre 8 e 16 anos no momento da avulsão, apresentam índices de reabsorção maiores que pacientes em faixa etária de 17 a 39 anos. Observaram também que um dente reimplantado com ligamento periodontal necrótico vai sofrer anquilose e ser

reabsorvido num período que varia de 3 a 7 anos para pacientes jovens; um dente reimplantado em condições semelhantes, em pacientes mais velhos, pode permanecer em função por um tempo consideravelmente maior que pode chegar a décadas.

Gonda et al. (1990) realizaram o acompanhamento clínico e radiográfico de 29 casos de reimplante realizados na Faculdade de Odontologia da Universidade de Niigata no Japão. Os autores puderam constatar a presença de reabsorções em 16 casos.

Andreasen et al. (1995a) coletaram dados referentes a 322 pacientes com 400 dentes permanentes avulsionados e reimplantados, no período de 1965 a 1988. Analisando esse material, os autores observaram que a regeneração do ligamento periodontal, sem evidências de reabsorção ocorreu em 96 casos (24%) e que 255 dentes (64%) apresentavam evidências de anquilose. Os autores relatam que durante o período de observação, 119 dentes (30%) foram extraídos, o que indica que o prognóstico em longo prazo é duvidoso, especialmente em dentes com ápice incompletamente formado. Esse fato é atribuído a uma maior velocidade na reabsorção associada a uma menor quantidade de substância dental a ser reabsorvida.

Ebeleseder et al. (1998) estudaram 103 casos de avulsão tratados entre os anos de 1990 e 1994 na Universidade de Clínica Dental de Graz, na Áustria. Os autores procuraram avaliar o prognóstico levando em consideração a idade dos pacientes. Os casos foram divididos em 3 grupos: dentes imaturos (rizogênese incompleta); dentes maturos (rizogênese completa) em crianças e adolescentes e finalmente dentes maturos em adultos. A observação dos dados mostrou que 64 dentes apresentaram evidências de anquilose, sendo a incidência significativamente

maior nos grupos de pacientes jovens, sugerindo ainda que em indivíduos em fase de crescimento, um dente anquilosado deve ser perdido após um período de 5 a 7 anos no máximo. Finalmente concluíram que o reimplante pode ser considerado, muitas vezes, uma solução temporária para crianças e adolescentes, trazendo como benefício principal o ganho de tempo até que um tratamento definitivo possa ser executado.

Kinirons et al. (1999) acompanharam 84 dentes avulsionados no período de 1990 a 1996 atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade de Belfast na Irlanda. A reabsorção substitutiva foi observada em 40 dentes. A reabsorção inflamatória mostrou-se presente em 22 dentes, sendo mais freqüente nos casos com ápice fechado, onde se aguardou períodos maiores que 20 dias para início da terapia endodôntica. Uma relação significativa entre presença de reabsorção inflamatória e tempo de permanência a seco antes do reimplante também foi observada.

A literatura tem demonstrado que o fator principal no prognóstico dos casos de avulsão é o período extra-alveolar, pois a manutenção da vitalidade das células do ligamento periodontal favorece a ocorrência de um reparo com menor incidência de anquilose e reabsorções.

Os efeitos da permanência do dente em ambiente seco antes do reimplante foram estudados por Groper e Bernick (1970) que analisaram em dentes de cães os efeitos de diferentes períodos de permanência extra-alveolar antes do reimplante. Após a extração os dentes foram mantidos secos por períodos de: 0, 10, 15, 30 e 60 minutos; 3, 8, e 24 horas antes do reimplante. Os pesquisadores observaram que a partir de 1 hora a possibilidade de reparo piora significativamente.

Os efeitos nocivos no ligamento periodontal da permanência do dente a seco antes do reimplante também foram estudados *in vitro* por Söder et al. (1977). Foram utilizados dentes humanos e de macacos que, após extração, permaneceram a seco por períodos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos antes de serem colocados em meio de cultura. Os autores observaram que o número de células viáveis declina muito rapidamente com o aumento do período de secagem. Após um período de 2 horas, não foi possível demonstrar viabilidade celular com a técnica de cultura tecidual.

Evidenciando a importância das fibras do ligamento periodontal que permanecem aderidas ao dente após a avulsão, Andreasen (1981b) estudou em macacos, através de reimplantes e autotransplantes, a cicatrização do ligamento periodontal frente a variação de fatores como: remoção do ligamento relacionado ao cimento, remoção do ligamento relacionado ao osso alveolar, tempo extra-alveolar e adaptação do dente ao alvéolo. Baseado em seus resultados, concluiu que a presença de ligamento periodontal intacto e viável na superfície radicular é o fator mais importante para uma adequada cicatrização do ligamento periodontal sem a presença de reabsorções.

Andersson e Bodin (1990) realizaram acompanhamento clínico e radiográfico, por um período de 5 anos, de 21 dentes reimplantados, com período extra-oral máximo de 15 minutos. Os autores concluíram que dentes reimplantados em até 15 minutos após a avulsão apresentam um prognóstico favorável no longo prazo. Essa conclusão está embasada nos baixos índices de reabsorção encontrados nos controles radiográficos.

Neste mesmo rumo, Andreasen et al. (1995d) acompanhando 400 casos de avulsão e reimplante afirmaram que o principal fator capaz de aumentar a ocorrência

de regeneração do ligamento periodontal é o reimplante imediato. Segundo os autores, se todos os dentes avulsionados fossem reimplantados imediatamente, um índice de regeneração do ligamento periodontal entre 85 a 97% poderia ser esperado. Os autores destacam a importância de campanhas, destinadas a serviços de emergência, dentistas e público em geral para enfatizar a importância do reimplante imediato no prognóstico das avulsões.

Portanto, quando o reimplante imediato não é possível, deve-se utilizar um meio de armazenamento que mantenha a viabilidade das células do ligamento periodontal.

Essa importância foi evidenciada por Andreasen (1981a), que avaliou em macacos o efeito do período extra-alveolar e do meio de armazenamento sobre a cicatrização pulpar e periodontal após reimplantes. Diante dos resultados pode-se concluir que a incidência de reabsorção inflamatória é comum quando o dente é armazenado a seco, existindo relação direta com o tempo extra-alveolar. Após 30 minutos de armazenamento seco, a reabsorção inflamatória é muito proeminente. Com a relação à reabsorção substitutiva observou-se também uma forte relação com o armazenamento seco, sendo essa reabsorção muito proeminente após 60 minutos. A reabsorção substitutiva foi raramente encontrada nos dentes armazenados em solução fisiológica e saliva, sendo significativamente maior entre os dentes armazenados em água de torneira, permitindo afirmar que solução salina e saliva oferecem uma boa proteção contra reabsorções radiculares durante períodos extra-alveolares de até 120 minutos.

Blomlöf, Lindskog e Hammarström (1981b) avaliando *in vitro* diferentes meios de armazenamento concluíram que a saliva não é um meio desejável por ser hipotônica, podendo causar rápida morte celular. Blomlöf, Otteskog e Hammarström

(1981a), agora trabalhando *in vivo*, avaliaram em macacos a reparação do ligamento periodontal de dentes reimplantados após armazenamento em saliva ou leite antes do reimplante, por períodos de 1, 2 ou 3 horas. Os autores observaram uma menor presença de reabsorção inflamatória para os dentes armazenados no leite. Os autores afirmam ainda que o armazenamento em leite por um período de 3 horas antes do reimplante apresentou resultados semelhantes ao reimplante imediato, quanto a incidência de reabsorções.

Lindskog, Blomlöf e Hammarström (1983) compararam *in vitro* a eficiência da saliva e do leite como meios de armazenamento antes do reimplante. Os autores concluíram que a baixa osmolaridade combinada à presença de adesão bacteriana tornam a saliva um meio de armazenamento menos eficiente que o leite.

Huang, Remeikis e Daniel (1996) avaliaram os efeitos de diferentes soluções em culturas de células de ligamento periodontal. Foram comparados: leite, 2 soluções para lentes de contato (Alcon Opti-Free e K-Mart), solução salina e solução salina balanceada de Hank. Os autores observaram que a solução salina apresentou melhores resultados que as soluções para lentes de contato. O leite foi considerado como um bom meio de conservação para períodos de até 6 horas, enquanto que a solução salina balanceada de Hank apresentou os melhores resultados, mantendo a viabilidade celular por períodos superiores a 48 horas.

Pavek e Radtke (2000) relatam que estudos têm mostrado que a propriedade de osmolaridade do meio de armazenamento é um fator crítico. Meios de armazenamento desejáveis incluem a solução salina balanceada de Hank, leite e soro fisiológico.

Como visto anteriormente, a secagem do ligamento periodontal por períodos superiores a 1 hora inviabiliza grande parte das células do ligamento periodontal,

que passam a atuar como agentes de estímulo ao processo inflamatório. Nestes casos a ocorrência de anquilose e das reabsorções é praticamente inevitável.

Compreender melhor o processo de reabsorção permite que alternativas sejam propostas visando um favorecimento no prognóstico de um dente reimplantado tardiamente.

2.2 Reabsorções

2.2.1 Mecanismos das reabsorções

- Células de reabsorção de tecido duro:

O processo de reabsorção óssea requer a remoção controlada tanto dos componentes orgânicos quanto inorgânicos por células específicas de reabsorção óssea, os osteoclastos. Os osteoclastos causam a erosão do osso ou da superfície radicular, sendo tipicamente observados em cavidades de reabsorção ou lacunas de Howship (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Os osteoclastos formam-se a partir da fusão de células mononucleares derivadas dos precursores hematopoiéticos do baço e medula óssea, que chegam ao sítio da reabsorção através da circulação sanguínea, enquanto que os osteoblastos e osteócitos provêm das células osteoprogenitoras do esqueleto. Acredita-se que os osteoclastos originam-se de um tronco celular multipotencial que produz leucócitos para o sangue periférico (MARS, 1983).

O mecanismo de reabsorção de tecidos mineralizados como osso e dentina é semelhante. Osteoclastos e dentinoclastos são células possivelmente indistinguíveis, capazes de reabsorver estruturas mineralizadas (PIERCE, 1989).

No nível ultra-estrutural, os osteoclastos apresentam mitocôndrias abundantes, polissomos livres, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, múltiplos vacúolos perinucleares e grânulos densos. A maioria dos osteoclastos pode conter de 20 a 30 núcleos, embora alguns possam conter até 100 ou mais. A característica mais notável do osteoclasto é a presença de uma borda rugosa, que consiste em um sistema complexo de dobras na membrana celular que aumenta grandemente a área de superfície. Adjacente a essa borda, aparece uma área citoplasmática denominada zona clara que contém um sistema de microfilamentos totalmente destituído de organelas celulares. (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

- Reabsorção óssea osteoclástica

O processo de reabsorção é complexo e deve envolver ações sequencialmente reguladas de dissolução mineral ácida e degradação da matriz orgânica. Os osteoclastos têm a capacidade de degradar tanto o mineral quanto a matriz orgânica, sendo que a reabsorção ocorre adjacente à borda rugosa da célula, na região da zona clara. Após estabelecer contato com a superfície a ser reabsorvida, o osteoclasto acidifica este microambiente para promover a dissolução da porção mineral. A acidificação do espaço subosteoclástico requer que os osteoclastos possuam um mecanismo para a geração e liberação de íons H^+ . Embora vários ácidos orgânicos tenham sido considerados no mecanismo de acidificação subosteoclástica, acredita-se atualmente que o ácido carbônico possa desempenhar um papel importante nesse processo. A anidrase carbônica, enzima

que catalisa reversivelmente a produção do ácido carbônico a partir de CO_2 , foi localizada nos osteoclastos (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Após a dissolução ácida do mineral, o passo seguinte na reabsorção requer a digestão enzimática da matriz orgânica. A desmineralização expõe a matriz à atividade enzimática proteolítica. Numerosas enzimas foram localizadas no lume dos retículos endoplasmáticos, complexo de Golgi e nas muitas vesículas e vacúolos próximos a borda rugosa. As enzimas que degradam a matriz óssea muito provavelmente pertencem a duas classes principais: proteinases de cisteína e metaloproteinases de matriz. Acredita-se que a collagenase e catepsinas lisossômicas sejam as mais importantes destas. Como a matriz orgânica é composta principalmente por colágeno, a maior parte da degradação inicial deve envolver uma atividade collagenolítica, as enzimas lisossômicas podem agir em conjunto com a collagenase na degradação dessa matriz orgânica. Os dados disponíveis mais recentes sugerem que são necessárias múltiplas enzimas para a remoção da matriz orgânica após a solubilização da porção mineral do tecido duro (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

- Regulação dos osteoclastos: interações osteoclasto/osteoblasto:

Existem múltiplos fatores, incluindo agentes hormonais e parácrinos, para regular a atividade osteoclástica. Muitos desses fatores que afetam a função osteoclástica não agem diretamente, mas através de ligação aos osteoblastos que por sua vez agem sobre os osteoclastos. Desse modo, as interações osteoblastos-osteoclastos desempenham um papel significativo na formação de osteoclastos e na regulação da reabsorção óssea.

De acordo com Andreasen e Andreasen (2001), vários hormônios sistêmicos têm efeitos importantes sobre a reabsorção óssea osteoclástica:

- Hormônio paratireóideo (PTH): estimula de forma aguda a reabsorção e inibe a formação óssea. Para induzir a reabsorção óssea o PTH não age diretamente sobre os osteoclastos, estes podem até mesmo não possuir receptores detectáveis para o PTH. O PTH liga-se a receptores nos osteoblastos, que então comunicam este sinal hormonal aos osteoclastos. O PTH também inibe significativamente a síntese de matriz pelos osteoblastos.

- 1,25-diidroxivitamina D₃: é um metabólito ativo da vitamina D₃ que age como potente estimulador da reabsorção óssea, seu efeito não é direto sobre o osteoclasto. Esse metabólito estimula a formação de osteoclastos a partir de células precursoras sendo necessárias células acessórias do estroma ou células semelhantes a osteoblastos.

- Calcitonina: é o principal hormônio que age diretamente sobre os osteoclastos causando uma importante contração que inibe a atividade osteoclástica. O efeito resultante da calcitonina é promover ganho mineral.

- Esteróides sexuais: o estradiol causa uma inibição dose-dependente da reabsorção óssea, talvez por reduzir a síntese local de citocinas como as interleucinas ou por estimular a secreção de fatores de crescimento ósseo como o fator de crescimento de transformação β (TGF- β). Essas alterações provavelmente desempenham um papel importante na mediação da redução da massa óssea que acompanha a deficiência de estrogênio.

As condições ambientais podem afetar a atividade osteoclástica. A acidose estimula a liberação de mineral do osso e a hipercalcúria, um pH reduzido do meio estimula diretamente a reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Tal informação

tem implicação importante para a inflamação, pois a reabsorção óssea pode ser aumentada numa doença inflamatória, simplesmente porque o ambiente local geralmente tem um pH reduzido (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

A descoberta do chamado fator de ativação de osteoclastos (OAF) incitou um grande interesse nos fatores locais e citocinas que regulam a função dos osteoclastos. As citocinas atuam como mensageiros intercelulares e são derivadas das células mononucleadas da medula óssea ou diretamente de células ósseas; podem estar incorporadas à matriz óssea e serem liberadas em uma forma biologicamente ativa durante a reabsorção. A interleucina-1 (IL-1) é a mais potente das interleucinas que atua na estimulação da reabsorção óssea, tendo sua ação mediada pelos osteoblastos. Outras citocinas, como os fatores de necrose tumoral (TNFs), o fator colono estimulante (CSFs), o fator inibidor de leucemia (LIF) e as prostaglandinas também estimulam a reabsorção óssea. Com relação a inibição local da reabsorção óssea, três fatores foram descritos: o fator de crescimento de transformação β (TGF- β) que estimula o crescimento de células ósseas e inibe a formação de células precursoras do osteoclasto; o interferon- γ e o antagonista receptor da interleucina-1 que é o mais recente fator encontrado para inibição da ação osteoclástica (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Tentando diminuir a incidência ou modular os processos de reabsorção nos casos de reimplante tardio, muitas pesquisas foram desenvolvidas, e uma série de procedimentos foram propostos. Neste sentido, pode-se destacar os cuidados com o dente antes do reimplante, principalmente com relação a necessidade de remoção de ligamento periodontal necrótico e também com a possibilidade de imersão, antes

do reimplante, em substâncias químicas que de alguma maneira pudessem favorecer o reparo.

2.3 Tratamento da superfície radicular

Com a finalidade de favorecer o reparo do ligamento periodontal e diminuir a incidência das reabsorções nos casos de reimplante, especialmente para casos com períodos extra-alveolares prolongados e com o dente mantido seco diversos tratamentos da superfície radicular já foram propostos.

2.3.1 Remoção do ligamento necrótico

Neste sentido, Lindskog et al. (1985) avaliaram os efeitos da remoção química do ligamento periodontal antes do reimplante. Os autores puderam observar que este procedimento aumenta a resistência do cimento à reabsorção. Tal fato é explicado pela ausência de remanescentes necróticos da membrana periodontal que atuariam como estimuladores do processo reabsortivo. Os autores sugerem para casos de extenso dano ao ligamento periodontal antes do reimplante, que este seja removido, resultando possivelmente em uma menor velocidade no processo de reabsorção substitutiva pela ausência de estímulos gerados pelas células necróticas do ligamento.

2.3.2 Fluoreto de sódio

A utilização do fluoreto de sódio para tratamento da superfície radicular antes do reimplante foi inicialmente investigada por Shulman, Kalis e Goldhaber (1968), que realizaram experimento em macacos no qual imergiam dentes extraídos e mantidos secos em solução de fluoreto de sódio antes do reimplante. Os resultados observados sugeriram que esta substância poderia favorecer a manobra de reimplante tardio, pois uma reabsorção menos intensa foi observada.

Shulman, Gedalia e Feingold (1973), realizaram um experimento em macacos, no qual constataram que a imersão do dente avulsionado em uma solução de fluoreto de sódio fosfato acidulado 2% com pH 5,5 por 20 minutos antes do reimplante eleva a resistência do dente perante a reabsorção. Os autores enfatizam que a imersão no fluoreto não é recomendada para dentes reimplantados com período extra-alveolar inferior a 1 hora, pois a solução concentrada de fluoreto poderia favorecer a necrose do ligamento periodontal, fato que prejudicaria o reparo normal deste tecido.

Barbakow, Austin e Cleaton-Jones (1978), pesquisaram em macacos os efeitos da imersão do dente extraído em solução a 2% de fluoreto de sódio acidulado (pH 5,5) por 30 minutos antes do reimplante. Para este experimento foi adotado um período extra-alveolar de 30 minutos. Os autores observaram que esta manobra não reduziu a incidência de reabsorção radicular e anquilose.

Barbakow et al. (1981) realizaram outro experimento onde adotaram períodos extra-alveolares de 30 e 120 minutos e imergiram o dente em solução fisiológica,

solução acidulada de fluoreto e solução neutra de fluoreto por 2 minutos antes do reimplante. Os autores afirmam que para esta condição experimental não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto a incidência das reabsorções.

Um estudo clínico em humanos foi conduzido por Mahajan e Shidu (1981) onde dentes avulsionados eram mantidos em solução de fluoreto de sódio a 2% por 4 minutos antes de serem reimplantados. O ligamento periodontal foi removido antes do reimplante em alguns dentes, este procedimento mostrou clínica e radiograficamente melhores resultados em relação a não remoção do ligamento periodontal antes do reimplante.

Resultados semelhantes foram observados por Okamoto et al. (1999) que avaliaram em ratos a importância da remoção do ligamento periodontal de dentes extraídos e mantidos em solução de fluoreto de sódio antes do reimplante. Os autores observaram que quando o ligamento periodontal necrótico é mantido uma reabsorção radicular mais acentuada é observada levando a uma perda quase total do dente reimplantado.

2.3.3 Fluoreto estanhoso

Bjorvatn e Massler (1971) compararam em ratos os efeitos da imersão de dentes extraídos e mantidos secos por períodos de 30 minutos, em soluções de fluoreto de sódio a 2%, fluoreto estanhoso a 1% e fluoreto estanhoso a 10%. Os autores observaram que os melhores resultados quanto ao reparo do ligamento

periodontal e incidência de reabsorções ocorreu quando os dentes foram imersos em solução de fluoreto estanhoso a 1% por 5 minutos antes do reimplante.

A proposta de utilização do fluoreto estanhoso voltou a ser investigada por Bjorvatn, Selvig e Klinge (1989), que avaliaram em cães o efeito da aplicação de fluoreto estanhoso, tetraciclina ou ambos na superfície radicular antes do reimplante. Os autores observaram após 4 semanas que os dentes tratados com fluoreto estanhoso e com o fluoreto mais a tetraciclina apresentavam incidência de reabsorção de apenas 1%. Os autores observaram também a presença de reação inflamatória sem reabsorção, mais marcante nos dentes tratados apenas com o fluoreto estanhoso, já para os dentes tratados também com a tetraciclina essa incidência de reação inflamatória foi menor.

Nesta mesma linha de pesquisa, Selvig, Bjovartn e Claffey (1990) pesquisando em cães relatam resultados favoráveis quanto à incidência de anquilose e reabsorção inflamatória quando dentes que foram extraídos e mantidos secos por 45 minutos foram imersos por 5 minutos em solução de fluoreto estanhoso 1% e 5 minutos em tetraciclina 1% antes do reimplante. Os autores afirmam que uma reação inflamatória persistente é observada no ligamento periodontal, entretanto sem ocorrência de reabsorção radicular.

Para testar a hipótese de que uma solução menos concentrada de fluoreto estanhoso poderia apresentar benefícios com relação à incidência de reabsorções, porém ocasionando menor reação inflamatória, Selvig et al. (1992) realizaram pesquisa semelhante em cães na qual diminuíram a concentração do fluoreto estanhoso para 0,1%. As análises histológicas foram realizadas após um período de 4 semanas de reparo. Os autores observaram reparo normal em 85% da superfície radicular para o grupo experimental, em contraste com o grupo controle com 33% de

reparo normal. Os autores observaram que a redução na concentração do fluoreto estanhoso resulta em menor reação inflamatória persistente, ocorrendo, entretanto, uma queda na capacidade de prevenir a reabsorção inflamatória e a anquilose.

2.3.4 Ácido cítrico

Klinge, Nilvéus e Selvig (1984) realizaram um experimento em cães para testar a hipótese de que a desmineralização da superfície radicular com ácido cítrico poderia favorecer a regeneração periodontal após o reimplante. Ao final do experimento os autores concluíram que a frequência de reações adversas após o reimplante tardio pode ser diminuída pela remoção de restos teciduais necróticos da superfície radicular.

Com o mesmo objetivo de avaliar o efeito da desmineralização superficial no reparo após reimplante, Zervas, Lambrianidis e Karabouta-Vulgaropoulou (1991) realizaram estudo em cães no qual raspavam e desmineralizavam as raízes com ácido cítrico antes de reimplantá-las. Foram estabelecidos períodos de observação de 3, 14 e 56 dias. Os autores concluem que a desmineralização superficial apresenta um efeito inicial positivo, porém, no período de 56 dias foram observados intensos processos de reabsorção inflamatória e substitutiva.

Resultados semelhantes foram observados por Skoglund (1991) que avaliou em cães o tratamento tópico da superfície radicular com ácido cítrico em dentes mantidos secos por 2 horas antes do reimplante. Ao final do experimento o autor

concluiu que o tratamento com ácido cítrico não preveniu a anquilose e a reabsorção radicular progressiva.

2.3.5 Dexametasona

A utilização da dexametasona antes do reimplante foi investigada por Sae-Lim, Wang e Trope (1998) que avaliou histologicamente o efeito desta droga na incidência de reabsorções em dentes de cães armazenados por 48 horas e reimplantados. Para o grupo experimental os dentes eram mantidos por 48 horas em um recipiente contendo Viaspan e dexametasona (16 µg/ml) antes de serem reimplantados. Os autores observaram que após um período de 12 semanas a dexametasona foi capaz de favorecer o reparo e diminuir a incidência de reabsorções.

Seguindo esta linha, Keum et al. (2003) avaliaram o efeito da dexametasona em dentes de rato antes do reimplante tardio. Os dentes do grupo experimental foram desmineralizados em ácido cítrico por 1 minuto e em seguida permaneciam em uma solução 1000nM de dexametasona por 3 minutos antes de serem reimplantados. Os animais foram sacrificados após 3 semanas. O estudo histológico mostrou que os dentes tratados com o corticóide apresentavam um grau de reabsorção progressiva menor quando comparado com o grupo controle, no qual o dente permaneceu apenas seco antes de ser reimplantado.

2.3.6 Minociclina

A minociclina é um derivado da tetraciclina que demonstra atividade antibacteriana e antiinflamatória que poderia retardar processos reabsortivos decorrentes de injúrias traumáticas graves (BRYSON et al., 2003).

Bryson et al. (2003) pesquisaram em cães o efeito da minociclina em dentes que após a realização de tratamento endodôntico foram extraídos, mantidos secos por 1 hora, tiveram a superfície radicular recoberta com minociclina e reimplantados. A análise histológica após 4 meses de reparo revelou não haver diferença significativa entre os grupos com e sem o tratamento prévio com a minociclina. Por fim, os autores afirmam que o uso de minociclina não é recomendado para prevenção e atenuação de reabsorção radicular externa decorrente de avulsão em um modelo de trauma em cães.

No mesmo ano, Ma e Sae-Lin (2003) realizaram uma pesquisa em macacos na qual avaliaram histologicamente o efeito da aplicação tópica da minociclina na reabsorção substitutiva. Os dentes do grupo experimental permaneceram secos por 1 hora e foram imersos em 1,0 ml de minociclina na concentração de 50 mg/ml por 5 minutos antes do reimplante. A avaliação após 12 semanas revelou, em relação ao grupo controle negativo (reimplante imediato), que tanto o grupo experimental quanto o controle positivo (dente seco por 1 hora antes do reimplante) apresentaram resultados significativamente piores quanto a cicatrização do ligamento periodontal e incidência de reabsorções substitutivas e inflamatórias. Os autores relatam ainda que entre o controle positivo e o grupo experimental não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

2.3.7 Derivado da matriz de esmalte (EMDOGAIN®)

Recentemente foi proposta a utilização de um derivado da matriz de esmalte (EMDOGAIN®) para prevenção e controle da anquilose e reabsorção substitutiva para casos de reimplante. Esse complexo protéico favorece o crescimento de cementoblastos na superfície desnuda da raiz através do aumento da migração e diferenciação de células progenitoras (HAMMARSTRÖM, 1997).

Os primeiros relatos da utilização do Emdogain® no traumatismo dental cabem a Kenny et al. (2000) que relataram a utilização desta droga num caso de reimplante em um paciente de 14 anos. Neste caso, o dente avulsionado permaneceu 1 hora a seco e meia hora em Solução Salina Balanceada de Hank, com período extra-alveolar total de 1 hora e meia. Antes de ser reimplantado o ligamento periodontal foi removido e tanto raiz quanto alvéolo receberam o Emdogain®. Após 3 meses o controle demonstrava ausência de sinais de anquilose ou reabsorção.

Filippi, Pohl e Von Arx (2001) estudaram em dentes humanos acometidos por anquilose, a capacidade do Emdogain® em atuar na neoformação de estruturas normais de sustentação. Os pesquisadores extraíram 11 dentes traumatizados de crianças e adolescentes, removeram a anquilose dos mesmos e aplicavam o Emdogain® sobre a superfície da raiz e no alvéolo, quando então o dente era reimplantado e contido por 10-14 dias. De acordo com os autores, após um período de 6.3 meses não foi observada a recorrência de anquilose.

Iqbal e Bamaas (2001) realizaram um estudo em cães, no qual extraíam e mantinham os dentes secos por períodos de 15, 30 e 60 minutos. Antes do

reimplante era aplicado Emdogain® na superfície radicular; o dente homólogo era tratado da mesma maneira, porém sem receber a droga. Os autores observaram que os dentes tratados com Emdogain® apresentaram significativa melhora na cicatrização do ligamento periodontal, com menor incidência de reabsorção.

Novamente Fillipi, Pohl e Von Arx (2002), investigaram em humanos a eficiência do reimplante intencional com utilização de Emdogain®, no tratamento de dentes traumatizados com presença de anquilose em estágios iniciais ou em áreas circunscritas. Os autores observaram resultados favoráveis quanto à prevenção ou atraso na recorrência de anquilose para casos de traumatismos leves ou moderados. Porém, para os casos de danos severos ao ligamento (avulsão com períodos extra-orais prolongados) a recorrência de anquilose ainda foi observada.

Araújo et al. (2003) investigaram em cães a capacidade do Emdogain® evitar a anquilose em dentes reimplantados após período extra-alveolar de 60 minutos, com o dente mantido seco. Após um período de 6 meses, a avaliação histológica revelou que o Emdogain® não interfere favoravelmente no processo de cicatrização do ligamento periodontal.

Lam e Sae-Lin (2004) realizaram um estudo em macacos para avaliar histologicamente o efeito do gel de Emdogain® na reparação periodontal de dentes submetidos a reimplante tardio (período extra-alveolar de 1 hora com armazenamento a seco). O reparo periodontal foi avaliado através de análise histomorfométrica após um período de 16 semanas. Os pesquisadores observaram que o gel de Emdogain® não pareceu reduzir significativamente a reabsorção substitutiva.

Molina e Brentegani (2005) estudaram em ratos a atuação do Emdogain® no reparo do ligamento periodontal após o reimplante. De acordo com os autores, a

utilização do Emdogain® não favoreceu significativamente o reparo do ligamento periodontal.

Schjott e Andreasen (2005) publicaram uma pesquisa desenvolvida em humanos, onde a eficácia do Emdogain® foi testada em duas situações diferentes. Na primeira foi utilizado em 7 pacientes com 16 dentes avulsionados e tempos de armazenamento extra-oral variados (entre 25 e 270 minutos), nestes casos os dentes eram tratados endodonticamente “na mão” e antes do reimplante a raiz e o alvéolo recebiam o Emdogain®. Todos os dentes demonstraram subsequente anquilose, diagnosticada através do teste de percussão. Na segunda situação, o Emdogain® foi avaliado em 11 dentes já acometidos por anquilose decorrente de prévio reimplante. Estes dentes foram extraídos, os focos de anquilose removidos e tanto raiz quanto alvéolo foram tratados com Emdogain® antes do reimplante. Após 6 meses todos os dentes apresentavam recorrência de anquilose, fato que levou os pesquisadores à conclusão de que o Emdogain® não é capaz de prevenir ou curar a anquilose.

Finalmente, Poi et al. (2007) pesquisaram em ratos a influência do tratamento da superfície radicular com Emdogain® e fluoreto de sódio antes do reimplante, no reparo do ligamento periodontal. Os autores observaram que tanto o Emdogain® quanto o fluoreto de sódio não são capazes de prevenir a reabsorção radicular em dentes de ratos reimplantados tardiamente.

2.3.8 Alendronato de sódio

Os primeiros relatos da utilização do alendronato de sódio antes do reimplante são atribuídos a Levin et al. (2001) que pesquisaram em cães o efeito da imersão do dente em solução de alendronato antes do reimplante. Os dentes foram extraídos e permaneceram secos por períodos de 40 ou 60 minutos. Para o grupo experimental as raízes foram imersas por 5 minutos em solução contendo alendronato de sódio 1mM e solução salina balanceada de Hank antes do reimplante. Os cães foram mortos após período de 4 meses, e as raízes analisadas através de histologia. Os pesquisadores observaram que as raízes imersas em alendronato apresentaram resultados favoráveis, estatisticamente significantes, quanto ao reparo do ligamento periodontal, em comparação ao grupo controle. Foi observada também uma menor perda de massa radicular por reabsorção no grupo experimental.

A utilização do alendronato também foi investigada por Shibata et al. (2004) que avaliaram em ratos o efeito do pré-tratamento das raízes antes do reimplante. Para o grupo experimental, após a extração, os dentes permaneceram por 5 minutos em solução salina contendo alendronato de sódio 1mM antes de serem reimplantados, já no grupo controle, os dentes permaneceram pelo mesmo período apenas na solução salina. Os animais foram mortos após períodos de 7, 14 e 21 dias, e a análise através de tomografia computadorizada e cortes histológicos permitiu aos autores concluir que o pré-tratamento das raízes com alendronato inibiu a formação de tecido mineralizado anormal e resultou em melhor reparo no ligamento periodontal.

Recentemente, uma nova pesquisa foi realizada por Lustosa-Pereira et al. (2006) para verificar a atuação do alendronato de sódio como substância para uso tópico antes do reimplante tardio. Para tal, foram extraídos 54 incisivos centrais de ratos que receberam 3 diferentes tratamentos (G1, G2 e G3): os dentes do grupo 1 permaneceram 15 minutos fora do alvéolo e foram reimplantados; para os grupos 2 e 3, períodos extra-alveolar de 30 e 60 minutos respectivamente foram adotados. Nestes grupos os dentes permaneceram em uma solução de alendronato 3,2 mg/L por 10 minutos antes de serem reimplantados. O hidróxido de cálcio foi utilizado como medicação intracanal nos 3 grupos. Os animais foram mortos após 15, 60 e 90 dias do reimplante. Os autores concluíram que o alendronato de sódio foi capaz de reduzir a incidência de reabsorção radicular, porém não interfere na incidência de anquilose. Os autores afirmam ainda que não foram observadas diferenças significativas quando comparados os diferentes períodos de permanência extra-alveolar.

Em continuidade ao estudo de 2004, Komatsu et al. (2007) avaliaram os efeitos de longo prazo da imersão dos dentes em solução de alendronato antes do reimplante. Neste sentido, trabalhando em ratos, realizaram experimento semelhante ao conduzido por Shibata et al. (2004) onde foi ampliado o período de análise para 60 e 120 dias. Os autores observaram que a frequência de reabsorção das raízes foi significativamente menor nos dentes imersos em alendronato, não havendo diferenças na incidência de anquilose e mineralização pulpar. Observaram ainda que o alendronato estimula a formação de osso ao redor do dente reimplantado.

Considerando que o alendronato de sódio, droga pertencente a classe dos bifosfonatos, é objeto principal deste trabalho, uma ênfase na revisão pertinente a este medicamento é de fundamental importância.

2.4 Bifosfonatos

A classe de drogas dos bifosfonatos é baseada na cadeia fosfato-oxigênio-fosfato (P-O-P) do pirofosfato que é um metabólito humano natural de ampla distribuição que apresenta forte afinidade por tecido ósseo (HODSMAN; ADACHI; OLSZYNSKI, 1996).

A troca do oxigênio por um átomo de carbono (P-C-P) produz um grupo de drogas seletivas para osso que não podem ser metabolizadas pelas enzimas que normalmente metabolizam o pirofosfato. A alteração na estrutura da cadeia lateral de carbono na molécula básica dos bifosfonatos dá aos compostos dessa família um aumento no potencial de afetar o metabolismo ósseo. O etidronato sódico é a droga protótipo nessa classe e tem sido usada no Canadá a mais de 20 anos no tratamento de uma outra doença que compromete o metabolismo ósseo, a doença de Paget (HODSMAN; ADACHI; OLSZYNSKI, 1996).

Após administração, os bifosfonatos são rapidamente removidos da corrente sanguínea, sendo eliminados na urina ou absorvidos pelo esqueleto. Entretanto, essa absorção não é uniforme ao longo dos ossos, sendo concentrada em áreas de elevada atividade fisiológica, onde o metabolismo ósseo é maior. O bifosfonato é concentrado de forma seletiva em locais de reabsorção óssea (SATO et al., 1991).

Após ser absorvido, o bifosfonato liga-se a hidroxiapatita do osso exposto em locais de reabsorção óssea. Sua atividade é iniciada quando o osteoclasto gera um pH ácido e dissolve a matriz inorgânica liberando o bifosfonato ligado à hidroxiapatita (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

Com relação ao mecanismo de ação dos bifosfonatos, inicialmente acreditava-se que sua ligação à hidroxiapatita resultava em uma diminuição de solubilidade. Outros mecanismos propostos incluem a citotoxicidade ou injúria metabólica em osteoclastos maduros; inibição da ligação do osteoclasto ao osso; inibição da diferenciação e recrutamento ou ainda interferências nas propriedades estruturais dos osteoclastos necessárias para a reabsorção óssea (SATO et al. 1991).

Para elucidar o mecanismo de ação dos bifosfonatos, Sato et al. (1991) realizaram um estudo em ratos utilizando um bisfosfonato radioativo denominado [^3H] alendronato, verificando sua localização nos tecidos ósseos e efeitos na ultraestrutura dos osteoclastos. Os autores sugerem então um mecanismo de atuação que tem início com a liberação do alendronato ligado à hidroxiapatita, motivado pela acidificação produzida durante o início do processo de reabsorção. O alendronato liberado deve atingir uma concentração entre 0,1 e 1,0mM na região da zona clara; nesta concentração o alendronato é capaz de aumentar a permeabilidade iônica da borda rugosa dos osteoclastos, a reabsorção cessa e as células perdem a borda rugosa.

O mecanismo de inibição dos osteoclastos pelos bifosfonatos é ainda discutível, podendo estar relacionado com alterações na borda rugosa do osteoclasto ou ainda, como recentemente proposto, a inibição da atividade osteoclástica poderia ser um efeito secundário de uma ação no osteoblasto, levando à produção de um inibidor do recrutamento e da sobrevivência de osteoclastos (FOGELMAN, 1996).

A segunda e terceira gerações dos bifosfonatos são mais potentes que o etidronato sódico e apresentam uma grande janela terapêutica entre a inibição da reabsorção óssea e inibição da mineralização (SANKARAN, 1996).

O alendronato sódico é um dos mais potentes amino-bifosfonatos, que seletivamente inibe a ação do osteoclasto na reabsorção óssea durante o ciclo de remodelação. O alendronato não impede a mineralização óssea em doses terapêuticas (ADAMI et al., 1995).

Esta medicação é quimicamente descrita como: 4-amino-1-hidroxibutilideno-1,1-ácido bifosfônico. 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 bifosfonatos utilizados clinicamente e que não apresentam nitrogênio (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

O alendronato depositado nos locais de remodelação óssea quando não atua diretamente no osteoclasto é incorporado na matriz do tecido ósseo neoformado. Esse alendronato incorporado à matriz óssea não é farmacologicamente ativo até o momento em que é exposto pelo processo de remodelação óssea, podendo interagir novamente com os osteoclastos (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

Pelo fato do alendronato ser incorporado ao osso e sua liberação estar relacionada com o índice de remodelação óssea, o alendronato, assim como outros bifosfonatos, apresentam uma meia-vida extremamente longa. Com base em estudos da presença de alendronato eliminados na urina, a meia-vida do alendronato no osso é de aproximadamente 200 dias em ratos, mais de 3 anos em cães e chegando a mais de 10 anos em humanos (KANIS et al., 1995).

No âmbito da Medicina, o alendronato é indicado como medicação oral para tratamento e prevenção da osteoporose pós-menopausa, tratamento da osteoporose induzida por corticosteróides e doença de Paget, sendo sua utilização aprovada em mais de 80 países (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

Diversas pesquisas clínicas (HARRIS et al., 1993; ADAMI et al., 1994; LIBERMAN et al., 1995; ADAMI et al., 1995; CHESNUT et al., 1995; SAAG et al., 1998) comprovam a eficiência do alendronato no tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo ósseo. A utilização do alendronato resulta em um aumento na densidade mineral óssea, que é fator determinante na diminuição da incidência de fraturas ósseas associadas a essas patologias.

Já no âmbito da Odontologia, são encontrados relatos da utilização dos bifosfonatos na ortodontia, periodontia e mais recentemente no traumatismo dental.

Com relação à utilização na ortodontia, estudos de Adachi et al. (1994), Igarashi et al. (1994) e Igarashi et al. (1996) demonstraram que a utilização dos bifosfonatos pode influenciar a movimentação dental e a incidência de reabsorção óssea e radicular.

Neste sentido, Adachi et al. (1994) demonstraram que o uso tópico de risedronato causa uma significativa redução na movimentação dental após a aplicação da força ortodôntica. Os autores puderam observar ainda que o risedronato não alterou o crescimento geral e também o crescimento longitudinal da tíbia dos animais.

Já Igarashi et al. (1994) observaram histologicamente que a utilização sistêmica resulta em uma quantidade menor de osteoclastos na superfície óssea

alveolar e que tanto a reabsorção óssea quanto a reabsorção radicular foram inibidas, sendo os efeitos dependentes da dose.

Com relação a possibilidade de utilização na periodontia os bifosfonatos foram estudados no tratamento de periodontites induzidas em animais como ratos (SCHIMIDT; ROWE, 1987; SHOJI; HORIUCHI; SHINODA,1995), macacos (BRUNSVOLD et al., 1992; WEINREB et al., 1994) e cães (REDDY et al., 1995; O'UCHI et al., 1998). Nesses estudos os pesquisadores observaram que a administração sistêmica (oral, subcutânea e intravenosa) de bifosfonatos reduz a perda óssea relacionada à doença periodontal.

A utilização dos bifosfonatos antes da reposição de retalhos periodontais foi investigada em cães por Yaffe et al. (1995) e Kaynak et al. (2000) que observaram que a utilização tópica deste medicamento pode favorecer significativamente a redução da reabsorção óssea alveolar.

Kaynak et al. (2000) relatam ainda, que em relação ao número de osteoclastos não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, porém alterações importantes como perda da borda rugosa e morfologia arredondada foram relatadas no grupo onde foi utilizado o alendronato.

Na área da implantodontia, Meraw, Reeve e Wollan (1999) avaliaram em cães os efeitos da aplicação tópica de alendronato sódico na regeneração óssea guiada ao redor de implantes. Avaliando seus resultados, os autores puderam concluir que o alendronato aumenta a formação óssea inicial ao redor dos implantes. Em outro experimento, Meraw e Reeve (1999) avaliaram em cães os efeitos do alendronato em áreas de regeneração óssea ao redor de implantes. Foram utilizados implantes que receberam alendronato em sua superfície, comparados com implantes

convencionais. Os autores constataram que a aplicação local do alendronato resultou em aumento significativo da quantidade de osso formada ao redor dos implantes.

A perspectiva de utilização dos bifosfonatos no traumatismo dental foi investigada inicialmente por Liewehr et al. (1995) que realizaram um estudo *in vitro* para investigar o efeito dos bifosfonatos na reabsorção dentinária. Os autores utilizaram osteoclastos obtidos através de cultura de células extraídas de tíbias de frangos pré-natais, que foram cultivadas em fatias de dentina humana. As fatias de dentina eram mantidas nas soluções de bifosfonato ou soro fisiológico (controle) por um período de 48 horas antes de serem utilizadas. Observando as fatias de dentina através de microscopia óptica e eletrônica, os autores constataram que a utilização dos bifosfonatos reduziu significativamente a reabsorção dentinária. Os autores sugerem então, que os bifosfonatos podem ser úteis na prevenção ou controle da reabsorção substitutiva em dentes avulsionados.

Kum et al. (2003) constataram *in vitro* que a solução de alendronato de sódio na concentração de 10^{-5} M promove a inibição da diferenciação de osteoclastos induzidos por *Porphyromonas gingivalis*. Os pesquisadores relatam também que não foi observado efeito citotóxico do alendronato nesta concentração.

Como visto anteriormente a utilização do alendronato de sódio para tratamento do dente antes do reimplante foi inicialmente estudada por Levin et al. (2001) e posteriormente por Shibata et al. (2004), Lustosa-Pereira et al. (2006) e Komatsu et al. (2007). Em todos os estudos foram relatadas perspectivas favoráveis quanto a menor incidência dos processos de reabsorção após o reimplante.

Atenção especial deve ser dada para a concentração da solução de alendronato de sódio a ser utilizada. Neste sentido, Moreira et al. (2005) avaliaram a

biocompatibilidade de uma pasta de alendronato de sódio (2,0 mg/ml) em cultura de células endoteliais e tecido subcutâneo de ratos. Os autores observaram que a pasta de alendronato de sódio e polietilenoglicol na concentração proposta é altamente citotóxica, tanto em cultura de células quanto em contato com tecido conjuntivo.

Neste mesmo rumo, Correia, Caldeira e Marques (2006) avaliaram em cultura de células de ligamento periodontal a biocompatibilidade de soluções de alendronato de sódio nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} , e 10^{-7} M. Os pesquisadores concluíram que em concentrações superiores a 10^{-6} M o alendronato é citotóxico.

Mesmo com as perspectivas interessantes para a utilização deste medicamento para casos de reimplante tardio, a literatura ainda apresenta poucos estudos quanto à utilização do alendronato de sódio no traumatismo dental.

Nenhum estudo foi encontrado quanto a interação do alendronato de sódio e os tecidos dentais quando este é imerso em solução antes do reimplante. É desconhecida a capacidade de adsorção de alendronato de sódio pelos tecidos dentais.

O conhecimento desta interação pode ajudar no estabelecimento de um protocolo quanto a utilização de uma concentração ideal e tempo de imersão necessário, para que um efeito ótimo possa ser alcançado, quando o alendronato de sódio for utilizado como medicação para tratamento da superfície radicular antes do reimplante, especialmente em casos de reimplante tardio.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi investigar, através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, a capacidade de adsorção de alendronato de sódio pelos tecidos dentais quando imersos em duas soluções deste medicamento com diferentes concentrações e diferentes tempos experimentais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- 06 dentes unirradiculares superiores humanos com rizogênese completa extraídos pertencentes ao Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo;
- Aparelho de ultrassom modelo Vários 350 (NSK – Japão);
- Gaze (Cremer – Brasil);
- Hipoclorito de Sódio a 1% (Fórmula & Ação – Brasil);
- Alendronato sódico (Fórmula & Ação – Brasil);
- Solução fisiológica (Aster produtos médicos LTDA – Brasil);
- Citrato de sódio tribásico biidratado (Carlo Erba reagents – Itália);
- Carbonato de sódio anidro (Carlo Erba reagents – Itália);
- Derivatizante 9-fluorenilmetil cloroformato (Fmoc) (Sigma - Alemanha);
- Diclorometano (Merck – USA)
- Água ultrapura - sistemas MilliDI® e Simplicity® (Millipore - Brasil);
- Detergente Extran Alcalino® (Merck - USA);
- Nitrogênio e Hélio grau de pureza 99,99% (Air Products Gases Industriais LTDA - Brasil);
- Resina epóxica – Araldite® Profissional 10 min. (Brascola Ltda. – Brasil);
- Tubos de polipropileno tipo eppendorf MCT-200C (Axygen – USA);
- Agitador Vortex Genie Z® (Scientific Ind. – USA);
- Ponteiras para micropipetas de 1µl a 200µl T-200Y (Axygen – USA);

- Ponteiras para micropipetas de 1000 μ l T-1000B (Axygen – USA);
- Micropipetas Pipetman[®] P1000 μ l, P200 μ l, P40 μ l, P10 μ l (Gilson – França);
- Microvial (Shimadzu – Japão);
- Tubos de ensaio 15 ml (Laborglas – Brasil);
- Balões aferidos de 5, 10, 50 e 100ml (Laborglas – Brasil);
- Balança analítica modelo AX 120 (Shimadzu – Japão);
- Centrífuga modelo himac CF7D (Hitashi – Japão);
- Agitador Mecânico com Estufa (Tecnal LTDA – Brasil);
- Cromatógrafo Líquido (Shimadzu - Japão);
- Coluna analítica Symmetry[®] C-18 (Waters Assoc. – USA)
- Pré-coluna C-18 (Waters Assoc. - USA).
- Registrador-integrador Chromatopac CR-6A (Shimadzu - Japão).

4.2- Métodos

Foram utilizados 06 incisivos centrais superiores humanos com rizogênese completa, extraídos por razões diversas, pertencentes ao Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Constatada a ausência de cárie realizou-se a raspagem coronária e radicular com auxílio de ultrassom, em seguida os dentes foram esterilizados em autoclave e mantidos em soro fisiológico.

4.2.1- Preparo dos dentes

O preparo dos dentes iniciou pela secagem com gaze e pesagem, por meio de balança analítica, de cada dente. Em seguida, realizou-se o selamento do forame com araldite[®], aguardando-se 1 hora em estufa a 36°C para a completa secagem do impermeabilizante.

Os dentes foram mantidos por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% para que possíveis remanescentes do ligamento periodontal fossem removidos e em seguida lavados por 5 minutos com água destilada. Findo este procedimento, os dentes estavam prontos para serem imersos nas soluções de alendronato de sódio.

4.2.2 Preparo das soluções de alendronato de sódio

A solução de alendronato de sódio foi preparada momentos antes do início do experimento. Foram preparadas duas soluções de alendronato de sódio em citrato de sódio 1M com concentrações de 3,2 µg/ml e 32,0 µg/ml. Inicialmente preparou-se a solução mais concentrada (32,0 µg/ml) através da diluição de 1,6 mg de alendronato de sódio em 50,0 ml de citrato de sódio 1M; para a obtenção da concentração de 3,2 µg/ml diluiu-se 1,0 ml da solução mais concentrada em 9,0 ml de citrato de sódio 1M.

4.2.3 Obtenção das amostras

Para acondicionar os dentes e as soluções de alendronato foram utilizados frascos plásticos com tampa e capacidade para 4,0 ml

De maneira aleatória os dentes foram divididos em dois grupos. Cada grupo foi submerso em uma solução de alendronato com concentração específica. Os dentes do grupo 1 (G1, n=3) foram submersos em solução de alendronato de sódio na concentração de 3,2 µg/ml enquanto que os dentes do grupo 2 (G2, n=3) foram submersos na solução com concentração de 32,0 µg/ml.

Cada frasco recebeu 3,0 ml da solução de alendronato de sódio de acordo com as concentrações estabelecidas; na sequência foi depositado o dente e o frasco foi fechado.

Desta maneira cada grupo era composto por quatro frascos, dos quais três continham o dente submerso na solução de alendronato de sódio e um que continha apenas a solução, servindo este como controle (Figura 4.1).

Figura 4.1- Grupos experimentais

Os frascos foram acondicionados em um agitador mecânico que executa movimentos circulares mantendo um ritmo de 80rpm fornecendo constante agitação para as soluções.

Foram estabelecidos três tempos experimentais: 10, 15 e 30 minutos contados a partir da imersão do dente nas soluções de alendronato. Nestes tempos denominados T1, T2 e T3 cada frasco era aberto e duas alíquotas de 200 µl de seu conteúdo eram retirados com auxílio de uma micropipeta. As alíquotas eram acondicionadas em dois tubos *ependorf* previamente identificados. As amostras foram retiradas em duplicata para permitir uma maior confiabilidade na análise (Figura 4.2).

Figura 4.2- Obtenção de amostra

4.2.4 Análise das amostras

A quantificação do alendronato de sódio foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-F, método que foi validado no Laboratório de Farmacologia Terapêutica FBF/FCF-USP. A validação do método analítico foi efetuada após desenvolvimento, otimização e adaptações do procedimento às condições de nossos laboratórios com determinação da linearidade, sensibilidade, e exatidão da técnica empregada, bem como a determinação da precisão intra e inter dias. Foram desenvolvidas curvas de calibração para o fármaco a partir da adição de solução-padrão estoque (1mg/ml), a alíquotas de citrato de sódio 0,2M livre do fármaco (branco), fornecendo concentrações na faixa compreendida entre 1,25 – 20,0 µg/ml.

Na validação do método, a realização das análises diárias através de cromatografia líquida de alta eficiência envolveram a preparação de curva de calibração (padrões em duplicata), controles de qualidade interno (triplicata). Adicionalmente, foi realizado o estudo de estabilidade de curta duração (bandeja/ tempo e condição de análise). Finalmente, foi executado o estudo da robustez do método analítico proposto.

Finalizada a validação, foi realizada a análise do alendronato nas amostras através da curva de calibração diária (5 pontos), e em três controles de qualidade interno (duplicatas).

4.2.4.1 padrões e reagentes

Utilizou-se como padrão de referência o alendronato de sódio, [Fórmula & Ação, São Paulo, Brasil]. O padrão de referência foi armazenado em recipiente com tampa, ao abrigo da luz e da umidade, em dessecador à temperatura ambiente (entre 21+/-1°C). Utilizou-se uma solução derivatizante 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC: C₁₅H₁₁ClO₂) SIGMA (Steinheim, Germany).

Foram utilizados os solventes e reagentes: citrato de sódio tribásico biidratado (Na₂C₆H₅O₇.2H₂O), carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) grau cromatográfico (Carlo Erba - Italy) nos procedimentos analíticos e análise quantitativa do fármaco.

Obteve-se água ultrapura através dos sistemas MilliDI[®] e Simplicity[®], da Millipore (São Paulo, Brasil), para a preparação da solução tampão para a fase móvel de cromatografia, para a limpeza da tubulação e coluna analítica, bem como para a regeneração do cromatógrafo líquido.

Lavou-se toda a vidraria, e demais materiais utilizados na extração e na cromatografia através da imersão em água corrente e detergente, Extran Alcalino[®] (Merck), seguida de imersão em solução ácida (ácido clorídrico 50%, v/v) durante 2 horas e posterior enxágüe com água corrente e destilada, quando, finalmente, procedeu-se a secagem a temperatura ambiente. Posteriormente realizou-se o controle de qualidade da vidraria, que, somente após a aprovação, foi colocada nas caixas/armários para uso. Previamente à análise, todo material foi lavado com o solvente empregado na extração das amostras.

O nitrogênio utilizado na evaporação do solvente dos extratos orgânicos, e o hélio destinado a desgaseificação da fase móvel da cromatografia apresentavam

grau de pureza 99,99% (procedência Air Products Gases Industriais LTDA, Brasil).

Na filtração do tampão e citrato de sódio empregou-se membrana Millipore tipo HA.

4.2.4.2 preparação de padrões e controles de qualidade

A solução estoque de padrão (em citrato de sódio) de alendronato foi preparada pela dissolução de quantidade apropriada do padrão, corretamente pesado, em citrato de sódio 0.2M, para obter uma concentração final de 1,0 mg/ml.

Para realização da análise são necessários procedimentos que compreendem a passagem de uma amostra denominada branco que contem todas as substâncias utilizadas menos o alendronato de sódio. Também é necessário o estabelecimento de uma curva de calibração que permite a conversão dos dados obtidos no cromatograma para valores de concentração na unidade de microgramas por mililitro.

Os padrões em citrato de sódio (calibradores) para a curva de calibração foram preparadas pela adição do volume apropriado de solução estoque ao citrato de sódio 0,2M (livre da droga) para obter concentrações finais equivalentes a 20,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de alendronato. Alíquotas de 500 μl dos estándares (calibradores), foram distribuídos para tubos de *ependorf* âmbar em caixas identificadas que foram armazenadas no freezer a -20°C até o momento do ensaio.

Com base nas características do alendronato, como a maioria dos bifosfonatos não apresenta propriedades cromóforas, é necessária a realização de uma reação de derivatização. Esta tem como objetivo conferir ao composto a

capacidade de absorver radiação ultravioleta ou de emitir fluorescência. Para esse experimento foi utilizado o 9-fluorenilmetil cloroformato. Esta reação pode ser observada na Figura 4.3.

Figura 4.3- Reação de derivatização do alendronato (a) com 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOc) (b), originando produto cromóforo (c).

A solução derivatizante 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOc: C₁₅H₁₁ClO₂), foi preparada pela dissolução de 6,0 mg do FMOc em 25,0 ml de acetonitrila e armazenado na geladeira (2-8°C) ao abrigo da luz.

4.2.4.3 instrumentação e condições cromatográficas

Cada amostra para ser analisada passou pelo procedimento descrito a seguir.

Em tubos de extração, foram adicionados 100 µl de carbonato de sódio 1M, pH 11,9 (preparado a partir da dissolução de 10,6 g em 100 ml de água ultrapura). Foram adicionados 200 µl de amostra (alendronato de sódio em citrato de sódio), esta mistura foi agitada no vórtex durante 10 segundos. Ao tubo foram adicionados 20 µl de FMOc (derivatizante), seguido de homogeneização no vórtex, durante 10 segundos, que em seguida foi mantido em repouso durante 20 minutos para completar a reação de derivatização.

Após a reação de derivatização, foi necessário extrair o excesso de reagente com lavagens de 1,0 ml de diclorometano por três vezes consecutivas. Em seguida foi adicionado 1,0 ml de diclorometano e amostras foram centrifugadas a 4°C em 3000 rpm durante 10 minutos. Finalmente volumes de 200 µL do sobrenadante foram aspirados e transferidos para os microvials. Nesse sobrenadante estava presente o alendronato de sódio. O diclorometano foi escolhido, frente a outros solventes orgânicos pouco polares, por permitir que a fase aquosa contendo o fármaco derivatizado permaneça superior, devido a sua menor densidade, facilitando assim a coleta. O restante foi desprezado no lixo químico para descarte.

Volumes de 5 µl foram injetados automaticamente no cromatógrafo líquido. Todo processo está resumido no Fluxograma 4.1

DETERMINAÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO

100µl de carbonato de sódio (1M)
+
200 µl de amostra
+
20 µl de FMOC (10%)

Vórtex 10 seg para homogeneização
Repouso 20 minutos (reação de derivatização)

Extração de excesso de reagente com 3
lavagens (1,0 ml de Diclorometano)

Adicionar 1,0 ml de Diclorometano

Centrifugar a 4°C em 3000 rpm por 10 min.

Aspirar 200µl do sobrenadante e
transferir para o microvials

Injetar 5,0µl no HPLC

Condições cromatográficas:

Cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10A AD VP; Coluna SUPELCOSIL LC18 250 x 4,6 mm; 5 µm; Temperatura ambiente; Fluxo: 0,5mL/min.

Detector UV SPD-10AVP, λ: 230nm; Autosampler SIL10A VP;

Fluxograma 4.1. Quantificação de alendronato através de CLAE-F.

Para a análise utilizou-se o cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão) (Figura 4.4) constituído por bomba LC-10 AD VP, equipado com um software Class VP, um injetor automático SIL10A VP (Figura 4.5) e detetor de fluorescência RF-10AXL. A coluna analítica utilizada foi a Symmetry C-18 (5,0 μ m, 4,6 mm x 250 mm) (Figura 4.6), adaptada a uma pré-coluna C18 (Waters Assoc., Milford, USA). A integração da área dos picos do alendronato foi realizada utilizando-se um registrador-integrador Chromatopac CR-6A, Shimadzu (Kyoto, Japão) (Figura 4.7).

Figura 4.4- Cromatógrafo SHIMADZU®

Figura 4.5- Injetor automático SIL 10 VP

Figura 4.6- Coluna analítica Symmetry® C-18

Figura 4.7- Registrador-integrador Chromatopac CR-6A

Utilizou-se uma fase móvel composta de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH=5,5) hidróxido de sódio 0,05M, citrato de sódio 0,1M e acetonitrila (50:50, v/v) sob vazão de 0,5 ml/min, em sistema isocrático de eluição, preparada no dia e desgazificada com hélio por 3 minutos.

O volume de injeção foi de 5,0 μ l e o efluente foi monitorado através de um detector de fluorescência RF 10 AXL, Shimadzu (Kyoto, Japão) no comprimento de onda de excitação de 260 nm e no comprimento de onda de emissão de 310 nm. Um tempo de corrida de 12 minutos foi requerido para garantir a seletividade da análise cromatográfica. Todas as análises foram realizadas a temperatura ambiente $21^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Ao término da corrida obtinha-se, em forma de gráfico, um registro preciso qualitativo e quantitativo dos componentes presentes na amostra, evidenciados pela formação de picos. Esse registro denominado cromatograma revela a concentração de alendronato presente em cada amostra, permitindo o estabelecimento da concentração de alendronato nas soluções controle e principalmente a concentração nos grupos experimentais onde o dente estava imerso no frasco.

Normalmente o pico de alendronato de sódio foi registrado após tempos de corrida entre 3,9 e 4,3 minutos. Um exemplo de cromatograma pode ser visualizado na figura 4.8.

Figura 4.8- Cromatograma Alendronato de sódio

No cromatograma são registrados qualitativamente e quantitativamente os componentes da amostra. Cada pico no cromatograma indica a presença de uma substância, cujo tempo de retenção é registrado. Ao término da corrida, para cada componente fica registrado o tempo de retenção e a área do pico correspondente. Na figura 4.8 as setas indicam o pico do alendronato de sódio e os registros de tempo de retenção e área do pico.

Ao final de todas as corridas obtivemos o registro da concentração de alendronato em cada amostra nas diferentes concentrações e tempos experimentais. Esses dados permitiram a análise da hipótese de ocorrer adsorção ou não do alendronato de sódio pelo dente quando imerso em solução deste medicamento.

5 RESULTADOS

Inicialmente estão expressos os dados referentes à curva que é necessária para a obtenção da equação que permite a conversão dos valores de área dos picos obtidos no cromatograma, para valores de concentração expressos em microgramas por mililitro.

Tabela 5.1- Dados da curva de calibração

	C1	C1	C2	C2
Área Obtida	1870.79	970	595.13	357.5
Área Padrão	1720.79	820	445.13	207.5
Concentração	20.0	10.0	5.0	2.5
Razão área	1720.79	820.00	445.13	207.50
Fator	0.01	0.01	0.01	0.01

Figura 5.1- Curva de calibração

A equação obtida foi $y = 85,826 \cdot x - 6,2652$ de onde se pode afirmar que $x = (y + 6,2652) / 85,826$. Desta maneira, ao atribuir-se a “y” o valor de área obtido no cromatograma encontra-se como resultado a concentração de alendronato expressa em microgramas por mililitro.

Os valores de área para cada amostra foram extraídos dos respectivos cromatogramas. A figura 5.1 representa o cromatograma do dente 2 pertencente ao grupo 1 no tempo experimental de 10 minutos.

Figura 5.2– Cromatograma de amostra do G1 (dente 2 tempo1).

A tabela 5.2 mostra as médias (análise em duplicata) das concentrações de alendronato de sódio encontradas nas amostras do Grupo 1 (solução de alendronato na concentração de 3,2 µg/ml) extraídas dos cromatogramas e expressas em área e também convertida para microgramas por mililitro.

Tabela 5.2- Médias das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 1

G1	T1 (10 min.)		T2 (15 min.)		T3 (30 min.)	
	Área	Conc. µg/ml	Área	Conc. µg/ml	Área	Conc. µg/ml
Controle	165.08	2.00	90.96	1.13	48.91	0.64
D1	92.36	1.15	47.28	0.62	20.87	0.32
D2	86.90	1.09	36.27	0.50	24.33	0.36
D3	98.76	1.22	46.25	0.61	18.31	0.29

A representação gráfica pode ser observada no gráfico 5.1:

Gráfico 5.1- Médias das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 1

A tabela 5.3 mostra as médias (análise em duplicata) das concentrações de alendronato encontradas nas amostras do Grupo 2 (solução de alendronato na

concentração de 32,0 µg/ml) extraídas dos cromatogramas e expressas em área e também convertida para microgramas por mililitro.

Tabela 5.3- Médias das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 2

G2	T1 (10 min.)		T2 (15 min.)		T3 (30 min.)	
	Área	Conc. µg/ml	Área	Conc. µg/ml	Área	Conc. µg/ml
Controle	2771.03	32.36	2165.95	25.31	1098.82	12.88
D4	951.05	11.15	838.76	9.85	222.12	2.66
D5	773.18	9.08	509.04	6.00	243.26	2.91
D6	826.07	9.70	633.97	7.46	316.33	3.76

A representação gráfica pode ser observada no gráfico 5.2:

Gráfico 5.2- Médias das concentrações de alendronato de sódio em função do tempo no grupo 2

Para uma melhor análise os resultados serão expressos em porcentagem de quantidade de alendronato adsorvido por cada dente em relação ao grupo controle, de acordo com os diferentes tempos experimentais. Na tabela 5.4 observa-se a porcentagem adsorvida partindo da concentração inicial de 3,2 µg/ml, enquanto que na tabela 5.5 observa-se a porcentagem adsorvida partindo da concentração de 32,0 µg/ml.

Tabela 5.4- Porcentagem adsorvida em relação ao controle no grupo 1

G1	T1		T2		T3	
	Conc. µg/ml	Adsorção (%)	Conc. µg/ml	Adsorção (%)	Conc. µg/ml	Adsorção (%)
Controle	2.00	-----	1.13	-----	0.64	-----
D1	1.15	42,50%	0.62	45,13%	0.32	50,00%
D2	1.09	45,50%	0.50	55,75%	0.36	43,75%
D3	1.22	39,00%	0.61	46,02%	0.29	54,69%
Média	-----	42,33%	-----	48,97%	-----	49,48%

Tabela 5.5- Porcentagem adsorvida em relação ao controle no grupo 2

G2	T1		T2		T3	
	Conc. µg/ml	Adsorção (%)	Conc. µg/ml	Adsorção (%)	Conc. µg/ml	Adsorção (%)
Controle	32.36	-----	25.31	-----	12.88	-----
D4	11.15	65,54%	9.85	61,08%	2.66	79,35%
D5	9.08	71,94%	6.00	76,29%	2.91	77,41%
D6	9.70	70,02%	7.46	70,53%	3.76	70,81%
Média	-----	69,17%	-----	69,30%	-----	75,86%

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos (ANDRESEN, 1970; MOURA; PROKOPOWITSCH; DAWIDOWICZ, 1994; ROCHA; CARDOSO, 2001; NICOLAU; MARCENES; SHEIHAM, 2001; CALDAS JR; BURGOS, 2001; BEZERRA et al., 2006) que avaliam dados epidemiológicos do traumatismo dental apresentam resultados semelhantes com relação a alguns aspectos. Dentre eles, pode-se ressaltar: a frequência maior no sexo masculino, que responde por 60 a 70% dos indivíduos afetados, o fato dos incisivos centrais superiores aparecerem como os dentes mais acometidos (aproximadamente 60%) e ainda o aparecimento das quedas como a principal causa do traumatismo dental.

Com relação à faixa etária mais atingida, considerando-se os indivíduos em fase de dentição mista ou permanente, observa-se uma maior incidência nas idades entre 6 e 10 anos. A perda de um dente nessa faixa etária gera uma grande dificuldade para um restabelecimento funcional e estético, pois medidas definitivas como implante e prótese fixa não podem ser executadas, visto que o indivíduo ainda está em fase de crescimento. Por outro lado, a ausência de um elemento dental, especialmente na região anterior, gera uma série de repercussões de ordem funcional, estética e psicológica para qualquer pessoa.

Ainda com relação aos estudos de epidemiologia do trauma dental, observa-se que fraturas de esmalte e dentina são as modalidades de traumatismo mais frequentes (ANDRESEN, 1970; ROCHA; CARDOSO, 2001; BEZERRA et al., 2006). A incidência de intrusões e avulsões não é tão alta quando comparada às fraturas de tecido duro. Porém, as repercussões destas são muito mais graves,

estando freqüentemente associadas a ocorrência de necrose pulpar e aparecimento de reabsorções que podem culminar com a perda do elemento dental.

Enfatizando os casos de avulsão, observa-se que a incidência, de acordo com Andreasen (1970), está entre 0,5 e 16% dos traumatismos dentais. Entre nós, avaliando os dados referentes a 614 pacientes apresentando 1359 dentes traumatizados, atendidos no Centro de Traumatismo Dental da FOU SP (Cade-trauma) entre os anos de 2003 e 2005, foi observada uma incidência de 15,45% correspondendo a 210 dentes avulsionados (BEZERRA et al., 2006). Com certeza esse tipo de trauma causa as mais severas reações de apreensão e ansiedade no indivíduo, pois o dente é, invariavelmente, expulso de seu alvéolo.

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

Com relação às reabsorções radiculares externas associadas ao traumatismo dental observa-se a ocorrência de 3 principais modalidades: reabsorção superficial, reabsorção inflamatória e reabsorção substitutiva. A anquilose ocorre quando o tecido ósseo entra em contato direto com a superfície radicular, sendo adotada a denominação de reabsorção substitutiva quando ocorre o início do processo de substituição de tecido dental por tecido ósseo.

Quando se verificam as referências na literatura com relação as avulsões (ANDREASEN; HJORTING-HANSEN, 1966; ANDERSSON; BODIN; SÖRENSEN, 1981; GONDA et al., 1990; ANDREASEN et al., 1995a; EBELESEDER et al., 1998; KINIRONS; BOYD; GREGG, 1999; CHAPPUIS; VON ARX, 2005) observa-se uma

incidência alta dos processos de reabsorção, diretamente relacionados com a severidade do trauma.

Frente a um traumatismo de avulsão verifica-se um rompimento do feixe vâsculo-nervoso e severos danos ao ligamento periodontal, diretamente relacionados à secagem, compressão e remoção física das fibras.

O melhor prognóstico para um caso de avulsão é esperado quando ocorre o reimplante imediato. Porém, por uma série de motivos, como falta de informação, alterações no alvéolo e até mesmo medo, o dente geralmente não é reimplantado de imediato.

A permanência do ligamento periodontal a seco leva a uma rápida desidratação com conseqüente morte celular. Os efeitos deletérios da secagem sobre o ligamento periodontal foram demonstrados *in vitro* por Söder et al. (1977) que comprovaram a ausência de vitalidade celular no ligamento periodontal após um período de 2 horas de permanência a seco, evidenciando a necessidade de atuar o mais rapidamente possível.

Em vista disso, na impossibilidade do reimplante imediato, enquanto o reimplante não é executado, o dente avulsionado deve ser mantido em um meio líquido que conserve a vitalidade celular por um período adequado.

Os melhores meios de conservação para o dente avulsionado são: a solução salina balanceada de Hank e o ViaSpan[®], que são meios especializados para cultura celular, porém, dificilmente estão disponíveis nos locais do acidente. Trope (2002) enfatiza a necessidade da inclusão desses meios de conservação em kits de emergência em locais de acesso fácil, pois cerca de 60% dos casos de avulsão ocorre próximo a residência ou escola. Nos Estados Unidos, a solução salina

balanceada de Hank é vendida em farmácias, acondicionada em um recipiente próprio para receber o dente avulsionado, com nome comercial de Save-a-tooth[®].

Na ausência dos meios de cultura celular, podem ser utilizados em ordem de preferência: o leite, o soro fisiológico e a saliva (FLORES et al., 2001; FLORES et al., 2007; LIN et al., 2007). Se nenhum desses meios estiver disponível, e somente nesse caso, a água pode ser utilizada. Segundo Trope (2002), as características hipotônicas da água causam uma rápida lise celular, o que inviabilizaria sua utilização por um tempo extensivo.

A continuidade do tratamento das avulsões pode tomar rumos diferentes, tendo como fator crítico a expectativa de vitalidade das células do ligamento periodontal. Segundo Andreasen e Andreasen (2001), Flores et al. (2001), Trope (2002) e Flores et al. (2007) um período de permanência a seco superior a 60 minutos é considerado crítico com relação à manutenção de viabilidade das células do ligamento periodontal.

Dessa maneira, quando os corretos procedimentos no período extra-alveolar são tomados, como evitar a secagem e utilização de um adequado meio de armazenamento, o reimplante deve ser executado após uma rápida inspeção e remoção do coágulo do alvéolo, através de irrigação com soro fisiológico. A raiz não deve de forma alguma ser manipulada, evitando remoção física do ligamento remanescente. Deve-se apenas realizar irrigação com soro fisiológico antes do reimplante, para remoção de detritos visíveis.

Para os casos onde se presume a necrose do ligamento periodontal, motivada por períodos extra-alveolares prolongados, especialmente em casos de permanência a seco, a remoção do ligamento periodontal necrótico é indicada antes

do reimplante. De acordo com Lindskog et al. (1985), a presença de remanescentes necróticos da membrana periodontal atuaria como fatores estimuladores do processo reabsortivo.

Frente a possibilidade de extensa necrose das células do ligamento periodontal, o surgimento de reabsorções se torna eminente. A manobra de reimplante tardio, que deve ser considerada quando o dente permanece por períodos superiores a 1 hora mantido seco (FLORES et al., 2007) tem prognóstico duvidoso.

Na tentativa de favorecer esse prognóstico algumas alternativas para tratamento da superfície radicular antes do reimplante já foram propostas, Andreasen e Andreasen (2001) relatam algumas substâncias como: fluoreto de sódio, fluoreto estanhoso, tetraciclina, ácido cítrico, hidróxido de cálcio, formalina e indometacina. Alternativas mais recentes envolvem a utilização da dexametasona, do EMDOGAIN® e do alendronato de sódio.

A utilização do fluoreto de sódio foi proposta inicialmente por Shulman, Kalis e Goldhaber (1968), que observaram que esta substância poderia favorecer a manobra de reimplante tardio, pois uma reabsorção menos intensa foi observada nos casos onde os dentes permaneciam em uma solução de fluoreto de sódio fosfato acidulado 2% com pH 5,5 por 20 minutos antes do reimplante. Outros trabalhos relatam resultados semelhantes quanto a este favorecimento (SHULMAN; GEDALIA; FEINGOLD, 1973; MAHAJAN; SHIDU, 1981; OKAMOTO et al., 1999). A necessidade da remoção do ligamento periodontal necrótico também é destacada em associação com a imersão na solução de fluoreto de sódio para o favorecimento do prognóstico (MAHAJAN; SHIDU, 1981; OKAMOTO et al., 1999).

Os mecanismos de ação do fluoreto estão possivelmente relacionados com a alteração da hidroxiapatita para fluorapatita que é mais resistente ao processo de reabsorção, outra hipótese faz referência a uma ação inibitória específica na formação das células clásticas (BJORVATN; MASSLER, 1971).

É importante enfatizar que a imersão no fluoreto não é recomendada para dentes avulsionados com período extra-alveolar inferior a 1 hora, pois a solução concentrada de fluoreto poderia favorecer a necrose do ligamento periodontal, fato que prejudicaria o reparo normal deste tecido. Essa afirmação é confirmada pelos achados de Barbakow, Austin e Cleaton-Jones (1978).

Cabe destacar que a imersão do dente em solução de fluoreto de sódio a 2% por 20 minutos é o procedimento indicado, para dentes avulsionados com período extra-alveolar superiores a 1 hora e mantido seco, pela Associação Internacional de Traumatologia Dental (IADT), cujas normas de conduta para traumatismos dentais foram divulgadas recentemente (FLORES et al., 2007).

Outra alternativa de utilização dos fluoretos foi proposta em por Bjorvatn e Massler (1971) que encontraram resultados favoráveis quando mantiveram os dentes imersos em fluoreto estanhoso a 1,0% antes do reimplante. Essa alternativa também foi investigada por Bjorvatn, Selvig e Klinge (1989) e Selvig, Bjorvatn e Claffey (1990) que além da imersão na solução de fluoreto estanhoso a 1,0% por 5 minutos preconizam a imersão em tetraciclina por 5 minutos antes do reimplante. As pesquisas relatam resultados favoráveis quanto à incidência de anquilose e reabsorção inflamatória. Também é relatada a presença de uma reação inflamatória persistente no ligamento periodontal, entretanto sem ocorrência de reabsorção radicular. De acordo com Selvig et al. (1992) a diminuição da concentração do

fluoreto estanhoso para 0,1% resulta em menor reação inflamatória persistente ocorrendo, entretanto, uma queda na capacidade de prevenir a reabsorção inflamatória e a anquilose.

Outro tratamento proposto para a superfície radicular nos casos de reimplante tardio faz uso da imersão do dente em ácido cítrico (KLINGE; NILVÉUS; SELVIG, 1984; ZERVAS; LAMBRIANIDIS; KARABOUTA-VULGAROPOULOU, 1991; SKOGLUND, 1991). De acordo com os resultados dos pesquisadores um benefício inicial pode ser observado pela remoção do ligamento periodontal necrótico, porém no longo prazo não ocorreu favorecimento no controle da reabsorção radicular progressiva (ZERVAS; LAMBRIANIDIS; KARABOUTA-VULGAROPOULOU, 1991; SKOGLUND, 1991).

A utilização da dexametasona antes do reimplante foi investigada por Sae-Lim, Metzger e Trope (1998) e Keum et al. (2003), os pesquisadores observaram um favorecimento no reparo e menor incidência de reabsorções. Os dentes tratados com o corticóide apresentavam um grau de reabsorção progressiva menor quando comparado com o grupo controle, no qual o dente permaneceu apenas seco antes de ser reimplantado (KEUM et al., 2003).

A tetraciclina também foi pesquisada para tratamento da superfície radicular antes do reimplante tardio. Bryson et al. (2003) e Ma e Sae-Lim (2003) baseados nos resultados de suas pesquisas afirmam que o uso da minociclina, que é um derivado da tetraciclina com propriedades antibacterianas e antiinflamatórias, não é recomendado para prevenção e atenuação de reabsorção radicular externa decorrente de reimplante tardio.

Recentemente foi proposta a utilização de um complexo protéico derivado de células da bainha epitelial de Hertwig, denominado derivado da matriz de esmalte.

Esse composto é vendido comercialmente com o nome de EMDOGAIN® (Biora, Malmö, Sweden). Segundo Hammarström (1997), esse complexo protéico favorece o crescimento de cementoblastos na superfície desnuda da raiz, através do aumento da migração e diferenciação de células progenitoras.

Resultados promissores foram encontrados por Iqbal e Bamaas (2001) quando o EMDOGAIN® foi utilizado na superfície radicular antes do reimplante de dentes avulsionados em cães, com períodos extra-orais de até 1 hora a seco. Segundo os autores o EMDOGAIN® parece estimular o processo de reparação através da formação de ligamento periodontal normal.

Porém, de acordo com os achados de Filippi, Pohl e Von Arx (2002), Araújo et al. (2003), Lam e Sae-Lin (2004); Molina e Brentegani (2005), Schjott e Andreasen (2005) e Poi et al. (2007) a utilização do EMDOGAIN® não foi capaz favorecer o reparo do ligamento periodontal severamente traumatizado, com permanência extra-oral prolongada. Mesmo com o pequeno número de estudos parece que há uma convergência de que a utilização do EMDOGAIN® não favorece o prognóstico dos casos de reimplante tardio.

Na busca de um medicamento ideal para ser utilizado no tratamento da superfície radicular em casos de reimplante tardio, os bifosfonatos surgem como uma opção promissora, pois são substâncias que reduzem o índice de dissolução da hidroxiapatita mineral do osso, retardando ou impedindo a reabsorção óssea.

Dentre os bifosfonatos, o alendronato sódico é um dos mais potentes inibidores da atividade osteoclástica. 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.

A forma de absorção dos bifosfonatos é bastante interessante. Ocorre uma concentração preferencial em áreas de elevada atividade fisiológica, onde o metabolismo ósseo é maior, ou seja, os bisfosfonatos são concentrados de forma seletiva em locais de reabsorção óssea (SATO et al., 1991). Após ser absorvido, o bifosfonato liga-se a hidroxiapatita do osso exposto em locais de reabsorção. A atividade é iniciada quando o osteoclasto gera um pH ácido e dissolve a matriz inorgânica liberando o bisfosfonato ligado a hidroxiapatita (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

O mecanismo de ação dos bifosfonatos ainda não foi completamente elucidado. Sato et al. (1991) após estudar em ratos o mecanismo de ação do alendronato, propuseram um mecanismo de atuação que é bastante aceito. Segundo os autores, ao atingir concentrações entre 0,1 e 1,0mM na região da zona clara, o alendronato é capaz de gerar um aumento de permeabilidade iônica na borda rugosa dos osteoclastos, promovendo a inatividade da célula, que perde a borda rugosa.

Outros mecanismos propostos de ação direta dos bifosfonatos sobre osteoclastos incluem a inibição da ligação ao osso, inibição da diferenciação e recrutamento, e ainda interferências nas propriedades estruturais. É citada também a possibilidade da inibição dos osteoclastos ocorrer como efeito secundário de uma ação primária no osteoblasto que produziria um inibidor de recrutamento e sobrevivência dos osteoclastos (FOGELMAN, 1996).

Outra característica bastante interessante dos bifosfonatos é a capacidade de permanecer incorporado à matriz óssea do tecido ósseo neoformado, quando não atua diretamente no osteoclasto. A droga permanece farmacologicamente inativa até

o momento em que é exposta novamente pelo processo de remodelação óssea, voltando a agir nos osteoclastos.

Todas estas propriedades anteriormente descritas sugerem que o alendronato de sódio possa favorecer de alguma maneira os casos de reimplante tardio.

A possível utilização dos bifosfonatos no traumatismo dental, para controle de reabsorções substitutivas foi primeiramente investigada por Liewehr et al. (1995), que observaram *in vitro* a capacidade de fatias de dentina imersas em 2 tipos de bisfosfonatos, em resistir a atividade de dentinoclastos.

A utilização dos bifosfonatos de forma sistêmica para o tratamento de dentes traumatizados esbarra, na maioria das vezes, no problema de idade da grande maioria dos indivíduos acometidos pelo trauma dental. Em geral esses indivíduos ainda não apresentam crescimento completo. A utilização dos bifosfonatos de forma sistêmica poderia acarretar alterações no processo de remodelação óssea, causando possíveis danos ao indivíduo com um todo.

Surge então a perspectiva de utilizar os bifosfonatos de forma local através da imersão do dente por um determinado período de tempo em soluções contendo bifosfonato para os casos de reimplante tardio.

Levin et al. (2001) são responsáveis pelo primeiro relato da utilização do alendronato de sódio para tratamento das raízes antes do reimplante. Esses pesquisadores utilizaram o alendronato em uma concentração de 1,0mM associado a solução salina balanceada de Hank para imersão por período de 5 minutos de dentes de cães avulsionados e mantidos a seco por períodos de 40 ou 60 minutos. Por fim, os autores concluem que a imersão em alendronato resulta em menor perda de estrutura radicular por reabsorção.

A partir deste experimento, outras pesquisas foram desenvolvidas, Shibata et al. (2004) e Komatsu et al. (2007), pesquisadores pertencentes a um mesmo grupo da Escola de Medicina Dental da Universidade de Tsurumi no Japão desenvolveram dois estudos em ratos, estes pesquisadores utilizaram solução salina acrescida de alendronato de sódio na concentração de 1,0mM por 5 minutos, concentração e tempo sugeridos por Levin et al. (2001). Os pesquisadores encontraram resultados favoráveis nos dentes que receberam tratamento com alendronato.

Completando os relatos da utilização do alendronato antes do reimplante, Lustosa-Pereira et al. (2006) adotaram períodos extra-alveolares de 30 e 60 minutos e imersão do dente em uma solução de alendronato 3,2 mg/L por 10 minutos antes do reimplante. Os autores concluíram que o alendronato de sódio foi capaz de reduzir a incidência de reabsorção radicular, porém não interfere na incidência de anquilose.

O quadro a seguir (Quadro 6.1) mostra as principais características das quatro pesquisas descritas na literatura sobre a utilização do alendronato de sódio para tratamento da superfície radicular antes do reimplante.

	Levin et al. 2001	Shibata et al. 2004	Lustosa-Pereira et al. 2006	Komatsu et al. 2007
Modelo	Cães	Ratos	Ratos	Ratos
Período extra-alveolar	40 ou 60 minutos	10 minutos	30 ou 60 minutos	10 minutos
Conc. Alendronato	1,0 mM + Sol.Sal.B. Hank	1,0 mM + Sol. Salina	3,2 mg/L + Água destilada	1,0 mM + Sol. Salina
Tempo de Imersão	5 minutos	5 minutos	10 minutos	5 minutos
Proced. Endodôntico	Trat. Endod. antes da exodontia	Não foi realizado	Medicação com Ca(OH)_2	Não foi realizado
Períodos experimentais	4 meses	7, 14 e 21 dias	15, 60 e 90 dias	60 e 120 dias

Quadro 6.1 Pesquisas sobre o tratamento da superfície radicular com alendronato de sódio antes do reimplante tardio

A observação do quadro mostra que os modelos apresentam diferenças importantes de metodologia.

Dentre as principais diferenças de interesse para esta pesquisa destacam-se as de concentração do alendronato de sódio que variam de 10^{-3} M para os trabalhos de Levin et al. (2001), Shibata et al. (2004) e Komatsu et al. (2007) a 10^{-5} M para o trabalho de Lustosa-Pereira et al. 2006. Como visto foram utilizadas concentrações com diferença de 100 vezes entre elas.

A utilização da concentração de 10^{-3} M foi embasada na pesquisa de Sato et al. (1991) que observou que o alendronato liberado deve atingir uma concentração entre 10^{-4} e 10^{-3} M na região da zona clara; nesta concentração o alendronato é capaz de aumentar a permeabilidade iônica da borda rugosa dos osteoclastos, a reabsorção cessa e as células perdem a borda rugosa.

Já a concentração de 10^{-5}M foi adotada de acordo com os achados de Kum et al. (2003) que observou *in vitro* que a solução de alendronato de sódio nesta concentração promove a inibição da diferenciação de osteoclastos induzidos por *Porphyromonas gingivalis*.

Outra diferença a ser destacada é com relação ao tempo de imersão que variou de 10 minutos para o trabalho de Lustosa-Pereira et al. (2006) a 5 minutos para os demais trabalhos.

O fato é que não existe embasamento científico para o estabelecimento de uma adequada concentração e período necessário para imersão do dente antes do reimplante.

Estimulados pelos bons resultados apresentados pela imersão em alendronato e preocupados com a falta de consenso com relação a concentração ideal e tempo de imersão necessários, elaborou-se esse projeto de pesquisa, que inicialmente procurou investigar se ocorre adsorção de alendronato pelos tecidos dentais, pois a literatura mostra que o alendronato de sódio é capaz de se ligar a hidroxiapatita do tecido ósseo (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999). Porém a capacidade de ligação à hidroxiapatita do dente não foi demonstrada, sendo até então uma suposição.

Para avaliar o comportamento do dente quando imerso na solução de alendronato de sódio foi proposta a imersão do dente em soluções de alendronato com concentrações pré-estabelecidas de 3,2 $\mu\text{g/ml}$ e 32,0 $\mu\text{g/ml}$ (10^{-5} e 10^{-4}M) e análise das variações de concentração após períodos experimentais de 10, 15 e 30 minutos. Para analisar as alterações nas concentrações das soluções foi utilizada a

metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Fluorescência (CLAE-F).

As metodologias anteriormente propostas para análise de medicamentos levam em conta sua utilização como medicação intracanal e normalmente procuram avaliar a capacidade de difusão destes medicamentos através dos tecidos radiculares. As características do medicamento são fundamentais para a seleção da metodologia. Desta maneira observa-se que para o hidróxido de cálcio as alterações de pH são levadas em consideração (FOSTER; KULILD; WELLER, 1993; NERWICH; FIGDOR; MESSER, 1993; ARDESHNA; QUALTROUGH; WORTHINGTON, 2002; TEIXEIRA; LEVIN; TROPE, 2005).

Uma metodologia precisa foi utilizada por Camargo et al. (2004) que avaliaram a difusão da calcitonina utilizando o teste ELISA que envolve uma reação antígeno anticorpo. Este método pode ser considerado de elevada precisão, porém é necessário que exista o anticorpo específico para o medicamento que se deseja avaliar.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada anteriormente por Camões et al. (2004) para avaliar a capacidade de difusão do hidróxido de cálcio através da dentina e cimento.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico que apresenta alta seletividade, precisão e exatidão além de manter a integridade da amostra conforme reportado anteriormente para a determinação de alendronato de sódio nos estudos de De Marco et al. (1989), Kline e Matuszewski (1992) e Ptácek, Klíma e Macek (2002). Por outro lado, a sofisticação da instrumentação analítica, a complexidade de operacionalização, a exigência de analista treinado e utilização de

softwares específicos podem ser consideradas como limitação de sua aplicação relativamente aos bioensaios e imunoensaios. Entretanto a falência decorrente da utilização de imunoensaios ou de bioensaios não ocorre quando se monitoram as concentrações de fármacos por CLAE.

A grande maioria das propostas para a determinação quantitativa do alendronato de sódio, descritas na literatura, envolve o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). São utilizados principalmente dois tipos de análise cromatográfica: a cromatografia líquida de troca iônica (CLAE-TI) e a cromatografia líquida em fase reversa (CLAE-FR) (RIBEIRO; VOLPATO, 2005).

Para desenvolver a metodologia descrita no capítulo de Material e Métodos utilizou-se como referência os experimentos desenvolvidos por De Marco et al. (1989); Kline e Matuszewski (1990) e Ptáček, Klíma e Macek (2002) que avaliaram a biodisponibilidade de alendronato de sódio em amostras de plasma e urina.

Os métodos propostos para a determinação do alendronato de sódio através da CLAE em fase reversa empregam em sua maioria a detecção por ultravioleta ou fluorescência. No entanto, com exceção de alguns compostos como o tiludronato (que possui anel aromático em sua estrutura), a maioria dos bisfosfonatos não apresenta absorvidade apreciável (SPARIDANS et al., 2000). Sendo assim, o alendronato precisa ser submetido previamente a uma reação de derivatização. Esta tem como objetivo conferir ao composto a capacidade de absorver radiação ultravioleta ou de emitir fluorescência.

A alta seletividade, precisão e exatidão do método utilizado aliada as complexidade técnica para execução justifica a utilização de 3 dentes por grupo experimental. A análise em duplicata de cada amostra também eleva a

confiabilidade dos resultados encontrados. A pequena quantidade de espécimes dificulta a execução de uma análise estatística, porém a elevada precisão do método favorece a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis.

As concentrações iniciais propostas para este estudo $3,2\mu\text{g/ml}$ (10^{-5}M) e $32,0\mu\text{g/ml}$ (10^{-4}M) tentam adequar a metodologia de análise através da cromatografia líquida com as propostas dos trabalhos científicos que utilizaram a imersão do dente na solução de alendronato. Por este motivo não foi possível trabalhar com a concentração de $320\mu\text{g/ml}$ (10^{-3}M), pois a elevada sensibilidade da metodologia não foi compatível com a elevada concentração que acabou por prejudicar o funcionamento do aparelho ao saturar a coluna com o medicamento.

O tempo experimental de 5 minutos não pode ser adotado nesse experimento pela quantidade de procedimentos necessários para obtenção das amostras, pois o pouco tempo mostrou imprecisão na análise quando foi adotado em experimentos preliminares.

Os resultados obtidos através da cromatografia líquida mostram claramente que o alendronato é adsorvido pelo dente, porém existe uma diferença no padrão de adsorção que é dependente da concentração utilizada.

Desta maneira, partindo da concentração inicial de $3,2\mu\text{g/ml}$ (10^{-5}M) após 10 minutos de imersão verificou-se em média uma adsorção de 42,33% quando comparamos os valores com o grupo controle. Esta adsorção aumenta para 48,97% após 15 minutos de imersão, quando provavelmente ocorre a saturação, visto que após 30 minutos observa-se a adsorção equivalente a 49,48%.

Partindo da concentração de $32,0\mu\text{g/ml}$ após 10 minutos observa-se uma média de adsorção de 69,17% que praticamente não se altera após 15 minutos, ficando em 69,30%, após 30 minutos ocorre uma elevação para 75,86%.

Esses achados indicam que quando concentrações mais baixas são utilizadas (10^{-5}M) o tempo de saturação está em torno de 15 minutos, indicando que o dente deve permanecer imerso por período semelhante. Já para as soluções mais concentradas (10^{-4}M) após 10 minutos de imersão observa-se uma elevada adsorção inicial que praticamente não se altera após 15 minutos e continua aumentando até o período de 30 minutos. Esta diferença pode ser explicada pela maior disponibilidade do alendronato de sódio nas soluções mais concentradas.

Estes achados são importantes, pois indicam que dependendo da concentração utilizada, diferentes tempos de imersão podem ser adotados. Esse é um fato importante quando se avalia a aplicação clínica do procedimento.

É importante ressaltar a utilização da agitação mecânica que favorece a adsorção melhorando o contato da solução de alendronato com o dente. Outro fato a ser destacado é que os valores de pesagem dos dentes não foram considerados para a análise tendo-se em vista a maior importância da área de superfície do dente em contato com a solução de alendronato do que a massa do dente propriamente dita.

Uma queda na concentração é observada em função do tempo, mesmo para a solução controle. Esta queda pode ser atribuída a uma degradação do complexo formado entre o alendronato de sódio e o derivatizante, ou pela emissão de fluorescência que pode apresentar decréscimo com o tempo.

Essa capacidade de adsorção de alendronato pelo dente faz com que se imagine uma nova possibilidade de tratamento na qual seria realizada a cirurgia de acesso e o preparo químico cirúrgico, objetivando-se um bom aumento de permeabilidade, para nesse momento imergir o dente na solução de alendronato. Dessa maneira seria realizado um tratamento não só da superfície externa, mas

também da dentina. Na sequência poder-se-ia até mesmo realizar a obturação, pois a dentina estaria já saturada com o medicamento que ficaria ligado a hidroxiapatita até que fosse liberado frente ao processo de reabsorção.

Novas pesquisas devem ser desenvolvidas nesse sentido para que as concentrações e tempo de imersão ideais sejam estabelecidos, aliados aos testes de biocompatibilidade, não esquecendo da citotoxicidade do alendronato de sódio em concentrações maiores.

Como foi verificado, o tratamento da superfície radicular com alendronato de sódio parece um tratamento promissor e importantes experimentos já foram realizados, porém muitos estudos ainda são necessários para que uma utilização otimizada e comprovadamente eficaz seja proposta.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho permitiu-nos concluir que:

1. Os tecidos dentais adsorvem alendronato de sódio quando imersos em solução deste medicamento.
2. O padrão de adsorção varia de acordo com a concentração da solução. Para a solução de menor concentração (3,2 µg/ml) a saturação ocorre após 15 minutos de imersão, enquanto que para a solução de maior concentração (32,0 µg/ml) no tempo de 10 minutos é observada uma elevada adsorção que permanece praticamente estável após 15 minutos, continuando em elevação até o tempo de 30 minutos.

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):1478-84.
- Adami S, Mian M, Gatti P, Rossini M, Zamberlan N, Bertoldo F, et al. Effects of two oral doses of alendronate in the treatment of Paget's disease of bone. *Bone* 1994;15(4):415-7.
- 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.
- Al-Bradi S, Kinirons M, Welbury R. Factors affecting resorption in traumatically intrude permanent incisors. *Dent Traumatol*, 2002; 18(2):73-6.
- Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes – a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(1):37-42.
- Andersson L, Bodin I, Sörensen S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. *Endod Dent Traumatol* 1981;39(1):1-13.
- Andreasen FM, Vestergaard Pedersen B. Prognosis of luxated permanent teeth – the development of pulp necrosis. *Endod Dent Traumatol*, 1985; 1(6):207-20.
- Andreasen JO. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. A clinical study of 1928 cases. *Scand J Dent Res* 1970;78(4):329-42.
- 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.

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

Andreasen JO. Periodontal healing after replantation and autotransplantation of incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1981b;10(1):54-61.

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

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

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2 . Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol* 1995b;11(2):59-68.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 3 . Factors related to root growth. *Endod Dent Traumatol* 1995c;11(2):69-75.

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

Andreasen JO, Hjorting-Hansen E. Replantation of teeth. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand* 1966;24(3):263-86.

Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. *Acta Odontol Scand* 1981;39(1):1-13.

Araujo M, Hayacibara R, Sonohara M, Cardaropoli G, Lindhe J. Effect of enamel matrix proteins (Emdogain®) on healing after re-implantation of "periodontally compromised" roots. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2003;30(10):855-61.

Ardeshtna SM, Qualtrough AJ, Worthington HV. An in vitro comparison of pH changes in root dentine following canal dressing with calcium hydroxide points and a conventional calcium hydroxide paste. *Int Endod J* 2002;35(3):239-44

Barbakow FH, Austin JC, Cleaton-Jones PE. Histologic response of replanted teeth pretreated with acidulated sodium fluoride. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;45(4):621-8.

Barbakow FH, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Vieira E. Healing of replanted teeth following topical treatment with fluoride solutions and systemic admission of thyrocalcitonin: a histometric analysis. *J Endod* 1981;7(7):302-8.

Barret EJ, Kenny DJ. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 1997;13(4):153-63.

Bezerra AG, Abrão CV, Belmonte FM, Caldeira CL. Levantamento Epidemiológico dos casos de trauma dental atendidos no CADE-trauma da FOU SP entre os anos de 2003 e 2005. *RPG Rev Pós Grad da Univ de São Paulo* 2006;13(3):260.

Bjorvatn K, Massler M. Effect of fluorides on root resorption in replanted rat molars. *Acta Odont Scand* 1971;29(1):17-29.

Bjorvatn K, Selvig KA, Klinge B. Effect of tetracycline and SnF₂ on root resorption in replanted incisors in dogs. *Scand J Dent Res* 1989;97(6):477-82

Blomlöf L, Otteskog P, Hammarström L. Effect of storage in media with different ion strengths and osmolalities on human periodontal ligament cells. *Scand J Dent Res* 1981a;89(2):180-7.

Blomlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1981b;89(2):251-9.

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.

Bryson EC, Levin L, Banchs F, Trope M. Effect of minocycline on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dent Traumatol* 2003;19(2):90-5.

Caldas-Jr AF, Burgos MEA. A retrospective study of traumatic dental injuries in a Brazilian dental trauma clinic. *Dent Traumatol* 2001;17(6):250-3.

Camargo SC, Gavini G, Aun CE, Waterfield D, Coil JM. Diffusion of calcitonin through the wall of the root canal. *Braz Oral Res* 2004;18(1):59-62.

Camões IC, Salles MR, Chevitaress O, Gomes LN. Diffusion of Ca(OH)_2 associated with different vehicles: chromatographic study (high-performance liquid chromatography). *J Endod* 2004;30(1):30-4.

Chappuis V, Von Arx T. Replantation of 45 avulsed permanent teeth: a 1-year follow-up study. *Dent Traumatol* 2005;21(5):289-96.

Chesnut CH, McClung MR, Ensrud KE, Bell NH, Genant HK, Harris ST, et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. *Am J Med* 1995;99(2):144-52.

Correia VFP, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dent Traumatol* 2006; 22(6):312-7.

Cvek M, Cleaton-Jones P, Austin J, Lownie J, Kling M, Fatti P. Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization and periodontal healing in reimplanted monkey incisors. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(4):170-7.

De Marco JD, Biffar SE, Reed DG, Brooks MA. The determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1- diphosphonic acid monosodium salt trihydrate in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 1989;7(12):1719-27.

Diangelis AJ, Bakland LK. Traumatic dental injuries: current treatment concepts. *J Am Dent Assoc* 1998;129(10):1401-14.

Ebeleseder KA, Friehs S, Ruda C, Pertl C, Glockner K, Hulla H. A study of replanted permanent teeth in different age groups. *Endod Dent Traumatol* 1998;14(6):274-8.

Ebeleseder KA, Santler G, Glockner K, Hulla H, Pertl C, Quehenberger F. An analysis of 58 traumatically intruded and surgical extruded permanent teeth. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(1):34-9.

Filippi A, Pohl Y, Von Arx T. Treatment of replacement resorption with Emdogain-preliminary results after 10 months. *Dent Traumatol* 2001;17(3): 134-8.

Filippi A, Pohl Y, Von Arx T. Treatment of replacement resorption with Emdogain-a prospective clinical study. *Dent Traumatol* 2002;18(3):138-43.

Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2007;23(3):130-6.

Flores MT, Andreasen JO, Bakland LK, Feiglin B, Gutmann JL, Oikarinen K, et al. Guidelines for the evaluation and management of traumatic dental injuries. *Dent Traumatol* 2001;17(5):193-8.

Fogelman I. The effects of oestrogen deficiency on the skeleton and its prevention. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103(14):5-9.

Foster KH, Kulild JC, Weller RN. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. *J Endod* 1993;19(3):136-40.

Gonda F, Nagase M, Chen R, Yakata H, Nakalima T. Replantation : an analysis of 29 teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70(5):650-5.

Groper JN, Bernick S. Histological study of periodontium following replantation of the teeth in the dog. *J Dent Child* 1970;37(1):25-35.

Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997;24(9):658-68.

Harris ST, Gertz BJ, Genant HK, Eyre DR, Survill TT, Ventura JN, et al. The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(6):1399-406.

Henry JL, Weinmann JP. The pattern of resorption and repair of human cementum. *J Am Dent Assoc* 1951;42(3):270-90.

Hodsman A, Adachi J, Olszynski W. Use of bisphosphonates in treatment of osteoporosis. *Can Med Assoc J* 1996;155(7):945-8.

Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effect of long term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod* 1996; 22(1):30-3.

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.

Iqbal MK, Bamaas N. Effect of enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in Beagle dogs. *Dent Traumatol* 2001;17(1):36-45.

Jacobsen I. Clinical follow-up of permanent incisors with intrusive luxation after acute trauma. *J Dent Res* 1983; 62(4):486.

Kanis JA, Gertz BJ, Singer F, Ortolani S. Rationale for the use of alendronate in osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1995;5(1):1-13.

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.

Kenny DJ, Barret EJ, Johnston DH, Sigal MJ, Tenenbaum HC. Clinical management of avulsed permanent incisors using Emdogain: initial report of an investigation. *J Can Dent Assoc* 2000;66(1):21.

Keum KY, Kwon OT, Spångberg LS, Kim CK, Kim J, Cho MI, Lee SJ. Effect of dexamethasone on root resorption after delayed replantation of rat tooth. *J Endod* 2003;29(12):810-3.

Kinirons MJ, Boyd DH, Gregg TA. Inflammatory and replacement resorption in reimplanted permanent incisor teeth: a study of the characteristics of 84 teeth. *Endod Dent Traumatol* 1999;15(6):269-72.

Kline WF, Matuszewski BK. Improved determination of the bisphosphonate alendronate in human plasma and urine by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection. *J Chromatogr* 1992;583(2):183-93.

Klinge B, Nilvéus R, Selvig KA. The effect of citric acid on repair after delayed tooth replantation in dogs. *Acta Odontol Scand* 1984;42(6):351-9.

Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, Nifuji A. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. *J Periodont Res* 2007; DOI: 10.1111/j.1600-0765.2007.01012.x.

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

Lam K, Sae-Lim V. The effect of Emdogain gel on periodontal healing in replanted monkeys' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(1):100-7.

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.

Liberman UA, Weiss SR, Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;333(22):1437-43.

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.

Lin S, Zuckerman O, Fuss Z, Ashkenazi M. New emphasis in the treatment of dental trauma: avulsion and luxation. *Dent Traumatol* 2007;23(5):297-303.

Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in the milk or saliva. *Scand Dent J Res* 1983;91(6):465-72.

Lindskog S, Hammarström L. Evidence in favor of an anti-invasion factor in cementum or periodontal membrane of human teeth. *Scand J Dent Res* 1980;88(2):161-3.

Lindskog S, Pierce AM, Blomlöf L, Hammarström L. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. *Endod Dent Traumatol* 1985;1(3):96-101.

Line SE, Polson AM, Zander HA. Relationship between periodontal injury, selective cell repopulation and ankylosis. *J Periodontol* 1974;45(10):725-30.

Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006;22(1):30-5.

Ma KM, Sae-Lim V. The effect of topical minocycline on replacement resorption of replanted monkeys' teeth. *Dent Traumatol* 2003;19(2):96-102.

Mahajan SK, Shidu SS. Effect of fluoride on root resorption of autogenous dental replants. Clinical study. *Aus Dent J* 1981 26(1):42-5.

Mars SCJ. The origin of osteoclasts: evidence clinical implications and investigation challenges of an extraesqueletal source. *J Oral Pathol* 1983; 12(4):226-56.

Melcher AH. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol* 1970;15(12):1183-96.

Meraw SJ, 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.

Molina GO, Brentegani LG. Use of enamel matrix protein derivative before dental reimplantation: a histometric analysis. *Implant Dent* 2005;14(3):267-73.

Moreira MS, Katayama E, Bombana AC, Marques MM. Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue. A pilot study. *Dent Traumatol* 2005; 21(6):329-35.

Moura AAM, Prokopowitsch I, Dawidowicz H. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries of patients of endodontic medical of the University of São Paulo. *Endod Dent Traumatol* 1994;10(1):45.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 1993;19(6):302-6.

Nicolau B, Marcenes W, Sheiham A. Prevalence, cause and correlates of traumatic dental injuries among 13-year-olds in Brazil. *Dent Traumatol* 2001;17(5):213-7.

Okamoto T, Niccoli-Filho W, Sonoda CK, Martins AP, Souza R. Immediate replantation of maxillary incisors in rats: Effects of tooth immersion in sodium fluoride and subsequent removal of the periodontal ligament. *Braz Dent J* 1999;10(2):73-9.

O'uchi N, Nishikawa H, Yoshino T, Kanoh 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.

Pavek DI, Radtke PK. Postreplantation management of avulsed teeth: an endodontic literature review. *Gen Dent* 2000; 48(2):176-81.

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

Poi WR, Carvalho RM, Panzarini SR, Sonoda CK, Manfrin TM, Rodrigues TS. Influence of enamel matrix derivative (Emdogain®) and sodium fluoride on the healing process in delayed tooth replantation: histologic and histometric analysis in rats. *Dent Traumatol* 2007;23(1):35-41.

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

Ptáček P, Klíma J, Macek J. Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2002;767(1):111-6.

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

Ribeiro AF, Volpato NM. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. *Quim Nova* 2005;28(5):852-8.

Rocha MJC, Cardoso M. Traumatized permanent teeth in Brazilian children assisted at the Federal University of Santa Catarina, Brazil. *Dent Traumatol* 2001;17(6):245-9.

Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, et al. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 1998;339(5):292-9.

Sae-Lim V, Metzger Z, Trope M. Local dexamethasone improves periodontal healing of replanted dogs' teeth. *Endod Dent Traumatol* 1998;14(5):232-6.

Sankaran SK. Osteoporosis Prevention and Treatment. Pharmacological Management and Treatment Implications. *Drugs Aging* 1996;9(6):472-7.

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.

Schjott M, Andreassen JO. Emdogain does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: a clinical study. *Dent Traumatol* 2005;21(1):46-50.

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

Selvig KA, Bjorvatn K, Bogle GC, Wikesjö UME. Effect of stannous fluoride and tetracycline on periodontal repair after delayed tooth replantation in dogs. *Scand J Dent Res* 1992;100(4):200-3.

Selvig KA, Bjorvatn K, Claffey N. Effect of stannous fluoride and tetracycline on repair after delayed replantation of root-planed teeth in dogs. *Acta Odontol Scand* 1990;48(2):107-12.

Shibata T, Komatsu K, Shimada A, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, Chiba M. Effects of alendronate on restoration of biomechanical properties of periodontium in replanted rat molars. *J Periodontal Res* 2004;39(6):405-14.

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.

Shulman LB, Gedalia I, Feingold RM. Fluoride concentration in root surfaces and alveolar bone of fluoride-immersed monkey incisors three weeks after replantation. *J Dent Res* 1973;52(6):1314-6.

Shulman LB, Kalis P, Goldhaber P. Fluoride inhibition of tooth replant root resorption in Cebus monkeys. *J Oral Ther Pharmacol* 1968;4(5):331-7.

Skoglund A. A study on citric acid as a proposed replacement resorption inhibitor. *Swed Dent J* 1991;15(4):161-9.

Söder PO, Otteskog P, Andreasen JO, Modéer T. Effect of drying on viability of periodontal membrane. *Scand Dent J Res* 1977;85(3):164-8.

Sparidans RW, Hartigh J, Cremers S, Beinen JH, Vermeij P. Chromatographic analysis of bisphosphonates. *J Chromatogr A* 2000;868(1):141-2.

Teixeira FB, Levin LG, Trope M. Investigation of pH at different dentinal sites after placement of calcium hydroxide dressing by two methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(4):511-6.

Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol* 2002;18(1):1-10.

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

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

Zervas P, Lambrianidis T, Karabouta-Vulgaropoulou I. The effect of citric acid treatment on periodontal healing after replantation of permanent teeth. *Int Endod J* 1991;24(6):317-25.

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PARECER nº 132/02
Protocolo 164/02

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Avaliação in vitro da difusão do alendronato sódico através da dentina radicular, quando utilizado como medicação intra-canal"*, de responsabilidade do pesquisador **Alexandre Gomes Bezerra**, sob orientação do Professor Doutor **Celso Luiz Caldeira**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios referentes ao andamento da pesquisa em 10 de janeiro de 2003 e em 10 de julho de 2003. Ao término da pesquisa, cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 10 de julho de 2002

Profa. Dra. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B- Declaração do Comitê de Ética

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

DECLARAÇÃO
Protocolo 164/02

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a adequação da metodologia para avaliar a capacidade de adsorção do alendronato de sódio quando utilizado para tratamento superficial do dente antes do reimplante, utilizando a mesma metodologia de análise que é a Cromatografia Líquida e a mudança do título do projeto inicialmente denominado "Avaliação in vitro da difusão do alendronato sódico através da dentina radicular, quando utilizado como medicação intracanal" para "Tratamento superficial com alendronato de sódio antes do reimplante tardio – Análise da adsorção através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", de responsabilidade do Pesquisador Alexandre Gomes Bezerra, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Celso Luiz Caldeira.

São Paulo, 13 de novembro de 2007.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador