GIOVANE HISSE GOMES

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE DO ALENDRONATO
DE SÓDIO SOBRE OSTEOLASTOS EM CULTURA CELULAR**

São Paulo
2006

Giovane Hisse Gomes

**Avaliação in vitro da citotoxicidade do alendronato de sódio sobre
osteoblastos em cultura celular**

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

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

São Paulo

2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Beto e Eliana, que sempre deram prioridade aos estudos dos filhos. Nós sabemos o quanto vocês trabalharam para que tivéssemos o melhor ensinamento possível.

À Camila, companheira dedicada, que com paciência, carinho e amor me ajuda desde o início dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pela minha família maravilhosa.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, pela orientação segura, pelo apoio constante, pela dedicação, paciência e oportunidades durante minha vida acadêmica e profissional.

À minha Dinda, meus irmãos, primos, tios e avós que me acompanham em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques por abrir as portas do Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da FOU SP. Seus conhecimentos e sua dedicação foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Periodontia Dr. Francisco E. Pustiglioni, Dr. Giorgio De Micheli, Dr. Luiz Alves P. Lima, Dr. Roberto F. M. Lotufo, pelo incentivo ao aprendizado científico, pela confiança e amizade.

Aos professores do Curso de Especialização em Periodontia Dr. Cássio V. Carvalho e Dra. Marina Conde cujos ensinamentos jamais esquecerei.

Ao Prof. Dr. Cláudio Mendes Panutti pelas importantes considerações feitas durante a correção desse trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação: Adriane, Carla, Cássia, Fábio, Hsu, Ivan, Priscila, Ricardo, Valéria e Verônica, pelos últimos dois anos de intenso convívio, amizade, estudo e incentivo.

Aos colegas inseparáveis Silvinha Marcelino e Márcio Seto, por nossos fins de semana de estudo, que tornaram possível o sonho do mestrado.

A técnica Marilene do Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da FOU SP pelo importante auxílio no laboratório.

Às funcionárias da Disciplina de Periodontia Mara e Márcia, pela ajuda com as questões burocráticas exigidas pelo curso.

A bibliotecária Vânia Funaro pela dedicação na correção deste trabalho.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gomes GH. Avaliação in vitro da citotoxicidade do alendronato de sódio sobre osteoblastos em cultura celular [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ___/___/2006

Banca Examinadora

1) Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

Titulação: Prof. Assistente Doutor da Disciplina de Periodontia da FOUSP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Gomes GH. Avaliação in vitro da citotoxicidade do alendronato de sódio sobre osteoblastos em cultura celular [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade do alendronato de sódio (ALN), em diferentes concentrações, sobre osteoblastos em cultura celular. Foi utilizado para o experimento meio sem droga (controle) e meio contendo a droga em diferentes concentrações a saber: 0,5; 1; 5; 10; 20 e 40 mg/ml. Para o estudo foi utilizado uma linhagem de osteoblastos de rato (Osteo-1). A viabilidade celular foi inferida a partir da análise da atividade mitocondrial das células através do método da redução do MTT nos tempos experimentais de 0, 24, 48 e 72 horas. Após análise estatística (teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$), os resultados mostraram que, com exceção da concentração de 40mg/ml, todos os grupos apresentaram células viáveis, embora todas as concentrações de ALN tenham reduzido a atividade mitocondrial em mais de 50% em relação ao grupo controle, sugerindo que o ALN nessas concentrações estudadas foi citotóxico para os osteoblastos.

Palavras-chave: Alendronato de Sódio; Cultura celular; osteoblastos, MTT.

Gomes GH. Citotoxicity analysis in vitro of sodium alendronate on cultured osteoblasts [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the cytotoxicity of a bisphosphonate (sodium alendronate) on rat osteoblasts. The experimental groups were GI (control) no sodium alendronate, and GII, GIII, GIV, GV, GVI, and GVII with sodium alendronate at the concentrations of 0.5, 1, 5, 10, 20, and 40mg/ml, respectively. The cell viability was evaluated by MTT assay in experimental times 0, 24, 48, and 72 h. Data were statistically analyzed. Cultures treated with sodium alendronate showed cell viability percentages significantly lower ($p < 0.05$) than those of the control groups. In GVII, no viable cell was observed in all experimental times. It could be concluded that sodium alendronate, on direct contact with rat osteoblasts, is cytotoxic in all concentrations studied.

Key words: sodium alendronate, cell culture, osteoblasts, MTT

LISTA DE FIGURAS

p.

Figura 5.1- Média e erro padrão da atividade mitocondrial dos grupos experimentais nos diferentes tempos32

Figura 5.2- Comportamento celular em cada grupo ao longo do tempo.....32

LISTA DE TABELAS

ANEXO B- Média (Erro padrão) para o percentual de atividade mitocondrial dos grupos experimentais nos diferentes tempos.....	47
--	----

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ALN	Alendronato de sódio
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dubelco
PBSA	Solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio
MTT	brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
H ⁺	Íon hidrogênio
g	grama
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mol/L	mol por litro
M	molar
pH	potencial hidrogeniônico
%	por cento

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3 PROPOSIÇÃO.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Cultivo celular.....	24
4.2 Preparo das substâncias.....	26
4.3 Grupos experimentais e controle.....	26
4.4 Contagem das células.....	27
4.5 Plaqueamento.....	27
4.6 Análise da atividade mitocondrial.....	28
4.7 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS.....	30
6 DISCUSSÃO.....	33
7 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXOS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Os bifosfonatos são análogos sintéticos dos pirofosfatos. Eles se ligam aos cristais de hidroxiapatita e inibem a reabsorção óssea pela inibição da ação dos osteoclastos (FLEISCH, 1991; RESZKA; RODAN, 2003; RODAN; FLEISCH, 1996; SATO et al., 1991). Esses medicamentos são usados clinicamente, via oral, para tratamento de doenças caracterizadas por um aumento na reabsorção óssea, tais como hipercalcemia maligna (FARIAS, 2005), doença de Paget (ADAMI et al., 1994; O'DOHERTY et al., 1995; TUCCI, 2004) e osteoporose (HODSMAN; ADACHI; OLSZYNSKI, 1996).

Nos casos de mulheres com osteoporose, o alendronato (4-amino-1-hidroxibutano bifosfonato de sódio), um dos bifosfonatos, promoveu aumento significativo na densidade óssea resultando em redução da incidência de fraturas no fêmur, vértebra e antebraço (SAMBROOK; EISMAN 2000).

Tenenbaum et al. (2002) sugeriram o uso dos bifosfonatos como coadjuvantes ao tratamento da doença periodontal e concluíram que o uso desses medicamentos em periodontia, tanto na forma terapêutica quanto diagnóstica, pode proporcionar um interessante caminho para futuras explorações.

Estudos em animais demonstraram que essas drogas, administradas de forma sistêmica, foram efetivas na prevenção de perda óssea em sítios com periodontite quando comparados ao grupo controle (BRUNSVOLD et al., 1992; DUARTE et al., 2004; REDDY et al., 1995; WEINREB et al., 1994).

Alguns trabalhos avaliaram o efeito sistêmico do alendronato no tratamento da doença periodontal em humanos e mostraram efeito coadjuvante positivo (EL-

SHINNAWY; EL-TANTAWY, 2003; JEFFCOAT; REDDY, 1996; LANE et al., 2005; ROCHA et al., 2001, 2004). Entretanto, Gondim (2006), numa revisão sistemática sobre o uso de alendronato sistêmico para prevenção de perda dentária em mulheres após a menopausa, concluiu que ainda não existe evidência científica que suporte tal tratamento.

Outros autores sugeriram o uso local desta droga com o objetivo de reduzir a reabsorção óssea alveolar decorrente do procedimento cirúrgico a retalho de espessura total (BINDERMAN; ADUT; YAFFE, 2000; KAYNAK et al., 2000; YAFFE et al., 1995, 1997, 2003). Outros estudos, utilizando aplicação tópica desses medicamentos, foram realizados para avaliar o efeito do alendronato ao redor de implantes (MERAW; REEVE; WOLLAN, 1999) e na reabsorção radicular de dentes avulsionados (LEVIN et al., 2001; MENEZES, 2006).

Embora a ação primária do alendronato seja a inibição da reabsorção óssea mediada por osteoclastos, há um aumento nas evidências de que esses medicamentos também interajam com osteoblastos (FROMIGUE; BODY, 2002; IM et al., 2004; REINHOLZ et al., 2000).

Além disso, a inibição da reabsorção óssea ocorre também devido a liberação de inibidores de osteoclastos a partir dos osteoblastos (FLEISCH, 1998; NISHIKAWA; AKATSU; KATAYAMA, 1996; SAHNI, 1993; VITTÉ; FLEISCH; GUENTHER, 1996;), tornando-se importante investigar a viabilidade e proliferação dos osteoblastos frente ao tratamento com alendronato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O alendronato de sódio (ALN) é um fármaco derivado do ácido alendrônico. Trata-se de um composto amino difosfonado que possui estrutura análoga ao pirofosfato. Este é uma substância endógena com grande afinidade pela matriz óssea, sendo capaz de inibir a mineralização da mesma. Isso explica a ação farmacológica específica desses fármacos sobre tecidos mineralizados, especialmente o osso (RODAN, 1998; RODAN; FLEISCH, 1996).

O ALN liga-se aos cristais de hidroxiapatita presentes no tecido ósseo e se une, preferencialmente, às superfícies ósseas reabsorvidas, particularmente aquelas que estão sofrendo atividade de reabsorção osteoclástica (SATO et al., 1991). A afinidade desse medicamento por fosfato de cálcio e sua forte ligação à hidroxiapatita leva à sua rápida incorporação ao esqueleto (FLEISCH, 1998). Uma vez unido ao osso, esse fármaco é retido por longos períodos. Tem sido estimado que o tempo de vida para eliminá-lo do esqueleto, em humanos, seja de cerca de 10 anos (LASSETER et al., 2005; LIN et al., 1991).

O mecanismo de ação do ALN está relacionado à capacidade de se fixarem na matriz óssea, sendo assimilados pelos osteoclastos e, em seguida, inibindo sua ação. Esta é decorrente da interferência dos receptores dos osteoclastos com proteínas específicas da matriz óssea (COLUCCI et al., 1998), da produção de um inibidor osteoclástico por osteoblastos que reduzem o tempo de vida e/ou o número de osteoclastos diferenciados (VITTÉ; FLEISCH; GUENTHER, 1996) e da paralisação da reabsorção pela interferência com a borda rugosa dos osteoclastos (SATO et al., 1991).

Devido a esse efeito inibitório da reabsorção, a partir do início da década de 90 começou a ser estudado o possível benefício desses medicamentos na odontologia.

Os trabalhos realizados em humanos utilizaram o ALN administrado de forma sistêmica para avaliar o efeito dessa droga nos parâmetros clínicos periodontais (EL-SHINAWI; EL-TANTAWY, 2003; JEFFCOAT; REDDY, 1996; LANE et al., 2005; ROCHA et al., 2001, 2004). Outros estudos, avaliando o efeito da administração sistêmica desses fármacos na reabsorção óssea decorrente da doença periodontal, foram realizados em animais (BRUNSVOLD et al., 1992; REDDY et al., 1995; WEINREB et al., 1994).

Embora esses trabalhos tenham demonstrado que o ALN é capaz de inibir a reabsorção óssea associada à doença periodontal, a administração sistêmica de bifosfonatos está associada a efeitos colaterais como gastrite, úlcera gástrica e esofagite erosiva (SENER et al., 2004). Além disso, dor abdominal, náusea e diarreia podem ocorrer após administração via oral desses medicamentos (LIBERMAN et al., 1995). A fim de se evitar tais complicações, o uso tópico dessas drogas tem sido avaliado.

Yaffe et al. (1995) avaliaram, a partir de um estudo boca dividida, o efeito do bifosfonato na reabsorção óssea alveolar que ocorre após a realização de retalho de espessura total em ratos. Do lado esquerdo da mandíbula, após a elevação do retalho de espessura total, o ALN foi aplicado através de esponjas nas concentrações de 0,15 , 0,75 e 1,5 mg/ml durante 10 segundos. No lado controle apenas solução salina era aplicada. A avaliação por microradiografias de alta resolução não demonstrou diferença na inibição da reabsorção óssea entre o grupo tratado e o controle.

Os mesmos autores (YAFFE et al., 1997) repetiram o estudo em ratos, porém mudaram a concentração para 20 mg/ml sendo aplicado durante 2 horas. Houve redução da reabsorção óssea em torno de 52 % e manutenção da crista óssea alveolar.

Kaynak et al. (2000), através de análise histopatológica, avaliaram em ratos, a efetividade do ALN na prevenção da reabsorção óssea associada a retalho mucoperiosteal. Foram realizados os mesmos procedimentos de Yaffe et al. (1997). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à presença de infiltrado inflamatório, número de osteoblastos e osteoclastos. Entretanto, o número de lacunas de reabsorção foi significativamente maior no grupo controle.

Binderman, Adut e Yaffe (2000), em estudo realizado em ratos, também avaliaram o efeito de diferentes concentrações de ALN aplicado no local de cirurgias periodontais. Após a elevação do retalho, foi realizada a aplicação da droga, durante um período de 2 horas, nas concentrações 0,1 , 5, 20 e 40 mg/ml. A redução da perda óssea foi observada utilizando-se ALN a 20 mg/ml e 40 mg/ml. Porém, os melhores resultados foram obtidos na concentração de 20 mg/ml. Os autores concluíram que, provavelmente, a concentração de 40 mg/ml aumenta a acidez no local interferindo na atividade anti-reabsorção do medicamento.

Com o objetivo de determinar o efeito da aplicação local do ALN na regeneração óssea guiada ao redor de implantes dentários, Meraw, Reeve e Wollan (1999), utilizaram, em cães, implantes previamente embebidos, durante 1 semana, em ALN na concentração de 0,1 Mmol, comparados com implantes convencionais. Através de avaliação histológica os autores concluíram que a aplicação local da

droga resultou em aumento significativo da quantidade de osso formado ao redor dos implantes.

Levin et al. (2001) avaliaram o possível benefício da ação tópica do ALN na reabsorção radicular de dentes reimplantados em cães. Oitenta e dois dentes foram endodonticamente tratados, restaurados e depois avulsionados intencionalmente. Esses dentes foram mantidos durante 5 minutos em ALN associado a solução salina ou somente solução salina. Os cães foram sacrificados 4 meses após o reimplante e os dentes preparados para análise histológica. Os dentes tratados com ALN apresentaram menor perda de massa radicular por reabsorção.

Com o mesmo objetivo, Lustosa-Pereira et al. (2006), avaliaram o uso tópico de ALN em incisivos de ratos extraídos e embebidos, durante 10 minutos, em 3,2 mg/L da droga. Após esse período, os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio e então reimplantados. A análise histológica demonstrou que o alendronato levou a uma redução significativa na reabsorção radicular.

Embora esses estudos mostrem efeitos benéficos do ALN no processo de reabsorção, pouco é conhecido sobre a influência dessas drogas na diferenciação, proliferação ou função das células responsáveis pela formação óssea.

Yaffe et al. (2003) investigaram, em ratos, a influência do ALN na formação óssea. Foram implantados cilindros de fêmur desmineralizado no subcutâneo dos animais. Os cortes histológicos mostraram que os animais tratados com ALN intravenoso na concentração de 0,5 mg/kg de peso corporal apresentaram 70 % e 166 % maior quantidade de osso mineralizado após 6 e 10 semanas, respectivamente, quando comparado aos animais do grupo controle que receberam solução salina.

Altundal e Gursoy (2005) avaliaram o efeito do ALN na formação óssea durante o processo de remodelação óssea de enxerto autógeno em ratos. No fêmur direito de 56 animais foi realizado um defeito de 3 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. O enxerto autógeno de mesmas dimensões foi removido a 5 mm do defeito. Os animais tratados com ALN (concentração de 0,25mg/kg de peso corporal) mostraram um aumento estatisticamente significativo no número de osteoblastos quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas solução salina. As análises histológicas dos cortes longitudinais da junção osso do hospedeiro/enxerto autógeno revelaram maior formação de novo osso no grupo tratamento.

Kaynak et al. (2000) demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa na atividade osteoblástica entre o grupo controle e aquele tratado com ALN, após realização de retalho de espessura total em ratos.

Im et al. (2004) observaram, in vitro, utilizando o teste de redução pelo MTT, que o ALN na concentração de 10^{-8} M e num período de 72 horas de incubação aumentou a proliferação de osteoblastos em cultura em 26 % quando comparado ao grupo controle que não recebeu a droga.

Knoch et al. (2005) avaliaram o efeito do ALN na proliferação e diferenciação osteogênica de células da medula óssea humana. O tratamento com a droga na concentração de 10^{-8} M resultou em um significativo aumento na proliferação dessas células quando comparado ao grupo controle (somente meio de cultura).

Após a análise dos estudos que utilizaram o ALN na forma local, observamos que além das diversas metodologias empregadas, a concentração avaliada não foi padronizada, variando de 0,5 a 40mg/ml. Dessa forma, baseado na falta de

consenso da literatura à respeito do uso do ALN em odontologia é importante se determinar a biocompatibilidade das diferentes concentrações da droga.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade do alendronato de sódio, em diferentes concentrações (0,5; 1; 5; 10; 20 e 40mg/ml) sobre osteoblastos em cultura celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A toxicidade de 6 diferentes concentrações de ALN foi mensurada in vitro. Foram analisadas as respostas dos osteoblastos cultivados em meio condicionado com a droga. A viabilidade celular foi inferida a partir da análise da atividade mitocondrial pelo teste da redução do brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983).

4.1 Cultivo celular

Foi utilizada nesta pesquisa linhagem de osteoblastos (Osteo 1), desenvolvida a partir de osso de ratos recém-nascidos. As células foram cedidas pelo Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da Universidade de São Paulo. O projeto teve aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da FOU SP (anexo A).

Um tubo criogênico contendo os osteoblastos congelados foi descongelado em banho-maria a 37 °C por 2 minutos. Para remover a substância crioprotetora (dimetil-sulfóxido - DMSO), as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo 10 ml de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, foram centrifugadas a 300 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células

resultante da centrifugação, foi ressuspendido em 1 ml de DMEM fresco. A suspensão das células foi transferida para um frasco de 25 cm² contendo 5 ml de DMEM com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução antibiótica-antimicótica (Sigma, St. Louis, MO, USA), que em seguida foram mantidas em estufa à 37 °C, atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura.

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente utilizando-se microscópio invertido de fase e o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após ocuparem 70 % da área cultivável do frasco, processo denominado subconfluência, as células foram subcultivadas. Para tal, o meio do frasco foi aspirado, reservado em um tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir as células foram separadas com 2 ml de solução de tripsina a 0,25 % (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em PBSA, durante 3 minutos, à temperatura de 37° C.

Para a inativação da tripsina foi adicionado o meio de cultura reservado anteriormente contendo soro fetal bovino e as células em suspensão foram transferidas para um tubo e centrifugadas a 300 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido por aspiração e o precipitado de células foi ressuspendido em 1 ml de meio de cultura fresco.

Para a perpetuação da linhagem celular, frações dessa suspensão de células foram subcultivadas em novos frascos, procedimento que dará origem a novas passagens da cultura.

4.2 Preparo das substâncias

Dentro da capela de fluxo laminar, foi preparada uma solução estoque de alendronato de sódio em DMEM na concentração de 40 mg/ml. A seguir, essa solução foi aquecida em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos e depois colocada no agitador mecânico para a completa diluição da droga no meio. Após a diluição da droga, passou-se novamente para a capela de fluxo laminar, onde a solução foi esterilizada em filtro Milipore (poros de 0,22 micrômetros) e acondicionada em frascos estéreis. As demais concentrações utilizadas no experimento (0,5 , 1, 5, 10 e 20 mg/ml) foram obtidas por diluições seriadas, a partir da solução de 40 mg/ml.

4.3 Grupos experimentais e controle

Foram estabelecidos 7 grupos: 6 experimentais e 1 controle, sendo que cada grupo era formado por 8 amostras. Os grupos foram assim divididos:

Grupo I (G1): meio fresco sem ALN (controle)

Grupo II (G2): meio contendo ALN na concentração de 0,5mg/ml

Grupo III (G3): meio contendo ALN na concentração de 1mg/ml

Grupo IV (G4): meio contendo ALN na concentração de 5mg/ml

Grupo V (G5): meio contendo ALN na concentração de 10mg/ml

Grupo VI (G6): meio contendo ALN na concentração de 20mg/ml

Grupo VII (G7): meio contendo ALN na concentração de 40mg/ml

Foram utilizadas 4 placas de 96 poços, uma para cada tempo experimental: 0, 24, 48 e 72 horas.

4.4 Contagem das células

Para a determinação do número de células existentes no frasco original os precipitados foram ressuspensos em 1 ml de PBSA, e 0,1 ml dessa suspensão celular foi dispensada em um tubo de ensaio, sendo adicionado 0,8 ml de PBSA e 0,1 ml de solução de Azul de Trypan a 0,4 %, um corante para células não vitais. Posteriormente, algumas gotas dessa mistura foram transferidas para uma câmara de Neubauer que, em seguida, foi levada ao microscópio invertido de fase para a realização da contagem do número de células. As células coradas em azul representaram as células mortas, enquanto que as células não coradas são as células viáveis.

Então, a suspensão celular restante (0,9 ml) foi centrifugada. Novamente, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspensado em 1ml de meio de cultura fresco.

4.5 Plaqueamento

Dependendo do número de células existentes no frasco original foi adicionado a essa suspensão uma determinada quantidade de DMEM, de modo que obtenhamos 500 células em cada 0,1 ml. Tal suspensão de células foi então novamente cultivada em placas de 96 poços, onde as células iriam aderir e crescer. Todos os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar.

Após o cultivo celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, na contagem de 500 células por poço, em 100µl de meio DMEM fresco, sendo realizadas 8 réplicas para cada grupo experimental testado, totalizando 56 poços. Além disso, cada uma das placas de 96 poços teve sua primeira e sua última coluna de poços preenchidas por meio de cultivo sem células, com o objetivo de permitir melhor calibragem do espectrofotômetro (ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Após o período aguardado para aderência das células ao fundo dos poços (cerca de 4 horas), os meios de cultivo dos grupos experimentais foram adicionados aos respectivos poços na placa de cultivo. Esses meios de cultivo foram mantidos em contato com as células por 2 horas. Após esse período, os meios foram removidos dos poços e as células lavadas com PBSA.

4.6 Análise da atividade mitocondrial (teste do MTT)

Na placa de zero hora foi adicionado 100 µl de meio de cultivo fresco aos poços que contém células e nestes foram adicionados 10 µl para cada poço de solução 12 mM MTT (reagente A). As outras 3 placas, em que foi colocado apenas meio de cultivo, foram mantidas em estufa por 24, 48 e 72 horas. Após esse período

foi realizada a troca do meio e adicionado o reagente A do método MTT.

Após um período de incubação de 4 horas com o reagente A, foi adicionado 10µl de solução SDS-HCl (reagente B), homogeneizando cada poço com o auxílio de uma pipeta para realização de mistura entre os componentes. Após um novo período de 4 horas de incubação em 37°C, a placa foi colocada em espectrofotômetro para leitura da absorbância, com filtro de 562 nm.

4.6 Análise estatística

Todos os dados desta pesquisa foram tratados estatisticamente com auxílio do *software* BioStat 3.0. A normalidade ou não da distribuição amostral de cada conjunto de dados foi verificada por meio do teste de Kolmogorov - Smirnov com correção de Lilliefors. Como a distribuição dos dados mostrou-se não aderente à curva de distribuição amostral normal, foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dos diferentes grupos (concentrações) no mesmo tempo experimental. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os diferentes tempos experimentais dentro do mesmo grupo. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5 % ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

Os resultados desse estudo mostraram que a viabilidade celular das culturas tratadas com as diferentes concentrações de ALN, nos tempos experimentais avaliados, foram diferentes do controle e seguiram uma tendência dose dependente: quanto maior a dose, menor a viabilidade.

Os dados da atividade mitocondrial, obtidos pela mensuração das densidades ópticas nas placas de cultivo celular dos diferentes grupos experimentais foram transformados em porcentagem em relação à média do grupo controle que foi considerada como 100 % (Anexo B).

A figura 5.1 ilustra os resultados da atividade mitocondrial das células osteoblásticas (linhagem Osteo-1) obtidos em cada tempo experimental. Em zero hora, ou seja, na avaliação imediata do ALN nas diferentes concentrações analisadas, observa-se uma redução acentuada da atividade mitocondrial das células, exceto para as culturas tratadas com ALN na concentração de 1 mg/ml onde a viabilidade foi de cerca de 40 %, as demais concentrações do ALN levaram a diminuição de mais de 80 % na atividade mitocondrial. Para as concentrações maiores ou iguais a 10 mg/ml não foi detectada atividade mitocondrial.

Avaliando em 24 horas, observou-se um maior número de células viáveis em relação aos demais tempos estudados. Entretanto, todas as concentrações da droga reduziram a atividade mitocondrial em mais de 50 % em relação ao controle. Em 48 horas, a viabilidade celular foi reduzida a padrões semelhantes ao que observamos em zero hora, exceto para o grupo tratado com ALN a 10 mg/ml que em 48 horas apresentou 10 % de atividade mitocondrial. Em 72 horas, a redução da atividade

mitocondrial, para todos os grupos, foi superior a 75% mantendo a tendência de maior redução para maiores valores de concentração. O grupo 7 não apresentou atividade mitocondrial em nenhum tempo experimental.

A figura 5.2 ilustra o comportamento de todas as concentrações avaliadas nos 4 tempos experimentais. Fica evidente o comportamento semelhante, segundo a atividade mitocondrial, em todos os grupos, onde houve uma forte redução em 0 hora, quando comparado ao controle, uma recuperação em 24 horas e um declínio em 48 e 72 horas após o contato com a droga. Apenas a concentração de 1 mg/ml não seguiu este padrão pois manteve a viabilidade celular nos três primeiros tempos experimentais.

Quando os dados foram submetidos à análise estatística, verificamos inicialmente o comportamento das diferentes concentrações dentro de um mesmo tempo experimental. Todas as concentrações, em todos os tempos experimentais, diferiram estatisticamente quando comparadas ao controle (figura 5.1).

Num segundo momento verificamos o comportamento de cada concentração nos diferentes tempos experimentais. Os grupos 1, 5, 20 e 40 mg/ml não mostraram diferença significativa entre os tempos avaliados. Apenas o grupo 0,5 e 10 mg/ml mostraram diferença entre os tempos 0 e 24 horas (figura 5.2).

Figura 5.1- Média e erro padrão da atividade mitocondrial dos grupos experimentais nos diferentes tempos. Para letras diferentes, há diferença estatisticamente significativa

Figura 5.2- Comportamento celular em cada grupo ao longo do tempo. Para letras diferentes, há diferença estatisticamente significativa

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a adição de ALN aos osteoblastos em cultura diminuiu a viabilidade celular em mais de 60 % em relação ao grupo controle em todos os tempos experimentais.

Os efeitos de toxicidade das diferentes concentrações de ALN sob a cultura de osteoblastos foram mensurados mediante o grau de viabilidade celular pelo método MTT. Os trabalhos de Chan et al. (1999), Kostorys et al. (2003), Mosmann (1983) e Zhang, Torapinejad e Li (2003) nos asseguram a eficiência desta metodologia de avaliação.

Esse teste permite que a leitura celular seja feita sem a realização de qualquer procedimento de lavagem ou remoção celular do fundo do frasco, o que diminui o tempo do teste e ajuda a minimizar a variabilidade entre as amostras (MOSMANN, 1983). Além disso, Jackson et al. (1994) relataram que a manipulação da monocamada celular, realizada para o procedimento de contagem, seja esta realizada por raspagem ou tratamento químico, pode acarretar em danos as estruturas de adesão e depleção do metabolismo das células.

Em nosso experimento, utilizamos seis diferentes concentrações do alendronato de sódio: 0,5 , 1, 5, 10, 20 e 40 mg/ml, com tempo de aplicação de 2 horas, seguindo as concentrações e tempo de aplicação já utilizados em estudos que avaliaram o uso tópico dessa droga em animais (BINDERMAN; ADUT; YAFFE, 2000; YAFFE et al., 1995, 1997).

Num mesmo tempo experimental, foram utilizados 8 poços de cultivo para cada concentração. Como células em cultura podem ser preparadas em uma

suspensão uniforme, não há necessidade de um grande número de réplicas para análise. Normalmente, três réplicas são utilizadas e, para observações muito simples (como contagem celular, por exemplo), duplicatas já seriam suficientes (FRESHNEY, 2000).

A citotoxicidade do ALN foi diretamente proporcional à sua concentração embora as células tenham permanecido viáveis em todos os tempos experimentais nas concentrações inferiores a 5 mg/ml. É interessante notar que os grupos tratados com ALN em concentrações maiores que 10 mg/ml no tempo de 0 hora não apresentaram nenhuma atividade mitocondrial, o que não aconteceu em 24 horas. Esse achado ocorreu, provavelmente, devido ao fato de que as células, após o contato imediato com a droga, foram agredidas e ficaram sem atividade mitocondrial embora um número pequeno de células ainda estivessem viáveis. Quando novo meio de cultivo foi adicionado, elas continuaram em atividade. Apesar disso, após 24 horas a viabilidade celular foi diminuindo até 72 horas, exceto para o grupo tratado com 40 mg/ml onde a atividade mitocondrial não foi recuperada.

Dessa forma, é possível que tenha havido atividade mitocondrial nesses grupos no tempo 0 hora, porém o método não foi sensível o suficiente para detectar.

Ao contrário das demais concentrações, em todos os tempos experimentais, as células tratadas com alendronato a 1mg/ml no tempo 0 hora apresentaram cerca de 20% mais viabilidade ($p < 0,05$) que a concentração de 0,5 mg/ml, diferindo do padrão inversamente proporcional entre concentração e viabilidade celular.

Apesar dos resultados desse trabalho sugerirem que o ALN, nessas 6 concentrações estudadas, foi citotóxico aos osteoblastos, é possível que a maior consequência disso seja a impossibilidade de formação de novo osso. Se mesmo

assim o efeito sobre os osteoclastos for mantido, a manutenção da densidade óssea poderá ser observada.

Nossos resultados não estão de acordo com Garcia-Moreno et al. (1998) que avaliaram, *in vitro*, o efeito de várias concentrações de ALN na viabilidade de osteoblastos em cultura. Os autores adicionaram a droga ao meio de cultura de forma a obter concentrações de 10^{-1} a 10^{-12} mol/L. Concluíram que nenhuma célula viável foi observada nas culturas com concentrações maiores que 10^{-3} e 10^{-4} mol/L em 48 e 96 horas, respectivamente. Apesar de termos utilizado concentrações elevadas (10^{-1} a 10^{-4} mol/L) só não encontramos viabilidade no grupo tratado com 40 mg/ml (10^{-1} mol/L), a diferença de resultados provavelmente ocorreu devido ao tempo de contato das células com a droga, que em nosso estudo foi de apenas 2 horas.

É provável também, que isso tenha ocorrido devido a diferente metodologia utilizada para avaliação da viabilidade celular, já que os autores utilizaram o método da exclusão de células mortas com azul de Tripán. Nossos resultados podem indicar que o método da redução do MTT é capaz de detectar pequenos números de células viáveis, o que já foi demonstrado por Mosmann (1983).

Embora nossos resultados não tenham demonstrado efeito benéfico do alendronato sobre os osteoblastos, alguns estudos indicaram que essa droga pode não somente estimular os osteoblastos a secretar inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (VITTÉ, FLEISCH; GUENTHER, 1996) como também estimular a formação de precursores osteoblásticos e nódulos mineralizados, promovendo osteoblastogênese precoce (GIULIANI et al., 1998).

Knoch et al. (2005) estudaram, *in vitro*, o efeito do alendronato (10^{-8} M) na proliferação e diferenciação osteogênica pelas células do estroma da medula óssea

humana. O número e a viabilidade celular foram determinadas pelo teste de exclusão de células mortas com azul de Tripan. As células tratadas com a droga demonstraram um aumento estatisticamente significativo na proliferação e diferenciação osteoblástica quando comparado ao grupo controle.

No trabalho de Altundal e Gursoy (2005), a análise histopatológica da junção osso do hospedeiro/ enxerto autógeno revelou uma maior quantidade de osteoblastos no grupo tratado com alendronato (na concentração de 0,25mg/kg, subcutâneo) quando comparado ao grupo controle que recebeu solução salina. A formação de novo osso foi significativamente maior no grupo alendronato.

Essas observações sugerem que os bifosfonatos podem estimular a ação de osteoblastos e, conseqüentemente, ter influência benéfica no processo de formação óssea.

Como pode-se observar, os dados deste trabalho diferem da literatura citada anteriormente. Isso ocorre, provavelmente, devido a diferenças na concentração, tempo e forma de aplicação.

Em nossos grupos experimentais, além do número de células ter sido menor, o comportamento celular foi diferente do grupo controle. Ao longo do tempo, a atividade mitocondrial foi diminuindo em todos os grupos tratados com alendronato, o que não aconteceu nas células que não entraram em contato com a droga. Esses achados indicam que o alendronato nas concentrações estudadas foi citotóxico para os osteoblastos em cultura.

Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Correia, Caldeira e Marques (2006), que também avaliaram a citotoxicidade do ALN. Avaliando concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M os autores demonstraram que aquelas maiores que 10^{-5} M foram citotóxicas para os fibroblastos de ligamento periodontal cultivados

com a droga por um período de 8 dias. O efeito dessas mesmas concentrações também foi avaliado sobre cultura celular de endoteliócitos. Os resultados mostraram citotoxicidade na concentração de 10^{-5} M (MOREIRA et al., 2005).

O estudo in vitro utilizando técnicas de cultura de células é importante para a padronização biológica de materiais dentários, permitindo melhor controle das condições experimentais. Desde então essas técnicas têm sido empregadas para estudar o efeito citotóxico dos materiais dentários (SCHMALZ, 1994).

Freshney (2000), relata que os ensaios de cultura de células podem ser divididos em duas classes: (1) Resposta imediata ou de curto prazo, tal como alteração na permeabilidade da membrana ou perturbação de uma via metabólica, e (2), sobrevivência de longo prazo, geralmente medida pela retenção da capacidade de auto-renovação ou sobrevivência em estado alterado. Testes de longo prazo geralmente são usados para demonstrar a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo objetivo é medir a sobrevivência, uma vez que essa implica na retenção da capacidade regenerativa da célula.

A Federação Dentaria Internacional (1980), publicou uma normativa nomeada de “Práticas standardizadas recomendadas para avaliação biológica dos materiais dentários”, cuja análise dos materiais devam ser realizadas seguindo-se uma ordenação segundo níveis biológicos, classificados em testes iniciais, testes secundários e testes de uso, sendo que a análise da citotoxicidade por meio de cultura de células constitui um dos testes iniciais.

Os testes de citotoxicidade de materiais odontológicos em cultura celular são ferramentas fundamentais para se compreender seus comportamentos biológicos, desde que a limitação do método seja considerada quando da interpretação dos resultados e que os experimentos desenvolvidos em cultura celular não substituam

aqueles desenvolvidos em animais, mas que possam contribuir para a redução de seu número (SCHMALZ, 1994).

Alguns estudos avaliaram, em humanos, o ALN na forma de aplicação local em diferentes concentrações. Reddy e Kumar (2005) utilizaram concentrações de 1 % e Matsura (2003) 15 mg/ml.

Entretanto, acreditamos que mais estudos in vitro e em animais deveriam ser realizados para melhor estabelecer os efeitos das diferentes concentrações, tempos e formas de aplicação do ALN para uso local. Os resultados dos estudos in vitro, avaliando a citotoxicidade do ALN e a divergência observada na metodologia utilizada nos trabalhos de uso tópico dessas drogas em animais, não permitem garantir adequada efetividade e segurança para uso desses medicamentos em humanos.

Dessa forma, para melhorar a efetividade do uso tópico do alendronato, sugerimos que mais estudos devam ser realizados focando na investigação da dose mais efetiva, do tempo de duração do tratamento e forma de aplicação do medicamento.

6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações desse estudo podemos concluir que o alendronato de sódio nas concentrações de 0,5; 1; 5; 10; 20 e 40mg/ml reduziu a atividade mitocondrial em mais de 50% comparado ao grupo controle, indicando citotoxicidade aos osteoblastos em cultura celular.

REFERÊNCIAS¹

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.

Altundal H, Gursoy B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:285-91.

Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol* 2000;71(8):1230-40.

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

Chan CP, Jeng JH, Hsieh CC, Lin CL, Lei D, Chang MC. Morphological alterations associated with the cytotoxic and cytostatic effects of citric acid on cultured human dental pulp cells. *J Endod* 1999;25(5):354-8.

Collier AC, Pritsos CA. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem Pharm* 2003;66:281-7.

Correia VFP, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dent Traumatol* 2006;22:1-6.

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

El-Shinnawi UM, El-Tantawy SI. The effect of alendronate sodium on alveolar bone loss in periodontitis (clinical trial). *J Int Acad Periodontol* 2003;5(1):5-10.

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

Farias MLF. A hipercalcemia nas malignidades: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005;49(5):816-24.

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

Fleisch H. Bisphosphonates, pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991;42:919-44.

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

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

Fromigue O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest* 2002;25:539-46.

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

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 1998;22:455-61.

Gondim VS. Alendronato na prevenção da perda dentária em mulheres após a menopausa: revisão sistemática de ensaios clínicos controlados aleatorizados. Dissertação[Mestrado em Periodontia]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2006

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

Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25:4105-15.

Jackson AM, Alexandroff AB, Lappin MB, Esuvaranathan K, James K, Chisholm GD. *Immunology* 1994;81-120.

Jeffcoat MK, Reddy MS. Alveolar bone loss and osteoporosis: Evidence for a common mode of therapy using the bisphosphonate alendronate. In: Davidovitch Z, editor. The biological mechanisms of tooth eruption resorption and replacement by implants. Boston: Harvard Society for Advancement of Orthodontics; 1996. p.365-73.

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.

Knoch FV, Jaquiere C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. Biomaterials 2005;26:6941-9.

Kostoryz E, Eick JD, Chappelw CC, Glaros AG, Wetmore L, Yourtee DM. In vitro effect of light-cure dental adhesive on IL-6 release from LPS-stimulated and unstimulated macrophages. J Biomed Mat Res 2003;65A:89-94.

Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang HY, et al. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. J Periodontol 2005;76:1113-22.

Lasseter KC, Porras AG, Denker A, Santhanagopal A, Daifotis A. Pharmacokinetic considerations in determining the terminal elimination half-lives of bisphosphonates. Clin Drug Invest 2005;25(2):107-14.

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.

Lin JH, Duggan DE, Chen IW, Ellsworth RL. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. Drug Metabolism and Disposition 1991;19(5):926-32.

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 rat's teeth. Dent Traumatol 2006;22:30-5.

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

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

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

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: Aplication to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Meth 1983;65:55-63.

Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bone 1996;18:9-14.

O'Doherty DP, McClosky EV, Vasicaran S, Khan S, Kanis JA. The effects of intravenous alendronate in Paget's disease of bone. J Bone Miner Res 1995;10:1094-100.

Reddy GT, Kumar TM. Formulation and evaluation of alendronate sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. Drug deliv 2005;12:217-22

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

Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonate directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. Cancer Res 2000;60:6001-7.

Reszka AA, Rodan GA. Bisphosphonate mechanism of action. Curr Rheumatol Rep 2003;5:65-74.

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

Rocha ML, Malacara JM, Sánchez-Marín FJ, Torre CJV, Fajardo ME. Effect of alendronate on periodontal disease in postmenopausal women: A randomized placebo-controlled trial. *J Periodontol* 2004;75(12):1579-85.

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

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

Sambrook PN, Eisman JA. Osteoporosis prevention and treatment. *Med J Aust* 2000;172:226-9.

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

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

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials: advantages and limitations. *J Dent* 1994;22 Suppl 2:S6-S11.

Sener G, Sehirli O, Cetinel S, Midillioglu S, Gedik N, Ayanoglu-Dulger G. Protective effect of taurine against alendronate-induced gastric damage in rats. *Fundamental Clin Pharmacol* 2004;19:93-100.

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

Tucci JR. Paget disease of bone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2004;11:321-9.

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

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

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

Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Binderman I. The influence of alendronate on bone formation and resorption in rat ectopic bone development model. *J Periodontol* 2003;74:44-50.

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

Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod* 2003;29:654-7.

ANEXO A- Parecer do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROTOCOLO nº 02/03
PARECER nº 02/03

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *“Análise através de cultura de osteoclastos da reabsorção óssea ocorrida na presença e ausência de alendronato”*, sob responsabilidade do Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito.

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

São Paulo, 03 de dezembro de 2003

Prof. Dr. CELSO LUIZ CALDEIRA

Presidente da Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP

ANEXO B

Tabela B.1 - Média (Erro padrão) para o percentual de atividade mitocondrial dos grupos experimentais, nos diferentes tempos.

Grupos	Tempo			
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas
controle	97,63 (3,11)	98,98 (14,26)	98,85 (10,44)	99,39 (1,84)
0,5mg/ml	14,06 (4,53)	47,29 (9,55)	21,96 (4,6)	20,23 (2,42)
1mg/ml	35,96 (6,63)	34,79 (6,44)	35,60 (5,77)	15,17 (2,2)
5mg/ml	9,37 (4,25)	32,42 (6,92)	9,84 (4,07)	7,73 (3,2)
10mg/ml	0	47,97 (20,2)	10,60 (4,68)	7,43 (4,03)
20mg/ml	0	15,87 (7,8)	0	3,57 (2,2)
40mg/ml	0	0	0	0