**INFLUÊNCIA DOS BISFOSFONATOS NA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA,
NA FREQUÊNCIA E NAS DIMENSÕES DAS
REABSORÇÕES RADICULARES ASSOCIADAS**

MARIA FERNANDA MARTINS-ORTIZ

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Patologia Bucal.

(Edição Revisada)

Bauru
2004

**INFLUÊNCIA DOS BISFOSFONATOS NA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA,
NA FREQUÊNCIA E NAS DIMENSÕES DAS
REABSORÇÕES RADICULARES ASSOCIADAS**

MARIA FERNANDA MARTINS-ORTIZ

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Consolaro

(Edição Revisada)

Bauru
2004

Ficha Técnica:

Maria Fernanda Martins-Ortiz: concepção, execução, texto, formatação e análise estatística.

Alberto Consolaro: concepção, texto, orientação, fotomicrografia e revisão final.

Patrícia Zambonato Freitas e Ana Carolina Cuzzol Fracalossi: processamento de dados, bibliografia e revisão.

Tânia Regina Grão Velloso e Renata Consolaro: auxílio laboratorial

Tiago Pinheiro, Bethânia Pinheiro e Christian Spagnol: auxílio na parte experimental.

Prof. Dr. Décio Rodrigues Martins e Valdir João Afonso: revisão ortográfica e vernacular.

Maria Cristina Felipe Carrara e Valdir João Afonso: apoio técnico-administrativo.

Fátima Aparecida Silveira : apoio técnico-laboratorial.

Marcus e Ana Amélia Thame: serviços de cópias e encadernação.

Martins-Ortiz, Maria Fernanda

M366i Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas / Maria Fernanda Martins-Ortiz -- Bauru, 2004 187p.

Tese. (Doutorado) - - Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.
Orientador: Prof. Dr. Alberto Consolaro

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Bauru, 15 de dezembro de 2004.

MARIA FERNANDA MARTINS-ORTIZ

17 de abril de 1976	Nascimento em São Paulo – SP
Filiação	Fernando Ortiz e Heloisa Martins e Ortiz
1994-1998	Graduação em Odontologia pela Universidade Metodista de São Paulo – UMESP
2000-2001	Curso de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Ortodontia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo
2002-2004	Curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

*Uma homenagem do fundo do coração aos
Professores Doutores
Décio Rodrigues Martins e Sebastião Interlandi:*

“Silêncio”

*Antes que chegue o silêncio total,
Quero o silêncio de asas abertas
Arqueadas na brisa matutina!
Quero o silêncio de proas sonolentas
amparando espumas que vão ficar.
Quero o silêncio manchado de branco,
das velas pandas de barcos perdidos,
antes que chegue o silêncio total...*

*Quero o silêncio de currais vazios no fim da tarde.
Quero o silêncio de nuvens indecisas
sem cor e direção.*

*Quero o silêncio das palmeiras
perfiladas em alamedas de sonhos,
antes que chegue o silêncio total...
Quero o silêncio da neve nos ciprestes
que foram verdes.
Quero o silêncio do pôr do sol
nos planetas distantes.
Quero o silêncio da espera
em portos abandonados,
antes que chegue o silêncio total...*

*Quero o silêncio dos sorrisos,
do choro que emudeceu,
da revolta,
do perdão,
dos sinos de velhas torres,
dos gestos,
das mãos,
antes que chegue o silêncio total...*

Sebastião Interlandi

As palavras são absolutamente insuficientes para meus sentimentos de gratidão a tantas pessoas que fazem diferença em minha vida. No entanto, deixo registrado meu reconhecimento e gratidão àqueles que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho:

Ao Prof. Dr. Alberto Consolaro, Coordenador do Curso de Pós-Graduação da Disciplina de Patologia Bucal e Chefe do Departamento de Estomatologia, pela oportunidade e pelo privilégio de conviver em tão maravilhoso ambiente e despertar em mim o encanto pela pesquisa experimental em animais.

À Diretoria da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo e à Comissão de Pós-Graduação pelo apoio recebido. Pela atenção e disponibilidade de seus funcionários: Giane, Margareth, Renata, Cleusa e Eduardo.

À Capes, pelo suporte financeiro.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal: Profs. Drs. Luis Antônio de Assis Taveira, Denise Tostes Oliveira e Vanessa Soares Lara pela contribuição à minha formação profissional, pelo constante incentivo, disponibilidade e amizade.

Aos funcionários da Patologia, Sr. Valdir, Cristina e Fatiminha pelo suporte, disponibilidade, mas principalmente pela dedicação e amizade sincera, também compartilhada por seus familiares.

Meus singelos agradecimentos a todos os professores do Departamento de Estomatologia que sempre me consideraram, acolheram e ajudaram, especialmente os Profs. Drs. Eduardo Sant'ana, Ana Lúcia Álvares Capelozza, Júlio Gurgel e Luís Eduardo Montenegro Chinellato.

Aos amigos da Disciplina de Ortodontia que continuam a depositar toda confiança em mim e em meus projetos os Professores Doutores: Guilherme Janson, Marcos Roberto de Freitas, Arnaldo Pinzan, Fernando Castanha Henriques e Renato Rodrigues de Almeida. Por extensão às suas esposas e familiares, especialmente ao Fabrício, Karina, Celinha e Rafael pela convivência e amizade.

Ao Biotério da FOB-USP, de modo especial aos funcionários Luís e ao Erasmo, que com extrema gentileza e disponibilidade ofereceram suporte para a obtenção e manutenção dos animais utilizados neste trabalho.

A todos da Biblioteca que diariamente nos auxiliam na busca constante do conhecimento, especialmente à Cybele, Valéria, Rita, Vera Boccato, César e Salvador.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, nas pessoas da Tia Maria, André da Micro, Vera, Sérgio, Cristina e Daniel da Orto e à Bernadete pela amizade e convivência carinhosa.

Ao Marcus e Ana Amélia Thame pela incrível amabilidade, presteza e excelência na impressão dos exemplares deste trabalho.

À Dra. Telma Regina da Cunha Gobbi Francischone pelo fornecimento do alendronato utilizado neste trabalho.

Ao meu querido avô Décio Rodrigues Martins que com toda dedicação, carinho e inesgotável paciência revisou meus textos intermináveis.

À Tereza, Laurindo, Bruno e Raquel Furquim pela amizade incontestada e incentivo. Também pela incrível oportunidade de trabalhar com uma equipe tão competente como a da Dental Press International.

Agradeço a todos os membros da equipe Dental Press, especialmente ao: Adilson Ramos, Andréa e Ronis Siqueira, Carlos Venâncio, Júnior Bianchi, Rosely Suguino, principalmente, recentemente pela paciência e compreensão nos momentos de ausência por motivo desta tese.

Aos amigos Sônia, Simone, Luciana, César, Walter e Wagner, pela consideração e amizade demonstradas no dia-a-dia.

À Tânia Grão Velloso, nem uma irmã seria tão dedicada quanto se demonstrou durante esses anos que convivemos juntas. Também tenho muito orgulho de ter amigos como você e o Marcelo que deixaram a marca da

incondicionalidade gravada em nossos corações. A alegria do Henrique e do Leonardo também fazem muita falta.

À Patrícia Z. Freitas pela inestimável ajuda no capítulo de referências, pela amizade, disponibilidade e cumplicidade constante.

À Leda e Letícia Francischone, Erick e Juliana Pedreira pela doce e sincera amizade.

À Ana Carolina, Christian e Tiago Pinheiro por não medirem esforços para me ajudar na realização de todas as fases deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação do Doutorado e Mestrado: João Adolfo, Aline, Maria Renata, Rosário, Marta, Patrícia, Suzana, Leda, Erick, Rosa, Lídia, Valdomiro, Renata Consolaro, Renata Falchete, Luciana, Renato, Bethânia, Tiago, Lidiane, Camila, pela convivência alegre e sempre amistosa.

Aos colegas de pós-graduação das demais Disciplinas e Departamentos de FOB-USP, pela amizade e incentivo no dia-a-dia. De modo especial à Thania Rodrigues e ao José Eduardo Prado e Souza, Kelly Chiqueto, Sérgio Stelita e Livia Freitas, e pela consideração dos alunos de mestrado da Disciplina de Endodontia.

À Renata Consolaro, pela generosa amizade e compreensão. Por extensão, à família Consolaro que sempre me acolheram com o maior carinho: Sílvio, Sr. Luiz e Augusta, Tio Zé, Helio e Helena, Helen e Helder, Gervásio e Valdira, Etiene e Gustavo, e Luis Augusto.

À Sandra e Lúcia, pela sinceridade da amizade, por me fazerem sentir tão valorizada, me fazerem sentir verdadeira como uma irmã caçula. Por extensão à: Carla, Rosa, Alessandra, Renata, Mariana, Ralph, Rafael, Carol, Sr. Nick e Mariana, Dna. Orminda e Patrícia, pela acolhida em suas vidas.

Aos meus queridos pacientes, pela oportunidade de servi-los e com eles aprender.

Aos queridos alunos, que muito me valorizam e incentivam na convivência e são verdadeira fonte de inspiração para o meu trabalho como professora.

Ao casal Carlos Eduardo e Maura Bacchi, pela amizade singela e impressionante disponibilidade dedicadas ao Alberto e a mim.

À família Esberard, à família Grão Veloso Damato Oliveira, à família Francischone, à família Furquim, estes nossos amigos do peito que na verdade são nossa família por opção.

À Paty, Brasil, Vanessa, Sheila, Cris e Paula pelo carinho mesmo que distante e pela perseverança no cuidado de nossa amizade.

À Sonia, Marina, Deusa e Nenê que além de cuidarem de nossa família também nos concedem generosa amizade e uma convivência alegre.

À família Noble e Betts, por me adotarem como filha no exterior. Ao Dr. Sebastião Interlandi, a quem tenho como avô e sua delicada esposa Solange. À Pam e Zeev Davidovitch, por acolherem a mim e ao Alberto como irmãos.

À Liz, Kid, Giuseppe e ao Kevin, animaizinhos que pelo companheirismo, carinho incondicional e astral enchem os nossos dias de graça e sabor.

Aos animais utilizados neste trabalho, por darem suas vidas em benefício da espécie humana. Que estas mortes em holocausto à ciência não tenham sido em vão.

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, pelas oportunidades, pela família e pelos amigos que me concedeu.

Senhor, ajuda-me a ser humilde e a viver de acordo com os ensinamentos cristãos. Ajuda-me a amar o meu próximo, não apenas nos momentos simples, mas principalmente quando for mais difícil, reconciliando-me diariamente com todas as coisas do universo.

Tudo que sou é reflexo de meus pais, ancestrais e familiares...

Jamais serão suficientes meus agradecimentos a Deus por esta fantástica família à que me destinou, por isso agradeço- Lhe, profundamente:

Por meus pais, Heloisa, e Fernando, antes de mais nada, meus eternos amigos, que depositaram em mim seus sonhos e confiança, dando-me exemplos de vida e de caráter. Pelo constante, terno e paciente amor dedicado.

Por meus queridíssimos irmãos, Luís Eduardo e Maria Carolina, de quem muito me orgulho ser irmã. Somos três irmãos que se amam muito e torcem intensamente pela felicidade um do outro. Contem sempre comigo!!!

Por cada momento da minha vida na companhia dos avós do coração, a quem amo de paixão: Décio, Thereza Maria, Maciel e Isa, cúmplices e companheiros; pela alegria e carinho.

Por minhas carinhosas tias Elaine e Inês, com quem muito conto e por quem tenho muita admiração.

Por meus Tios, Tias, Primos e demais parentes pela amizade, alegria e torcida. De modo especial aos queridos (as): Maria Rita, tio Stélvio e tia Micy; tia Cléo e tio Didí; tia Bila e tio Wilson,

Pelo privilégio de conhecer e de mesmo conviver com sete dos meus oito bisavós. Pelo legado que me deixaram e de modo especial por minha Bisavó Dona Netinha, cuja companhia perdemos recentemente. Por todos os momentos alegres desfrutados e pela oportunidade de aprender com sua travessa sabedoria!

*Dedico este trabalho ao meu querido Alberto
Consolaro, “encantador de alunos”:*

*Mestre inspirador dos corações dos pretensos professores e
pesquisadores. Capaz de arrebanhar centenas de alunos e rendê-los por
horas a fio.*

*Despertando a emoção, a sensibilidade, a reflexão e a paixão pelo
saber. Nutrindo a curiosidade de cada um de seus pequenos alunos com a
dedicação, persistência e meticulosidade de quem cultiva um jardim de flores
raras.*

*Um cavaleiro dos tempos modernos com seus ideais nobres. Sem
deixar que o brilho de sua armadura ofusque a personalidade sensível e
romântica.*

*Crítico e auto-crítico. Firme e ao mesmo tempo terno e desprendido.
Exigente, mas que sabe oferecer desinteressadamente.*

*Coerente, intrigante, exigente, inspirador, inquietante, incansável,
invejável...*

*Provavelmente uma aluna como eu jamais mereceria ser sua orientada,
ou permanecer sua orientada, se não fosse por sua generosidade e
capacidade de compreensão para com as limitações humanas.*

*Que este trabalho seja uma lembrança não da melhor, nem da pior
pós-graduanda, apenas da teimosa Maria Fernanda que muito o admira,
respeita e ama...*

“É sempre bom pisar forte, resoluto, convicto, porque seus passos estarão orientando alguém, encantando alguém. Seus passos o conduzem para onde? Pra direita? Pra esquerda? Você vai visitar alguém, ajudar ou fazer mal ao próximo? É bom que saiba para onde caminha você. Há sempre alguém seguindo seus passos.

A moça bonita, o senhor circunspeto, o jovem, o velhinho, eu e você, todos nós, devemos pisar firme, forte e na direção certa, porque em nossos passos caminha alguém. Para onde você for, mesmo sem o saber, estará conduzindo muita gente. Vá em frente, alguém segue seu exemplo.

Há muita gente sem amor, sem esperança olhando para você e seguindo seus passos.”

Hélio de Aguiar, o apóstolo do rádio

poeta bauruense

Sumário

Resumo.....	xii
1 Introdução.....	1
2 Revisão da Literatura.....	6
3 Proposição.....	73
4 Material e Métodos.....	75
5 Resultados.....	103
6 Discussão.....	135
7 Conclusões.....	176
Referências Bibliográficas.....	178
Abstract.....	191
Anexos	

Resumo

Os bisfosfonatos constituem reconhecidamente potentes inibidores da reabsorção óssea. O presente estudo objetivou testar a hipótese de que a incorporação dos bisfosfonatos à dentina e ao cimento, durante a odontogênese e a rizogênese, aumentaria a resistência às reabsorções dentárias. Administrou-se o alendronato na dosagem de 1mgP/Kg, duas vezes por semana, por via oral, em 89 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*), divididos em quatro grupos submetidos à movimentação dentária induzida por 0, 3, 5 e 7 dias, previamente à morte dos animais. O aparelho ortodôntico consistiu em uma mola fechada ancorada aos incisivos superiores, movimentando mesialmente o primeiro molar superior esquerdo. Submeteram-se cada um dos grupos a diferentes protocolos de medicação antes da instalação do dispositivo ortodôntico, que assim constituíram-se: Grupo Controle, não recebeu o bisfosfonato; Grupo Experimental, submetido à medicação com alendronato desde a concepção e fase intrauterina até o final do experimento, aos três meses de vida; Grupo Ensaio 1, submetido ao alendronato desde a concepção e fase intrauterina até o segundo mês de vida, quando se interrompeu a medicação, um mês previamente à data da morte dos animais deste grupo e Grupo Ensaio 2, submetido ao alendronato no quarto mês de vida, já na idade adulta, por um período de três meses e meio. Realizou-se a análise microscópica por meio de cortes longitudinais dos molares destes murinos, sendo que na região cervical da raiz mesial observa-se os fenômenos produzidos por uma força suave ou moderada e na região cervical da raiz distal, os fenômenos produzidos por força intensa. Esta análise microscópica utilizando escores, os resultados dos testes estatísticos Quiquadrado, Kruskal-Wallis, Dunn e índice Kappa nos permitiram as seguintes constatações: a) os níveis de reabsorções radiculares apresentaram-se significativamente reduzidos; b) não se observaram influências destes medicamentos no tecido ósseo, nos fenômenos celulares, teciduais ou no ligamento periodontal durante o movimento ortodôntico. Deste modo pudemos concluir que: 1. quando da administração dos bisfosfonatos, do tipo alendronato, desde o início da odontogênese, ou mais especificamente durante a rizogênese, a incorporação deste medicamento à dentina e ao cimento pode aumentar a resistência radicular às reabsorções radiculares associadas a movimentação dentária induzida e, por extensão, às promovidas pelos traumatismos dentários; 2. a medicação prolongada e supervisionada com bisfosfonatos, do tipo alendronato, não altera a movimentação dentária induzida, mesmo quando da sua incorporação no tecido ósseo, pois não modifica as propriedades mecânicas do osso.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

A consequência mais indesejável da movimentação dentária induzida é a reabsorção radicular. Na população ocidental, as reabsorções radiculares apresentam uma prevalência de cinco a dez por cento em pessoas que nunca se submeteram a qualquer tratamento ortodôntico^{122,173} e apresentam uma variada etiopatogenia. Entre todas as causas de reabsorções dentárias a movimentação induzida representa o fator etiológico mais freqüente.

As reabsorções radiculares induzidas na movimentação ortodôntica afetam principalmente a região apical, diminuindo o comprimento dentário e reduzindo o suporte periodontal, especialmente quando afeta mais de 3mm. O terço apical representa a parte radicular com menor superfície periodontal, por isso sua redução implica em uma pequena perda de inserção radicular.

Além das reabsorções radiculares induzidas pela movimentação dentária, outros tipos de reabsorções se destacam, como as associadas aos traumatismos dentários, bem como as reabsorções internas e cervicais externas. Nos casos das periapicopatias crônicas, as reabsorções apicais promovem anfractuosidades nas quais se alojam bactérias isoladas, em grupos ou na forma de biofilmes microbianos, dificultando o reparo completo da região periapical, mesmo após um adequado tratamento endodôntico.

Na remodelação óssea, promove-se um a três milhões de pontos de reabsorção com unidades osteorremodeladoras (BMUs) ativas. Nestes pontos, alternam-se estes momentos de reabsorção com outros de neoformação óssea, promovendo a renovação do esqueleto em um espaço de tempo que varia de dois a dez anos, conforme o local do corpo, faixa etária dos pacientes e outros

fatores condicionantes como o estilo de vida, gênero e outros. Nos estados caracterizados pela osteopenia e sua conseqüente osteoporose, há uma hiperatividade das unidades osteorremodeladoras, em especial dos clastos - que atuam diretamente sobre a superfície óssea - retirando os íons minerais pela liberação de ácidos na sua interface, via borda ativa. Ao mesmo tempo em que desmineralizam, os clastos degradam a parte óssea orgânica, ou matriz óssea, pela liberação de enzimas proteolíticas, especialmente a collagenase. O produto desta desmontagem óssea, como íons, peptídeos, aminoácidos e outros componentes, são transportados para o tecido periférico pelos clastos através de vesículas citoplasmáticas que se abrem na sua membrana celular voltada para o oposto de sua interface óssea. Este processo de transporte citoplasmático dos componentes ósseos nos clastos é conhecido como transcitose.

A remodelação óssea não envolve os dentes, apesar de estar ocorrendo a apenas 250µm de distância da superfície cementária, aproximadamente. Na superfície radicular, os cementoblastos não apresentam receptores para os mediadores químicos promotores do turnover ósseo como o paratormônio, a calcitonina e os estrógenos de ação sistêmica, ou para as citocinas, fatores de crescimento e produtos derivados do ácido araquidônico de efeito local e que atuam nas áreas ósseas associadas ao estresse celular e à inflamação²⁵. Os íons minerais e outros componentes dos tecidos dentários duros, uma vez incorporados na estrutura dentária não mais são removidos naturalmente; os dentes, ao contrário dos ossos, não atuam como reservatório mineral ou protéico no organismo humano. A remoção dos componentes ocorre apenas em condições patológicas, nos dentes permanentes, no processo de reabsorção dentária. Durante os estados osteopênicos e osteoporóticos não há envolvimento das superfícies radiculares, pois estão protegidas pela camada cementoblástica.

Desde os anos 90, os bisfosfonatos são utilizados como medicamentos controladores da osteopenia, na prevenção da osteoporose humana. Os bisfosfonatos representam uma nova classe de drogas que agem sobre o metabolismo ósseo. Ao serem incorporados na matriz óssea em mineralização juntamente com os íons minerais, como por exemplo, o cálcio, as moléculas de bisfosfonatos tomam parte na estrutura óssea que será, em futuro breve, reabsorvida durante a remodelação natural do esqueleto. Mas, as moléculas de bisfosfonatos ao serem transportadas via transcitose, pelos clastos, induzem eventos bioquímicos capazes de iniciar a sua apoptose^{20,36,57,62,66,96,121,125,131}. Esta forma de morte natural na qual as células são mortas por fragmentação estrutural sem derramamento enzimático ou molecular que induza à inflamação, reduz o índice de reabsorção óssea e sua velocidade de remodelação. Desta forma os bisfosfonatos contribuem no controle de um turnover ósseo acelerado, prevenindo a osteopenia e a osteoporose. Outros mecanismos de ação dos bisfosfonatos também já foram estudados e comprovados^{74,58,107,124,125,127,128,131,145,154}.

A efetividade e o largo uso dos bisfosfonatos na prevenção e tratamento de estados osteopênicos e na prevenção da osteoporose induziram-nos a formular a seguinte hipótese:

“Se os bisfosfonatos controlam a velocidade da remodelação óssea por reduzir o número de clastos induzindo-os à apoptose ao reabsorverem o tecido ósseo, o mesmo pode acontecer nos tecidos dentários se, durante a odontogênese e especialmente na rizogênese, forem administradas doses regulares de bisfosfonatos.

A provável incorporação de moléculas de bisfosfonatos na estrutura dentária promoveria a apoptose dos clastos ante uma causa qualquer de reabsorção radicular que removesse os cementoblastos protetores da superfície radicular, de forma destacada, o que pode ocorrer durante a movimentação dentária induzida e nos traumatismos.

Dentes com moléculas de bisfosfonatos incorporadas em sua estrutura seriam mais resistentes à reabsorção dentária, inclusive durante o tratamento ortodôntico. Esta possibilidade permitiria uma prática ortodôntica mais segura e abriria novas perspectivas na prevenção e na prevalência das reabsorções dentárias de um modo geral”.

REVISÃO DA LITERATURA

2 Revisão e análise crítica da literatura

A biopatologia da movimentação dentária induzida e das reabsorções dentárias associadas apresentam seus aspectos morfológicos microscópicos repetidamente descritos em vários textos de artigos, teses e livros^{24,25,26,27,93,100,108,109,119,120,154,155}. Os fenômenos celulares e teciduais e suas variáveis decorrentes de condicionantes aplicadas clínica e experimentalmente estão minuciosamente e classicamente descritos nestes textos. Como exemplo destas variáveis condicionantes incluem-se o período analisado, o grau e a intensidade de força, o tipo de movimento, os dentes envolvidos, a morfologia radicular e da crista óssea, a influência de medicamentos e a de fatores sistêmicos.

O advento dos bisfosfonatos como medicamentos utilizados nos estados osteopênicos e osteoporóticos promoveu uma avalanche de publicações, incluindo-se revisões extensas e minuciosas. Cada detalhe deste grupo de drogas foi devidamente explorado como no livro de BIJVOET et al¹².

Nesta revisão da literatura enfatiza-se as investigações sobre a influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida e suas conseqüentes reabsorções. Inicialmente, expõe-se uma síntese de sua história, origem e mecanismo de ação, seguida de uma análise crítica quando pertinente.

2.1 Apresentação dos bisfosfonatos

Os pirofosfatos (P-O-P)* são reguladores fisiológicos da calcificação e

* pirofosfato: qualquer sal ou éster do ácido pirofosfórico, um elemento químico também utilizado na fabricação de fósforo de segurança, bombas incendiárias e pirotecnia. Sua composição básica apresenta duas moléculas de fósforo e uma de oxigênio com ligações simples entre si.

reabsorção óssea, naturalmente presentes no soro e na urina. A precipitação de fosfato de cálcio no plasma e na urina pode ser atribuída em parte à atividade inibidora dos pirofosfatos inorgânicos. Os pirofosfatos impedem a cristalização do fosfato de cálcio nas soluções e sua dissolução *in vitro*^{38,40,87}. *In vivo* inibem as calcificações ectópicas nas artérias, pele e em outros órgãos. Esses efeitos são observados quando administrados na forma parenteral sem influenciar nas reabsorções ósseas imediatas. Desta forma passou a ser empregado como regulador de calcificações e de descalcificações *in vivo*. Os efeitos terapêuticos, porém, não se mostravam satisfatórios devido à sua inatividade quando administradas via bucal e à rápida hidrólise, quando aplicadas via parenteral.

O pirofosfato e os polifosfatos são incapazes de inibir a calcificação ectópica *in vivo* quando administrados oralmente, devido à hidrólise no trato gastrointestinal. As propriedades do pirofosfato indicavam que poderia ser explorado em doenças de calcificação ectópica ou de aumento da reabsorção óssea. No entanto, a incapacidade de ação do pirofosfato quando administrado via bucal, inibindo a reabsorção óssea, propiciou o desenvolvimento de análogos com ações similares, porém mais resistentes à ação enzimática, como é o caso dos bisfosfonatos. A ação dos bisfosfonatos deve-se à sua semelhança estrutural com este grupo de compostos^{21,154}.

Os bisfosfonatos são análogos não-hidrolisáveis de pirofosfato, porque contêm ligações estáveis P-C-P em vez de ligações lábeis P-O-P e constituem compostos com as propriedades antidesmineralizantes do pirofosfato, mas resistentes à hidrólise^{1,21,36,38,40,47,52,64,87,96,121,141}.

Estes compostos são conhecidos pelos químicos desde o século XIX e sua síntese pioneira ocorreu em 1865 na Alemanha, por Nenschutkin, como descreveram RODAN; FLEISH¹²⁷, em 1996 e FLEISH³⁹, em 1998. As primeiras utilizações dos pirofosfatos e bisfosfonatos foram de natureza industrial como agentes anticorrosivos, emolientes e preventivos da deposição de carbonato de cálcio em encanamentos^{53,92}. Depois comprovou-se que eram efetivos no

controle da formação e dissolução *in vitro* do fosfato de cálcio, bem como na mineralização e reabsorção óssea *in vivo*, iniciando então sua utilização terapêuticamente em inúmeras doenças^{39,127}.

A constatação de que os bisfosfonatos poderiam inibir a reabsorção óssea foi evidenciada após tentativas para identificar agentes que fossem semelhantes ao pirofosfato resistentes à hidrólise enzimática com preservação de sua estrutura molecular^{38,40,87,127} e que pudessem também regular a calcificação óssea, sendo assim, potencialmente úteis para a prevenção de calcificação heterotópica²¹.

Os bisfosfonatos são utilizados como adesivos, antioxidantes, catalisadores, inibidores de corrosão, lubrificantes, aditivos para fluidos hidráulicos e combustíveis e outras finalidades. Nos últimos 40 anos, os estudos sobre os pirofosfatos inorgânicos^{38,40,87,127} promoveram sua utilização na área da saúde humana.

No início da década de 60, o suíço FLEISH e seus colegas incrementaram a utilização terapêutica dos bisfosfonatos^{38,40,41,42,43,44,45,131}. Após mais de três décadas de pesquisas e desenvolvimento, os bisfosfonatos tornaram-se indispensáveis no tratamento de doenças ósseas, tanto benignas quanto malignas^{21,154}. Essas drogas são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por clastos e são efetivas na redução das concentrações de cálcio no soro de pacientes com hipercalemia maligna. Além disso, constituem uma nova modalidade de tratamento para metástases ósseas, reduzindo a quantidade e o índice de complicações esqueléticas no mieloma múltiplo e no câncer de mama avançado, bem como aliviam a dor óssea causada por metástases de vários tumores sólidos, com conseqüente aumento da qualidade de vida do paciente^{21,154}.

Os dois grupos fosfonatos, em conjunto com o grupo hidroxila da cadeia lateral R₁, conferem uma alta afinidade para o osso e atuam como um “gancho nos ossos”, permitindo um direcionamento eficiente e rápido dos bisfosfonatos para a superfície do osso. Uma vez incorporado ao osso, a estrutura e a conformação tridimensional da cadeia lateral R₂, bem como os grupos fosfonatos, determinam a atividade biológica da molécula e influenciam na capacidade dos fármacos de interagir com alvos específicos^{21,69}.

A estrutura básica P-C-P permite um grande número de variações moleculares despontando possibilidades para numerosos compostos. Diversos fármacos da classe dos bisfosfonatos foram sintetizados, nos quais os grupos substituintes R₁ e R₂ variaram, sistematicamente com propósitos definidos^{21,69}:

- aumentando a afinidade óssea;
- melhorando o perfil terapêutico: potência, seletividade e toxicidade;
- adquirindo nova atividade farmacológica e
- alterando a biodisponibilidade da molécula.

O primeiro bisfosfonato utilizado em uma doença humana foi o etidronato, sintetizado em 1898^{39,127}. Cada bisfosfonato apresenta uma estrutura físico-química peculiar e função biológica específica. Para cada tipo de composto

de bisfosfonato, os resultados de avaliação experimental não podem ser extrapolados^{38,40}. Entre os bisfosfonatos destacam-se os^{38,40,87}:

- Ácido etidrônico (HEBP), ou etidronato
- Ácido diclorometilenobisfosfônico (Cl₂MDP) ou clodronato;
- Ácido Cloro-4-feniltiometilideno bisfosfônico, ácido tiludrônico ou tiludronato;
- Ácido 3-amino-1-hidroxipropano-1,1-bisfosfônico (AHPBP) ou pamidronato;
- Ácido 2-(3 piridini)-1-hidroxietilideno bisfosfônico ou risedronato
- Ácido 4-amino-1-hidroxibutilideno-1,1-bisfosfônico (AHBP) ou alendronato;
- Ácido 1-bisfosfônico 2-imidazol-1-yl-hidroxietano- 1 ou zoledronato
- Ácido ibandrônico ou ibandronato;
- Ácido olpadrônico ou olpadronato;
- Ácido 6-amino-1-hidroxi-hexilideno-1,1-bisfosfônico (AHHBP)
- Ácido 1-hidroxi-3(metilpentilamino)-propilideno bisfosfônico (BM21.0955)
- E outros de menor importância.

A página a seguir apresenta a configuração bioquímica de alguns dos bisfosfonatos citados para facilitar a compreensão da variabilidade de combinações possíveis para o ácido bisfosfônico:

Ácido etidrônico

Ácido clodrônico

Ácido tiludrônico

Ácido pamidrônico

Ácido risedrônico

Ácido alendrônico

Ácido zolendrônico

Ácido ibandônico

Ácido olpandrônico

Os bisfosfonatos exibem uma grande afinidade com íons metálicos como cálcio, magnésio e ferro. Na presença do cálcio o hidroxibisfosfonato forma complexos polinucleares no meio alcalino em pH fisiológico³⁸⁻⁴⁰. Os efeitos dos bisfosfonatos estão relacionados à sua grande afinidade com a fase sólida do fosfato de cálcio, aos quais se ligam quimicamente^{38,40,87}. Os principais efeitos físico-químicos dos bisfosfonatos^{35,87,121} são:

- ♦ inibem a precipitação dos fosfatos de cálcio das soluções, mesmo quando em baixas concentrações,
- ♦ bloqueiam a transformação do fosfato de cálcio amorfo em hidroxiapatita^{4,65,121},
- ♦ impedem a agregação dos cristais de hidroxiapatita em grandes núcleos^{52,117,164}
- ♦ inibem a formação e agregação dos cristais de oxalato de cálcio e são responsáveis pela baixa dissolução de hidroxiapatita^{35,96}.

Os bisfosfonatos se ligam fortemente a hidroxiapatita da superfície óssea e atuam preferencialmente em sítios de grande formação e reabsorção óssea¹⁵⁴. Estes fármacos inibem as reabsorções ósseas *in vitro* e *in vivo*, mesmo quando decorrentes de causas e agentes diferentes^{35,38,40,141}.

Os mecanismos de ação pelos quais impedem as reabsorções ósseas, ainda não estão completamente identificados^{20,36,66,87,125,126,152}. Alguns de seus efeitos são controversos, pois se revelam antagônicos conforme o composto ou sua concentração. Entre os efeitos observados destacam-se a redução da produção de ácido láctico e a inibição de certas enzimas lisossomais^{28,129,166}, da síntese de prostaglandinas³⁵ e da multiplicação dos macrófagos^{20, 38,40,96,121} e da função dos clastos. Algumas evidências indicam uma ação citotóxica direta sobre os clastos^{20,36,57,66,96,121} ou induzindo-os à apoptose^{62,125,131}.

Apesar do exaustivo estudo nos últimos 25 anos desta classe de inibidores de reabsorção óssea, o modo de ação dos bisfosfonatos ainda não parece claro; o

que se deve provavelmente à diferença entre os diversos compostos de bisfosfonatos. Muitos agentes terapêuticos usados na prevenção e tratamento da osteoporose são referidos como inibidores da reabsorção óssea, mas este termo é muito vago, pois não distingue a ocorrência de inibição no recrutamento de novos clastos ou na função dos clastos pré-existentes. Estudos histomorfométricos indicam que por longos períodos a administração de bisfosfonatos reduz o índice de novos ciclos de remodelação óssea, ou da frequência da ativação da remodelação óssea, uma expressão da redução do recrutamento de clastos por meio de marcações bioquímicas. Entretanto *in vitro* demonstrou-se um poderoso efeito inibidor dos bisfosfonatos na função dos clastos^{20,39,136}.

Os efeitos dos bisfosfonatos ocorrem em três níveis: tecidual, celular e molecular^{124,127}. No nível tecidual promove a redução do turnover ósseo, como se demonstrou com a utilização de marcadores bioquímicos. Os bisfosfonatos reduzem a extensão das regiões em reabsorção e a profundidade nas áreas erodidas, conforme demonstraram BOYCE et al.¹⁵, 1995; OTT et al.¹⁰⁵, 1993 e STORM et al.¹⁴³, 1993. No nível celular os bisfosfonatos reduzem a atividade osteoclástica, pois: a) inibe o recrutamento destas células para a superfície óssea, b) inibe a atividade celular, c) reduz o tempo de vida celular pela indução a apoptose, d) e altera a troca mineral na forma físico-química.

A apoptose, ou morte celular programada, foi descrita nos clastos há muitos anos e talvez seja a via normal de morte dessas células^{124,125}. O tempo de vida dos clastos, estimado a partir de estudos microscópicos, é de duas a quatro semanas *in vivo* e de no máximo duas semanas *in vitro*. Já foi descrito que os bisfosfonatos aumentam a apoptose de clastos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*^{107,124,125,127,154}.

Durante a reabsorção óssea os bisfosfonatos incorporados ao osso são liberados na lacuna de Howship e internalizados nos clastos por endocitose

afetando-os diretamente. Após este fenômeno os clastos perdem sua borda ativa enrugada e inicia-se a quebra do seu citoesqueleto, desmobilizando a atividade celular reabsortiva¹³¹.

Em cultura de células PLOTKIN et al.¹¹², em 1999, constataram que os bisfosfonatos inibem ou controlam a reabsorção atuando sobre os osteoblastos e osteócitos, inibindo a apoptose destas células (**Figura 1**). Os clastos derivam-se de precursores hematopoiéticos da linhagem monócito/macrófago e constituem as células primárias da reabsorção óssea, bem como pivôs da remodelação óssea normal e patológica em ação conjunta com os osteoblastos^{58,74,128,145}.

Figura 1 - Mecanismo pelo qual os bisfosfonatos afetam a capacidade reabsortiva dos clastos, induzindo-os à apoptose. (Modificado de RUSSEL; ROGERS, 1999¹³¹).

A ação sobre os clastos também pode advir: da inibição da adesão dos clastos às superfícies ósseas¹²⁹. Além dos efeitos diretos nos clastos, reporta-se que os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea indiretamente pelos osteoblastos alterando a função dos clastos¹³², já que estas células gerenciam as unidades osteorremodeladoras, comandando o recrutamento de clastos para as superfícies ósseas³⁹. Diversos estudos^{60,132,178} têm atribuído uma ação específica dos

bisfosfonatos sobre os osteoblastos, especialmente do clodronato, que em doses relativamente menores que as redutoras ou preventivas da reabsorção óssea podem apresentar um efeito na diferenciação de osteoblastos, estimulando a neoformação óssea⁶⁰.

Os bisfosfonatos promoveriam a secreção de fatores osteoblásticos que inibiram a formação de clastos e sua atividade^{74,112,132,160}.

Entre os possíveis mecanismos de ação dos bisfosfonatos na fisiologia óssea afirma-se que¹⁰⁴ (**Figura 2**):

- Interferem ou alteram o citoesqueleto de células clásticas;
- Interferem na membrana celular dos clastos, especialmente nas bordas pregueadas;
- Diminuem a proteína tirosina fosfatase;
- Induzem os clastos à apoptose;
- Inibem a adesão dos clastos ao osso;
- Inibem o bombeamento de prótons dos clastos;
- Inibem a formação de clastos;
- Atuam nos osteoblastos inibindo o estimulador do recrutamento de células clásticas;
- Atuam nos osteoblastos estimulando o inibidor do recrutamento de células clásticas;
- Atuam nos osteoblastos inibindo a atividade dos clastos.

Figura 2 - Apresentação esquemática de mecanismos de ação dos bisfosfonatos (Modificado de RODAN; FLEISH, 1996¹²⁷).

Os bisfosfonatos dividem-se em dois subgrupos, dependendo da presença ou não de nitrogênio que torna as drogas mais lipofílicas, absorvíveis e estáveis. Pesquisas recentes sugerem que os primeiros bisfosfonatos usados clinicamente e não-aminados (etidronato e clodronato) são metabolizados em análogos citotóxicos de ATP, sendo estes os responsáveis pela inibição da atividade dos osteoclastos.

Por outro lado, os bisfosfonatos aminados, mais novos e potentes - pamidronato, ibandronato, alendronato e zoledronato - induzem apoptose nos osteoclastos¹⁵⁴. Os fármacos desta classe que contêm um átomo de nitrogênio primário em uma cadeia alquílica (pamidronato e alendronato) podem ser de 10 a 100 vezes mais potentes que o etidronato e o clodronato, enquanto os derivados destes compostos que contêm um nitrogênio terciário (ibandronato e olpadronato) são, geralmente, mais potentes em inibir a reabsorção óssea²¹.

Entre os bisfosfonatos mais potentes estão os que contém o átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico (risedronato e zoledronato)²¹.

Os primeiros bisfosfonatos aprovados para uso terapêutico foram o clodronato dissódico (doença de Paget), o pamidronato dissódico (doença de Paget), o alendronato de sódio (osteoporose) e o risedronato de sódio (osteoporose). O zoledronato encontra-se em fase experimental para tratamento de câncer de próstata. Além do emprego nessas disfunções, estes compostos podem ser utilizados em hipercalcemia maligna e metástase óssea²¹.

Em razão de sua propriedade anti-reabsortiva, os bisfosfonatos também estão sendo investigados como inibidores da destruição das articulações, com possível uso no tratamento da artrite reumatóide. Ademais à sua capacidade de inibir a reabsorção óssea, mostraram atividade antiinflamatória em modelos animais de artrite reumatóide, bem como em humanos²¹.

Várias pesquisas demonstraram que os bisfosfonatos também possuem efeito em outras células além dos osteoclastos, incluindo células tumorais. Já há uma quantidade considerável de pesquisas *in vitro* demonstrando que os bisfosfonatos apresentam ação citostática, inibindo a proliferação celular, induzindo à apoptose, inibindo a adesão e a invasividade de células tumorais. Interferem no processo metastático, demonstrando efeito na secreção de fatores de crescimento e citocinas e inibindo a angiogênese tumoral¹⁵⁴.

A escala crescente da potência anti-reabsortiva, em vezes, para cada um dos diferentes bisfosfonatos pode ser assim representada^{104,149}:

⊙ Etidronato	1
⊙ Clodronato	10
⊙ Tiludronato	10
⊙ Pamidronato	100
⊙ Zoledronato	850
⊙ Alendronato	1000
⊙ Risedronato	5000

- ⊙ Ibandronato 10000
- ⊙ Olpadronato 10000

São também promissoras as novas perspectivas de conjugação dos bisfosfonatos com outros fármacos, como corticosteróides, antiinflamatórios e outros cuja administração repetitiva é inevitável, muitas vezes lesando o trato gastrintestinal. A utilização do sistema bisfosfonato como transportador de fármacos para os ossos, apresenta vantagens promovendo a liberação lenta de medicamentos de meia-vida curtos e evitando efeitos tóxicos gastrintestinais sucessivos, reduzindo o número de administrações²¹.

Os bisfosfonatos exibem baixo índice de absorção; quando administrados por via bucal ou parenteral a viabilidade biológica varia em torno de 0,7% para os alendronatos, de 0,3% para os pamidronatos, de 3 a 7% para o etidronato e de 1 a 2% para os clodronatos^{40,87}. A pequena taxa de absorção verificada no trato gastrintestinal é atribuída à pouca afinidade dos bisfosfonatos com os lipídios, responsáveis pelo transporte celular através das barreiras epiteliais. Além disso, a presença de cátions bivalentes, como o Ca^{2+} no trato gastrintestinal, favorece a formação de complexos químicos com os bisfosfonatos, diminuindo mais ainda a sua absorção⁸⁷. Algumas tentativas para aumentar a absorção dessas drogas foram realizadas alterando-se a via de administração e as doses dos medicamentos. Os resultados demonstraram uma absorção dose-dependente, bem como uma melhora nas administrações intraperitoniais, intramusculares e subcutâneas, mas as irritações locais e a destruição tecidual na região das injeções contra-indicam essas formas de administração. Para os oncologistas a infusão endovenosa parece ser a melhor via de administração, em casos de mieloma múltiplo e lesões metastáticas do câncer de mama e próstata^{53,87}, embora haja relatos de osteonecrose quando assim administrados nestes pacientes. Entretanto deve-se considerar que estes pacientes recebem muitas drogas quimioterápicas outras e mesmo corticóides.

Geralmente esses compostos são fracamente absorvidos a partir do trato gastrointestinal por serem pouco lipofílicos. Os bisfosfonatos circulantes desaparecem rapidamente do plasma e aproximadamente a metade é capturada pelo osso, sendo o restante excretado sem modificações pelos rins¹⁵⁴. Uma vez absorvidos pelos tecidos ósseos, sua eliminação ocorre lentamente e mesmo assim, somente quando houver um processo de reabsorção desse tecido. Esse fato explica a longa durabilidade dos bisfosfonatos nos ossos, superior a seis meses na espécie humana⁸⁷.

A chave da ação farmacológica clínica dos bisfosfonatos consiste na inibição da reabsorção óssea. Quando atingem a circulação, os bisfosfonatos são rapidamente excretados pelo rim¹²⁷. Pela afinidade à hidroxiapatita ocorre um depósito destes compostos onde o osso é exposto durante a sua aposição e reabsorção. Este mecanismo explica a ação farmacológica destes compostos nos tecidos mineralizados, especialmente no osso. Portanto, a liberação dos bisfosfonatos ocorre principalmente quando há a reabsorção do osso onde o bisfosfonato incorporou-se. Após dez anos de tratamento ativo pode-se detectar uma liberação de 25% da dosagem diária absorvida, dependendo do local do esqueleto^{39,127}.

A remodelação óssea otimiza a estrutura e forma do osso adaptando-o às demandas de forças mecânicas decorrentes da utilização do esqueleto, tanto em nível macro como microscópico. Este equilíbrio adaptativo às forças mecânicas ocorre tanto na cortical quanto no trabeculado ósseo, podendo ser denominado de homeostasia da massa óssea^{124,125}.

Pode-se afirmar que os bisfosfonatos promovem a longo prazo um aumento da massa óssea, tanto em animais quanto em humanos, pois a formação excede a reabsorção. Este aumento de massa óssea pode ser notado em um período relativamente rápido, aproximadamente de quatro a seis meses. Este

decréscimo em seu turnover permite que o osso neoformado tenha mais tempo para mineralizar-se, aumentando o nível mineral médio do osso^{38,39,127}.

As reações adversas mais comumente relatadas em decorrência da utilização dos bisfosfonatos incluem desconfortos gástricos e diarreia^{14,38,40}. Seu uso prolongado, segundo alguns relatos antigos utilizando altas dosagens, sugere a possibilidade de atrofia do timo e dos tecidos linfóides periféricos, com supressão do sistema imune⁴⁰, ao desenvolvimento de potencial nefrotóxico^{14,40}, urticárias, dores abdominais, dores de cabeça, infecções nas vias aéreas superiores²⁹, lesões pulmonares⁸⁷, tromboflebites e, paradoxalmente, à inibição da mineralização normal dos ossos, que por sua vez aumenta o risco de fraturas⁴⁰. A intoxicação aguda pode levar a quadros de hipocalcemia e seus efeitos variam de acordo com a velocidade da infusão⁴⁰. Altas doses do medicamento provocaram anemia, trombocitopenia e leucemia em animais de laboratório. Essas reações diversificam-se de acordo com o tipo de bisfosfonato utilizado, a dose administrada, o tempo de tratamento e a via de administração⁴⁰.

Milhões de pessoas são tratadas atualmente com bisfosfonatos por uma grande variedade de doenças ósseas^{124,125}. Estas drogas são utilizadas como medicamentos nas calcificações e ossificações ectópicas, calcificações dos tecidos moles, urolitíases, fibrodisplasia ossificante progressiva e nas doenças com grandes destruições ósseas como na Doença de Paget, no hiperparatireoidismo primário, na hipercalcemia maligna, na destruição óssea tumoral e a altamente prevalente osteoporose pós-menopausa^{19,20,35,38,40 46,65,66,115,121, 124,125,166}.

Há um mercado muito grande – aproximadamente sete milhões de dólares, em todo o mundo, em estimativas de 1998 – para os agentes que possam efetivamente influenciar o processo osteolítico⁹².

Em síntese, entre as indicações clínicas para a utilização dos bisfosfonatos incluem-se o^{104,124,125,149,154}:

- ⊙ Tratamento de osteoporose pós-menopausa;

- ⊙ Tratamento de mulheres pós-menopausadas com densidade total do osso do quadril abaixo de 650 mg/cm²;
- ⊙ Tratamento de homens idosos apresentando fraturas ósseas não traumáticas;
- ⊙ Pacientes com osteoporose secundária a terapias com corticosteróides;
- ⊙ Pacientes com doença de Paget;
- ⊙ Aumento da densidade óssea na fibrodisplasia;
- ⊙ Câncer de mama metastático;
- ⊙ Hipercalcemia maligna;
- ⊙ Tratamento de dor óssea;
- ⊙ Redução de complicações esqueléticas em pacientes com metástases ósseas ou mieloma múltiplo;
- ⊙ Alívio dos sintomas da osteogênese imperfeita; e
- ⊙ Outras doenças ósseas apresentando altos índices de reabsorção óssea.

Os efeitos dos bisfosfonatos incorporados ao osso^{104,149} podem ser assim relacionados:

- ⊙ Diminuição da reabsorção óssea;
- ⊙ Aumento da densidade de mineralização;
- ⊙ Aumento do volume e massa óssea¹²⁷;
- ⊙ Aumento da resistência óssea;
- ⊙ Diminuição do índice de fraturas ósseas;
- ⊙ Efeitos a longo prazo ainda desconhecidos.

2.2 Estudos específicos sobre o mecanismo de ação dos bisfosfonatos

Para verificar as possíveis alterações morfológicas dos clastos à microscopia de luz e eletrônica, decorrente da ação do Cl₂MDP (clodronato) e de seus efeitos finais sobre os mediadores celulares de reabsorção óssea, MILLER; JEE⁹⁶, em 1979, utilizaram 20 fêmeas Sprague-Dawley, divididas em dois grupos de 10 animais, nos quais administraram, diariamente, uma solução de

cloreto de sódio a 9% ou 20mgP/Kg, durante 10 dias consecutivos. Decorrido o tempo experimental, sacrificaram os animais, dissecaram suas tíbias, preparando-as para a radiomicrografia, a microscopia eletrônica de varredura e transmissão e a microscopia de luz. As análises demonstraram significativo aumento de massa de tecido mineralizado nas regiões das metáfises em decorrência da lenta reabsorção óssea. Em esplêndidas figuras de microscopia eletrônica de varredura observaram um aumento da área de reabsorção; contudo, nessa região as lacunas de Howship apresentavam-se com menores dimensões e menos definidas, quando comparadas às do grupo controle. A administração do clodronato provocou, paradoxalmente, aumento do número e do tamanho dos clastos, porém estes apresentavam suas bordas em escovas e seus vacúolos citoplasmáticos menores, sendo freqüente a observação de áreas claras, sugestivas de baixa atividade de reabsorção. Na maioria das vezes, apresentavam-se multinucleados. As observações ao microscópio de luz revelaram que as áreas em reabsorção, adjacentes aos clastos, se mostravam, geralmente, em menor tamanho nos animais tratados com a droga.

Os efeitos do clodronato e do pamidronato sobre a síntese de prostaglandinas em culturas de células da calvária foram verificados por FELIX; BETTER; FLEISCH³⁵, em 1981, durante seis dias experimentais. Os resultados demonstraram uma inibição de prostaglandinas em torno de 90% nos casos tratados com clodronato, em concentrações de 0,025 a 250µM, fato que sugere uma diminuição das reabsorções pelo clodronato associadas, em parte, à redução da síntese das prostaglandinas. Esse mecanismo, no entanto, não deve ser considerado como o único, uma vez que o pamidronato, um potente inibidor de reabsorção óssea, aumenta a produção de prostaglandinas. Além disso, a reabsorção óssea pode ser induzida por mecanismos independentes da produção de prostaglandinas. Essa ação sobre as prostaglandinas, se presente, não explica todos os efeitos do clodronato.

Para investigar o mecanismo de inibição da reabsorção pelo clodronato e pelo pamidronato, REITSMA et al.¹²¹, em 1982, utilizaram um sistema de cultura de macrófagos que permitiu a avaliação da atividade celular sobre o tecido ósseo tratado com bisfosfonatos. Os resultados indicaram que o pamidronato e o clodronato não alteraram o mecanismo de adesão da célula ao osso, mas, mesmo assim, inibiram sua capacidade de reabsorção óssea de maneira dose-dependente. No caso do clodronato, essa inibição ocorreu subsequente à absorção prévia da substância pelo tecido ósseo acumulado nas superfícies dos cristais. Essa ação sugere um efeito citotóxico. No caso do pamidronato, porém, a citotoxicidade só pôde ser observada nos casos de altas dosagens do bisfosfonato, sugerindo mecanismos diferentes de atuação das duas substâncias. Isto revela que cada droga do grupo dos bisfosfonatos deve ser estudada específica e individualmente.

Utilizando ratos Wistar-Furth de três dias de vida e submetendo-os a uma dose diária bastante elevada de 10mgP/kg de clodronato durante um mês, MILHAUD; LABAT; MORICARD⁹⁵ em 1983, observaram osteopetrose, retardo de irrupção dentária, sinais de raquitismo, peso diminuído do timo e baixa resposta de linfócitos T aos mitógenos. Estas desordens do timo associadas à reabsorção óssea defeituosa reforçam a hipótese de uma associação entre a atuação do timo e a remodelação óssea.

Ao considerarem paradoxal o aumento do número de clastos e a redução da reabsorção óssea em espécimes tratadas com diversos bisfosfonatos, MARIANI; ROWE⁹¹, em 1988, desenvolveram um modelo experimental, no intuito de averiguarem tal contra-senso. Utilizaram ratos Sprague-Dawley tratados com F₂MDP, clodronato e etidronato por períodos de 14 e 30 dias. Após os períodos experimentais, sacrificaram os animais e as suas tíbias receberam tratamento para a microscopia de luz. Os resultados encontrados demonstraram que, apesar de significativo aumento de tecido mineralizado após 14 dias de administração das drogas, o aumento do número de clastos só pôde

ser notado a partir do 30º dia. Nesta fase, a quantidade de tecido mineralizado apresentava-se menor quando comparada à encontrada no 14º dia.

Para explicar os resultados obtidos MARIANI; ROWE⁹¹ sugeriram que o aumento do número de clastos representava uma resposta ao aumento de tecido mineralizado, via algum tipo de mecanismo homeostático, na tentativa de se manter constante a quantidade de tecido ósseo. Os clastos observados nos grupos tratados apresentavam-se grandes e com vários núcleos, porém mantinham-se afastados das superfícies dos ossos, sugerindo não estarem envolvidos diretamente na reabsorção óssea. Observaram, ainda, uma correlação positiva entre a presença de clastos com a morfologia alterada e a diminuição da quantidade de reabsorção, sugerindo que as alterações degenerativas se encontravam envolvidas nos mecanismos pelos quais os bisfosfonatos inibem as reabsorções pelos efeitos diretos sobre o metabolismo das células ou como resultado da inabilidade de reabsorção ou de digestão do osso que contém o bisfosfonato.

O efeito de cinco tipos de bisfosfonatos sobre a formação dos clastos foi pesquisado por HUGHES et al.⁶³, em 1989. Em meio de cultura de células de medula óssea humana, os autores testaram o pamidronato, o clodronato, o etidronato, e o ácido 6-amino-1-hidroxihexilideno-1,1-bisfôônico (AHHexBP), observando seus efeitos sobre as células precursoras dos clastos. Dois desses bisfosfonatos, o pamidronato e o clodronato, não demonstraram efeitos inibitórios sobre a proliferação dos precursores celulares dos clastos; contudo foram eficientes na diminuição da proporção de células mononucleares e multinucleadas, fato que sugere uma certa especificidade com relação às células de linhagem clástica, o que pode estar relacionado à grande capacidade dos bisfosfonatos para inibir as reabsorções ósseas.

Para verificar os possíveis mecanismos de ação dos bisfosfonatos na inibição das reabsorções ósseas, CARANO et al.²⁰, em 1990, utilizaram culturas de clastos, nas quais testaram o etidronato, o clodronato e o pamidronato.

Observaram, dessa forma, uma supressão dose-dependente da atividade osteoclástica em todos os testes, verificando uma redução de 50% nas variações de dosagem compreendidas entre 500nM e 5nM, nos diferentes agentes. A capacidade de adesão dos clastos ao osso diminuiu em torno de 30 a 40% após 72 horas de tratamento, apesar da manutenção da viabilidade celular. Uma inibição significativa da reabsorção óssea só pôde ser observada após 24-72 horas. Ao utilizarem acridina laranja, notaram uma inibição da atividade osteoclástica decorrente da redução do transporte de prótons, sugerindo que os bisfosfonatos atuariam como inibidores metabólicos reduzindo a síntese das proteínas clásticas.

Os efeitos do pamidronato sobre os clastos isolados de ossos longos de ratos neonatais foram pesquisados por FLANAGAN; CHAMBERS³⁶, em 1991, em meios de cultura. Os resultados encontrados não incluem todos os efeitos dos bisfosfonatos avaliados *in vivo*. A incubação prévia de amostras de ossos em bisfosfonatos não demonstrou efeitos na desagregação dos clastos na reabsorção óssea, bem como, ao microscópio óptico e eletrônico de varredura, não se observaram alterações morfológicas nas células da osteoclasia. Esses resultados indicaram que o tratamento prévio das superfícies ósseas não é suficiente para provocar danos às células. A inibição das reabsorções ósseas deve-se, provavelmente, aos danos provocados aos clastos quando o pamidronato absorvido pelos ossos é liberado para o meio extra-ósseo. Assim sendo, afirmam que não é a concentração dos bisfosfonatos, mas, a sua densidade nas superfícies ósseas que determina os seus efeitos biológicos. Concluem que se pode aumentar significativamente a potência do pamidronato *in vivo*, se grandes quantidades da substância forem absorvidas pelas superfícies ósseas.

Em 1993, SAHNI et al.¹³², comprovaram a ação de cinco tipos de bisfosfonatos na inibição das reabsorções ósseas, em meios de cultura contendo osteoblastos e clastos pré-tratados com ácido 1-hidroxi-3(metilpentilamino)-propilideno bisfosfônico (BM 21.0955), pamidronato, clodronato, etidronato e

alendronato. Notaram que um maior efeito inibitório ocorria quando os osteoblastos haviam sido pré-tratados com bisfosfonatos, o que revelava uma ação indireta, nos clastos, mediada pelos efeitos sobre os osteoblastos. Concluíram que esses dois mecanismos de atuação - a ação direta sobre os clastos ou a mediada pelos blastos - ainda devem ser mais esclarecidos para se determinar a sua real importância *in vivo*.

Em um estudo laboratorial, HUGHES et al.⁶², em 1995, testaram os efeitos do risedronato, do pamidronato e do clodronato sobre a cultura de clastos. Os resultados mostraram que esses bisfosfonatos induziram modificações morfológicas características da morte programada das células ou apoptose. Essas observações laboratoriais foram confirmadas em estudos com animais, sugerindo que a apoptose pode ser o principal mecanismo pelos quais os bisfosfonatos reduzem o número e a atividade dos clastos.

Partindo da proposição de que os bisfosfonatos induzem os osteoblastos à secreção de um inibidor da reabsorção pelos clastos, VITTÉ et al.¹⁶⁰, em 1996, utilizaram culturas clásticas de ratos, sob a influencia de alendronato e ibandronato, onde também aplicavam osteoblastos. Concluíram que os osteoblastos produziam um inibidor da reabsorção clástica induzidos pelos bisfosfonatos.

Para avaliar as alterações ósseas decorrentes da administração, a longo prazo, do clodronato, LEPOLA et al.⁸⁴, em 1996, utilizaram 100 ratas Sprague-Dawley, nas quais injetaram, via subcutânea, doses de 0, 4, 12 ou 50mg/Kg desse bisfosfonato, a cada ciclo de quatro semanas, num período experimental de 25 semanas. O tratamento iniciou-se aos três meses de idade das ratas, estendendo-se até seus seis meses. A dose total do clodronato administrado representou 100mg/Kg nas dosagens baixas e 300mg/Kg nas altas, durante os ciclos completos. Para a determinação microscópica do grau de crescimento ósseo foram administradas, sistemicamente, duas doses de tetraciclina em intervalos de

sete e 14 dias antes dos sacrifícios (sic) dos animais. Testes de resistência mecânica foram realizados nas tíbias, fêmures e vértebras. Os resultados indicaram que, em relação ao ganho de massa e à resistência óssea, os efeitos mais benéficos da utilização, a longo prazo, do clodronato, ocorreram quando da aplicação de dosagens mais baixas. As altas dosagens diminuíram o grau de crescimento ósseo, sem interferir, porém, na qualidade da resistência mecânica.

Revisando então a apoptose clástica PARFITT et al.¹⁰⁷, em 1996 suportam-se em três elementos: 1) a remodelação óssea organiza-se no tempo e no espaço de forma igual no osso cortical e esponjoso; 2) a remodelação apresenta como regente principal os osteoblastos, ou seja, os osteoblastos são a base das BMUs. Este conceito é único para o osso esponjoso e cortical; 3) o clasto possui um tempo de vida curto em função da apoptose. O bisfosfonato aumenta 100 vezes a quantidade de apoptose e inibe a secreção clástica da IL-6, uma interleucina associada a osteoclastogênese, explicando os efeitos destas drogas nas funções da BMU¹⁰⁷. Os bisfosfonatos podem ser enquadrados em um grupo de drogas denominadas “*clast killer*”. Uma alteração da rede de mediadores ósseos locais ou sistêmicos provocando um descontrole dos clastos pode ser contida pelos bisfosfonatos.

Os odontoclastos são similares aos osteoclastos, assim objetivando observar alterações ao microscópio eletrônico e bioquímicas na apoptose de odontoclastos induzidas pelos bisfosfonatos, WATANABE et al.¹⁶³, em 2000 utilizaram células de coelhos com seis dias de vida, destacando-as da superfície dentinária de dentes decíduos. À microscopia eletrônica, os odontoclastos revelaram pouco desenvolvimento ou a perda das bordas ativas, uma redução do tamanho do complexo golgiense e a presença de vesículas citoplasmáticas numerosas. Encontraram também fragmentação apoptótica no DNA dos odontoclastos tratados com bisfosfonatos. As alterações observadas indicam que os bisfosfonatos também induzem a apoptose nos clastos associados à reabsorção dentária.

2.3 O alendronato

O alendronato é um aminobisfosfonato desenvolvido recentemente e apresenta um alto potencial em inibir a reabsorção óssea ^{2,11}. Este fármaco foi desenvolvido a partir da necessidade de se obter um bisfosfonato com alta atividade em inibir a reabsorção óssea com efeitos mínimos sobre a formação e mineralização óssea⁵⁶ e constituindo atualmente uma das drogas mais eficientes nos tratamentos de estados osteopênicos e osteoporóticos ^{39,69,74,75,106,127}

O alendronato foi o primeiro bisfosfonato a demonstrar a redução da incidência de fraturas ósseas em pacientes com osteoporose em uma grande amostra com mais de 60.000 pacientes por um período de três a quatro anos em um estudo prospectivo e duplo cego⁶⁹. Atualmente é o tratamento de escolha na doença de Paget, na hipercalemia maligna em pacientes cancerosos terminais, além de outras indicações^{124,125}.

Alendronato sódico

A faixa de potência dos bisfosfonatos é vasta. *In vivo* (ratos), o alendronato demonstrou uma potência até 1000 vezes maior que o ácido etidrônico (etidronato) para a inibição da reabsorção óssea ^{69,39}. Além disso, com relação à inibição da mineralização e potencial para a osteomalácia, o alendronato apresentou uma margem de segurança de pelo menos 1000 vezes maior sobre o ácido etidrônico. Apesar de mensuradas em ratos, as potências relativas são relatadas como muito similares em humanos ^{39,40,69}

LIN⁸⁷ apresentou uma revisão muito interessante afirmando que os bisfosfonatos representam uma classe única de drogas capazes de inibir a reabsorção óssea. A vida média dos bisfosfonatos no osso é muito longa e varia em diferentes espécies entre um a dez anos e depende sobremaneira do índice de turnover ósseo. Em função de suas propriedades físico-químicas únicas, a atuação do alendronato quanto à sua absorção e disponibilidade óssea, pode ser racionalmente extrapolada para os humanos. A dose ideal em humanos é de 10mg/dia. Esta predictibilidade para os bisfosfonatos permite que cientistas industriais desenvolvam novos compostos de bisfosfonatos.

Assim como outros bisfosfonatos, o alendronato possui um baixo índice de absorção. A bioviabilidade deste fármaco aumenta de forma dose-dependente, quando é administrado pela via bucal. Em ratos em jejum, o alendronato administrado bucalmente apresentou uma maior absorção em relação àqueles alimentados; sendo assim, recomenda-se a utilização do alendronato 30 minutos antes do desjejum e de preferência 60 minutos, antes de qualquer outro medicamento. O paciente deve evitar deitar-se por pelo menos 30 minutos após ingerir o comprimido, para reduzir o tempo de contato do alendronato com o trato gastrointestinal superior e para prevenir uma potencial irritação da mucosa⁶⁹. O alendronato, segundo LANZA et al.⁷⁸, não se associa às lesões microscópicas quaisquer no trato gastrointestinal em trabalhos comparativos com grupos placebo.

No intuito de aumentar a absorção desta droga, outras vias de administração foram utilizadas; a absorção pela via subcutânea foi quase completa, entretanto, dor e danos teciduais no local da injeção foram relatados. A absorção do alendronato ocorre predominantemente na região superior do intestino delgado⁸⁷.

Apesar da sua baixa biodisponibilidade após a administração bucal, o alendronato é altamente eficaz na prevenção da perda óssea associada à ausência

de estrógeno endógeno induzindo a um aumento mantido na massa óssea durante a terapia em animais e em humanos ^{69,127}. A diminuição dos níveis de reabsorção óssea pode ser determinada por exames como a fosfatase alcalina sérica, osteocalcina sérica e outros, após três meses de terapia com o alendronato⁶⁹.

O alendronato é distribuído a todos os tecidos calcificados e não calcificados do organismo, quando administrado intravenosamente. Sua eliminação é realizada pelos rins, sendo assim, análises desse órgão indicam grande concentração do alendronato nos seus tecidos ⁸⁷.

Em outro estudo a respeito do mecanismo de ação do alendronato em cultura de clastos de ratos recém nascidos e galináceos, SATO et al.¹³⁶, em 1991, sugerem que o alendronato ligado à superfície óssea é localmente secretado durante a acidificação na lacuna de Howship. Com o aumento de sua concentração na área, o alendronato é capaz de paralisar a reabsorção. A membrana clástica então, não mais se apresenta irregular, ativa ou em forma de escova, mas sem que haja destruição destas células.

O mecanismo de interferência na via do mevalonato constitui um mecanismo específico do alendronato, conforme demonstrado pela primeira vez em 1992, por AMIN et al.⁷. Esta habilidade é própria dos bisfosfonatos nitrogenados inibindo a FPP (“farnesyl diphosphate syntase”) que constitui uma enzima essencial para a organização do citoesqueleto e para o transporte vesicular nos clastos. A inativação desta enzima desencadeia a inativação destas células quando da administração do alendronato. A interferência na função desta enzima pode induzir a apoptose nos clastos.

Como parte de um estudo de carcinogenicidade, GUY et al.⁵⁶, em 1993, propuseram-se a avaliar os efeitos morfológicos e bioquímicos da terapêutica prolongada com o alendronato durante o amadurecimento e envelhecimento de ratos. A administração de alendronato por longo prazo aumentou

significativamente a força das vértebras e dos fêmures em ratos em crescimento quando da dosagem bucal diária de 1,0 ou 3,75mg/Kg por um período de 105 semanas. Aumentaram-se a máxima carga de compressão nas vértebras em até 96% e 80% dos valores de controle em ratos machos e fêmeas, respectivamente, sugerindo que o alendronato é eficaz na presença ou ausência de estrógeno. Análises morfológicas da terceira vértebra lombar revelaram uma acentuada diferença na fração do osso trabecular presente, com aumentos de até 67% e 53%, respectivamente, sobre os animais de controle, em ratos machos e fêmeas. Observaram uma rigidez à compressão vertebral significativamente maior em ratos tratados com esta mesma dosagem de alendronato, tanto machos quanto fêmeas. Os níveis de força sobre o fêmur também se apresentaram aumentados em um último teste para os machos, denotando a maior resistência adquirida por este osso. Esses resultados sugerem que o alendronato aumentou a força dos ossos pelo aumento da densidade óssea no nível das trabéculas sem efeitos colaterais ⁵⁶.

Testando a segurança e eficiência da utilização do alendronato por período prolongado, CHESNUT et al.²², em 1995, asseveraram a tolerabilidade do alendronato nas dosagens terapêuticas de 5 a 10mg/dia em 188 pacientes do gênero feminino pós-menopausadas entre 42 e 75 anos durante 2 anos, com suplementação de 500mg/dia de cálcio. Detectaram também que a redução dos níveis de reabsorção óssea implica em uma diminuição nos níveis séricos de cálcio e fosfato no tecido ósseo, juntamente com um aumento compensatório na secreção de hormônio paratireoidiano (PTH) e uma elevação nos níveis de 1,25-dihidroxitamina D. As reações adversas da utilização desse fármaco assemelham-se àquelas relacionadas a outros bisfosfonatos ⁶⁹.

TUCCI et al.¹⁵² em 1996, confirmaram em 478 mulheres pós-menopausadas osteoporóticas ingerindo alendronato por um período de 3 anos, sua excelente tolerabilidade em dosagem adequada. O perfil de aceitabilidade do alendronato demonstrou-se semelhante ao placebo. As mulheres submetidas à

dosagem de 10mg/dia com suplementação de 500mg/dia de cálcio não apresentaram maior frequência de efeitos adversos, exceto por suave dor abdominal, transitória e suave, facilmente resolvida com medicação. Demonstraram da mesma forma que CHESNUT et al.²² aumentos hormonais compensatórios de paratormônio e dihidroxivitamina D, pela diminuição da reabsorção óssea e dos níveis de cálcio e fosfato.

Investigando os efeitos profiláticos do alendronato em mulheres logo após a menopausa, EISMANN et al.³¹ apud JEAL; BARRADEL; MCTAVISH⁶⁹ a Merck Research Labs submeteram em ensaio comparativo duplo-cego, 447 mulheres com massa óssea normal (6 a 36 meses após a menopausa) receberam 1,5 ou 10mg/dia de alendronato por três anos, ou 20mg/dia por dois anos, seguido por placebo diariamente por um ano. Dados preliminares mostram que, em comparação com o placebo, o alendronato, dependendo da dose preveniu a perda de densidade mineral óssea. 10mg/dia de alendronato previniram significativamente a perda óssea na coluna e no colo femural. Além de aumentar significativamente a densidade mineral óssea dos pacientes com osteoporose, houve também uma redução significativa da dor, conforme medida por uma escala analógica visual e sem suplementação de cálcio⁶⁹.

Em clastos de coelhos *in vitro* e *in vivo* ITO et al.⁶⁸, em 1998, estudaram os efeitos citotóxicos do alendronato e do incadronato, utilizando vários testes enzimáticos. Em suas conclusões afirmaram-se que o alendronato, ao contrário do incadronato, não exerce nenhum efeito citotóxico nos clastos, seja *in vivo* ou *in vitro*.

Na azáfama de estudar o mecanismo de ação do alendronato e a elevada especificidade do mesmo à inibição da reabsorção óssea, os resultados de BERGSTROM et al.¹¹, em 2000 revelaram que o alendronato atua seletivamente na “farnesyl diphosphate syntase” na via metabólica do mevalonato. Isto, porém não ocorreu quando testaram o mecanismo de ação de outros bisfosfonatos.

Após sua ingestão ou administração parenteral, o alendronato desaparece rapidamente da circulação, pois em humanos 50% incorporam-se no osso ou são excretados na urina. Após a obtenção da zona de selamento na superfície óssea, os clastos secretam ácidos e dissolvem o conteúdo mineral. Durante este processo os bisfosfonatos são liberados do osso e podem atingir altas concentrações em nível micromolar. Recentemente, demonstrou-se que desta forma os clastos internalizam os produtos minerais e ao mesmo tempo os bisfosfonatos.

A Osteogênese Imperfecta (OI) é um distúrbio hereditário do tecido conjuntivo caracterizado por osteopenia, fraturas recorrentes e deformidades ósseas. Os bisfosfonatos parecem constituir terapêutica eficiente em crianças¹⁸, mas há poucos dados sobre o uso dessas drogas em adultos com OI. Em 2001, DONANGELO; COELHO; FARIA³⁰ descreveram o caso de uma paciente de trinta anos com OI e múltiplas fraturas até a puberdade. Durante a primeira gestação as dores ósseas retornaram, agravando após o parto. Como os marcadores bioquímicos sugeriam altas taxas de remodelação óssea, foi administrado alendronato sódico 10mg ao dia. Em poucos meses houve melhora das dores ósseas. Após o primeiro ano, a densidade mineral óssea aumentou em 10,8% na coluna lombar (CL) e 2,3% no colo femural (CF). Ao final do terceiro ano, o ganho total foi de 21,7% em CL e 10,9% em CF, sugerindo que o alendronato seja boa opção terapêutica em adultos com Osteogênese Imperfeita.

Estudando comparativamente os efeitos da calcitonina, fluorfosfato e alendronato em ratas ovariectomizadas GIAVARESE et al.⁵¹, em 2001 concluiu que há uma prevenção da reabsorção pelo alendronato, mas o osso mantinha suas características estruturais e mecânicas normais.

Mais recentemente atribui-se ao alendronato a inibição da osteoclasia por meio da interferência nas vias metabólicas do mevalonato, que ativa enzimas intracelulares associadas ao transporte de material reabsorvido em forma de

vesículas intracelulares. ALAKANGAS et al.², em 2002, no afã demonstrar esta via de atuação do alendronato utilizou-se de culturas de clastos nas quais fatias de osso eram inseridas em um primeiro grupo controle. Nos dois demais grupos experimentais embebiam-se as fatias ósseas em soluções de alendronato e de clodronato, respectivamente. Verificaram que a inibição da reabsorção óssea pelo alendronato coincide com o acúmulo de fosfatase ácida e de material eletrodense no interior das vesículas clásticas. O alendronato induz ainda, alterações nas zonas de selamento alargando-as e tornando incompleta a união das bordas ativas com o osso. Os clastos pareciam apresentar-se soltos do osso, embora próximos à superfície. A inibição da reabsorção no experimento não se relacionou com a diminuição do número de clastos, mas sim com a sua atividade. Nas fatias de osso embebidas em clodronato havia menos clastos. Para os autores os resultados sugerem que o alendronato inativa os clastos por interferir nos mecanismos vesiculares de transporte intracelular e consideram a apoptose apenas um fenômeno secundário na diminuição da reabsorção óssea (**Figura 3**).

Em 2003, avaliando a formação ou a reabsorção óssea sob ação do alendronato sistêmica ou localmente administrado em condições similares às técnicas de enxerto como as de medula óssea, de materiais aloplásticos e de matriz óssea extracelular, YAFFE et al.^{174,177}, conduziram uma investigação envolvendo 64 ratos. Em um dos dois grupos principais colocaram medula óssea em cilindros de fêmur de rato desmineralizado implantando-os subcutaneamente com o objetivo de formar novo osso. No outro grupo, adotaram-se os mesmos procedimentos, mas os animais recebiam endovenosamente o alendronato na forma de 100µl de solução com 1,5mg/ml de alendronato, correspondente a 0,5mgP/Kg, pelo período de uma a cinco semanas, por via bucal. Quando da injeção do alendronato por até cinco semanas constataram um aumento da formação óssea ectópica de 60 a 166%, quando comparado ao com o grupo controle. Os resultados da microscopia óptica sugerem que o alendronato é

efetivo na inibição da perda óssea e deve ser administrado para casos em que haja a expectativa de reabsorção óssea.

Figura 3 - Imagens do artigo de ALAKANGAS et al.², de 2002 apresentando lacunas de Howship de reabsorções ósseas normais (A); reabsorções de osso incorporado com alendronato (B) e com clodronato (C). As reabsorções ósseas sob condições normais apresentam uma configuração tipicamente complexa (A). Quando da incorporação dos bisfosfonatos observam-se reabsorções simples e arredondadas (B e C). Observa-se o clasto com suas bordas ativas e vesículas repletas de mediadores, aderido à superfície óssea (D). O segundo clasto (E) apresenta-se “despregado” do osso, com bordas inativas.

2.4 Efeitos dos bisfosfonatos nos tecidos dentários e circunjacentes

Os estudos dos diversos tipos de bisfosfonatos na região bucal demonstraram a sua influência no controle da perda óssea causada por doença periodontal^{19,56,83,102,115,131,138,166,172}, na formação de cálculos dentários, na ancoragem e na recidiva de movimentos ortodônticos^{1,66,162}, nas alterações do

desenvolvimento do cimento do esmalte e da dentina^{3,4,5,9,19,46,47,48,65,99,117,141,164} e nas alterações do periodonto com indução a anquiloses dentoalveolares transitórias^{56,167,169,172}.

Vários modelos de estudos de interesse odontológico foram realizados utilizando os bisfosfonatos focalizando o desenvolvimento dentário, observando a influência destas drogas, na liberação de flúor⁹⁰, na erupção dentária⁵⁴, no esmalte, na dentina e na cárie dentária^{9,16,34,46,47,48,79,101,133,146,164,165}; na cirurgias e na doença periodontal^{13,19,71,72,83,115,138,166,176}, nos traumatismos e em procedimentos cirúrgicos em geral^{6,71,72,117}; comprovando também o efeito antimicrobiano dos bisfosfonatos^{55,88,172}. Os principais trabalhos a respeito dos efeitos dos bisfosfonatos nos tecidos dentários e circunjacentes apresentam-se descritos a seguir:

Os efeitos do etidronato nos processos de remineralização do esmalte dos dentes foram avaliados experimentalmente por MÜHLEMANN; AESCHBACHER⁹⁹ em 1970. Um total de 20 pré-molares extraídos e submetidos a uma pré-avaliação comparativa da microdureza das áreas com lesões tipo manchas brancas e normais foram divididos em dois grupos. No grupo experimental 1 (n = 10) os dentes foram tratados com solução de etidronato, numa concentração de 0,5% P e pH 5,2, durante 10 minutos, e lavados em água destilada por 5 minutos. O grupo 2 (n = 10) serviu como controle permanecendo em água destilada durante os mesmos tempos experimentais. Após esses procedimentos, os dentes dos dois grupos foram colocados em solução remineralizadora por um período de 24 horas, a 37°C e em pH 7. Subseqüentemente, os pesquisadores remensuraram a microdureza das áreas selecionadas e notaram a completa inibição dos processos de remineralização dos dentes do grupo tratado com etidronato, mesmo tendo sido lavados durante cinco minutos.

Para verificar, *in vitro*, a influência dos pirofosfatos e dos bisfosfonatos na absorção do flúor pela hidroxiapatita, REGOLATI; HOTZ¹¹⁶, ainda em 1970,

prepararam suspensões de 100mg de hidroxiapatita, pré-tratadas, ou não, com etidronato, dissolvido em 5ml de água destilada, durante 24 horas, e acondicionadas em tubos plásticos para centrífugas. Decorrido o tempo inicial, adicionaram 5ml de uma das seguintes soluções testes: solução de fluoreto de sódio, solução de fluoreto de sódio e etidronato, solução de fluoreto de sódio e pirofosfato ou água destilada adicionada às suspensões previamente preparadas. Os pesquisadores, então, incubaram novamente as amostras durante duas horas em banho de água a 37°C, em constante agitação, centrifugaram e retiraram os sobrenadantes. Os sedimentos foram colocados, outra vez, em suspensão de 20ml de água destilada e, de novo, centrifugados. Após quatro banhos, os sedimentos foram secos e os autores pesaram 20mg deles para serem dissolvidos em 2ml de ácido perclórico 2N. A partir daí, foi determinado, nas amostras a quantidade de flúor, de fósforo e de cálcio. Os resultados demonstraram que a absorção do flúor pela hidroxiapatita diminuiu significativamente quando exposta, simultaneamente, ao fluoreto de sódio associado ao pirofosfato e ao etidronato. Verificaram-se, ainda, menor absorção do flúor quando a hidroxiapatita era pré-tratada com etidronato e, posteriormente, exposta ao flúor, sugerindo que o mecanismo de ação mais provável dos pirofosfatos e do etidronato na absorção do flúor se encontra no bloqueio dos centros de reação da hidroxiapatita.

Investigando os efeitos do etidronato na incidência de cáries, na absorção do flúor e no grau de dissolução das superfícies dos molares de ratos, REGOLATI; MÜHLEMANN¹¹⁷, também em 1970, aplicaram topicamente soluções de flúor e de etidronato, isolados ou associados, em 22 ratos, diariamente, durante um período experimental de 42 dias. Nesse período, os animais recebiam água e dieta cariogênica *ad libitum*, sendo avaliados clinicamente nos 10º e 20º dias experimentais. Os resultados demonstraram uma grande inibição da formação de cálculo gengival no grupo tratado com etidronato isolado ou associado ao flúor. A solubilidade da superfície dos molares diminuiu

nos grupos tratados com o etidronato e o flúor. Além disso, ambos os grupos demonstraram efetividade na redução das cáries de fissura e de superfície de esmalte, bem como um aumento dessa efetividade quando administrados simultaneamente. Em relação à retenção do flúor, notaram um aumento da liberação desse íon do esmalte quando foi administrado concomitantemente ao bisfosfonato, e uma grande diminuição dessa liberação após a administração de etidronato isoladamente.

Mesmo sabendo que os suplementos alimentares adicionados à água podem modificar os hábitos de alimentação e bebida de animais de laboratório, o que acaba influenciando os resultados de pesquisas sobre cáries dentárias, REGOLATI; SCHMID; MÜHLEMANN¹¹⁸, em 1970, decidiram estudar a influência da adição de bisfosfonatos e de pirofosfatos na água, isolados ou associados ao flúor. Um total de 12 ratos, com idade entre 19 a 22 dias de vida, foi avaliado durante 20 dias, período em que se controlou, diariamente, a quantidade de ingestão de água dos animais. No final do período experimental, os pesquisadores realizaram uma avaliação comparativa dos pesos inicial e final. Os resultados encontrados demonstraram que a adição do etidronato na água não alterou os hábitos de bebida dos animais, tanto na concentração de 100 quanto na de 500ppmP. Porém, na concentração de 500ppmP observaram alterações nos pesos dos animais. Além disso, notaram uma grande diminuição na quantidade de formação de cálculo gengival. Apesar de não representar o objetivo inicial da pesquisa, a grande diferença encontrada no grau de formação de tártaro sugeriu novas investigações a respeito da influência dos bisfosfonatos nos processos de cárie, erosão, mineralização de cálculos e inflamação gengival.

Neste mesmo ano, MÜHLEMANN et al.⁹⁸ testaram a influência do etidronato na formação do cálculo gengival. Forneceram a substância, numa concentração de 0,125% P incorporada a uma pasta de dente, a 24 indivíduos na faixa etária compreendida entre 22 e 30 anos. Outras três pastas de dentes foram igualmente fornecidas, sem, contudo, adição do bisfosfonato. Para se evitarem

resultados cruzados, cada grupo recebeu um tipo de pasta para ser utilizada durante uma semana. Ao final de quatro semanas, todas as pastas haviam sido testadas por todos os grupos. A cada período experimental de uma semana, foram avaliados a formação de cálculo, o peso seco dos cristais e seu grau de mineralização. Como resultado, observaram a inibição pelo etidronato da formação de cálculo nos pacientes susceptíveis à sua rápida formação, aparentemente sem interferir no seu grau de mineralização. Nos pacientes em que essa formação se processava mais lentamente, o etidronato demonstrou pouco efeito no peso do cálculo, mas notou-se menor grau de mineralização. Os autores sugeriram maiores pesquisas no sentido de diferenciar os efeitos do etidronato no crescimento de vários cristais de fosfato de cálcio e sua influência nos processos de cáries dentárias e erosões, antes da sua utilização rotineira como agente antitártaro.

Numa avaliação da sua ação sobre as culturas de estreptococos bucais, sobretudo da sua influência no crescimento total das culturas, o pH terminal e a quantidade total de ácido produzido por *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivaris* e *S. mitis* foram avaliadas em culturas que continham diferentes concentrações de etidronato - 625, 125, 25, 5 e 0 µg/ml - por GUGGENHEIM⁵⁵, também em 1970. Os resultados encontrados mostraram que as reações observadas se apresentavam bastante discretas, não afetando decisivamente a população de estreptococos bucais. Somente a cultura de *S. salivaris* demonstrou diminuição de suas atividades metabólicas nas concentrações de 125 µg/ml. O crescimento e a produção de ácido nessa cultura foram completamente inibidos quando a concentração foi de 625 microgramas/ml.

Com o intuito de verificar os efeitos dos bisfosfonatos na formação dos cálculos dentários de 64 indivíduos caracterizados como susceptíveis à formação de tártaro, STURZENBERGER; SWANCAR; REITER¹⁴⁴, em 1971, incorporaram 3% de etidronato dissódico em dentifrícios, fornecendo-as a esses indivíduos, para utilização sem restrições. Após seis meses de investigação, o

estudo duplo-cego demonstrou que o produto testado promoveu significativa proteção contra o desenvolvimento de novos cálculos. Além disso, após oito semanas de uso das referidas pastas, comprovou-se a eficácia do bisfosfonato na remoção de significantes quantidades de cálculos pré-formados. Nenhum efeito adverso aos tecidos bucais foi notado.

Verificando a efetividade do clodronato na prevenção das reabsorções dos implantes ósseos, ROSENQUIST; BAYLINK¹³⁰, em 1978, utilizaram 344 ratos, divididos em três grupos, que receberam uma dose de 0,035 partes/10⁶ de flúor por peso seco, adicionados à alimentação. O grupo 1 serviu como controle; o 2 recebeu diariamente a administração subcutânea de clodronato, na concentração de 0,5mgP/Kg; e o 3 uma complementação de flúor adicionado à água, na concentração de 100 partes/10⁶. Após uma semana os três grupos receberam a administração, via intraperitônio, de isótopos radioativos sendo uma de 1 µCi/Kg de ³H-prolina, dividido em três doses durante três dias consecutivos, e uma de 40 µCi/Kg de ⁴⁵Ca, usada no último dia. Decorridas quatro semanas após a injeção dos marcadores ósseos sacrificaram (sic) os animais e suas escápulas foram retiradas sendo que, uma foi preparada para análise da atividade atômica e a outra, implantada via subcutânea nas costas de ratos receptores, da mesma linhagem dos doadores. Depois de permanecerem quatro semanas em posição, esses implantes foram retirados e, neles analisadas, por espectrometria, a concentração e a atividade do cálcio radioativo presente, tendo como parâmetro as demais escápulas armazenadas. Os resultados indicaram uma perda de aproximadamente 30 a 40% da atividade, o que reflete uma considerável perda de osso. Contudo essa perda apresentou-se, estatisticamente, menor no grupo tratado com o clodronato, enquanto o aumento do flúor não afetou as reabsorções.

Em 33 ratos divididos em três grupos experimentais, LEONARD; REESE; MANDEL⁸³, em 1979, compararam os efeitos de dois tipos de bisfosfonatos sobre a perda óssea alveolar. Após 35 dias de alimentação com

dieta pastosa, 0,1ml de soluções de etidronato e de clodronato, numa concentração de 4mg/Kg de peso, dissolvida em cloreto de sódio a 0,9%, foram administradas via subcutânea durante 10 dias consecutivos. Decorridos 15 dias da última injeção, os animais foram sacrificados e suas mandíbulas preparadas para a avaliação microscópica. Os resultados confirmaram que o clodronato apresentou maior eficiência na prevenção da perda óssea alveolar de ratos susceptíveis à doença periodontal. No entanto, os autores recomendaram estudos mais aprofundados dos efeitos e da segurança do uso dessas drogas, antes da sua utilização rotineira em humanos.

Os efeitos do clodronato no controle das doenças periodontais avançadas e a sua ação nos processos inflamatórios associados às doenças periodontais foram testados em um modelo experimental com ratos por GOTCHER⁵², em 1981. Um total de 76 ratos jovens (*Oryzomys palustris*), de ambos os gêneros e com 21 dias de vida, foi tratado durante seis, 12 e 18 semanas com injeções diárias, subcutâneas, nas dosagens de 0 (controle); 0,1; 1,0; e 10mg/kg/dia de clodronato. Decorrido o período experimental, os animais foram sacrificados e suas mandíbulas e tíbias preparadas para a microscopia óptica e radiomicrografias. Os resultados comprovaram que nas mandíbulas dos animais com pouca ou nenhuma doença periodontal não ocorreram diferenças em relação ao grupo controle. Quando, porém, já existiam grandes destruições teciduais, os grupos tratados com 1,0 e 10mg/Kg/dia de clodronato manifestaram menores perdas ósseas e maior quantidade de osso remanescente. Nas metáfises das tíbias, observou-se o aumento da massa óssea, notadamente nas concentrações de 1,0 e 10mg/Kg/dia e, após 12 e 18 semanas, esse aumento também pôde ser verificado nas concentrações de 0,1mg/Kg/dia. Os animais tratados com clodronato demonstraram, além disso, menores espaços vasculares, menor número de fibroblastos no período inicial, menor número de blastos em todas as dosagens nos períodos de 12 e 18 semanas e uma diminuição das

atividades proliferativas dos fibroblastos, em todos os períodos experimentais, nas dosagens diárias de 10mg/Kg.

No intuito de verificar a efetividade do clodronato na inibição da reabsorção das paredes dos alvéolos pós-extração e de determinar o intervalo de administração mais efetivo, OLSON; HAGEN¹⁰², em 1982 utilizaram 40 ratos Sprague-Dawley, divididos em quatro grupos, aos quais administraram a droga, via subcutânea, numa concentração de 10mg/Kg/dia, em intervalos que variaram de sete dias pré-extração até 27 dias pós-extração. Ao grupo controle, administraram uma solução salina. Os resultados microscópicos denotaram que o clodronato se mostrou efetivo na inibição da rápida perda do osso alveolar após a extração. Além disso, esse efeito revelou-se específico nas áreas cirúrgicas, uma vez que, nas áreas intactas, não se observaram diferenças em relação ao grupo controle. A efetividade apresentada pelos grupos tratados somente antes das extrações demonstrou que os efeitos da terapia não são imediatamente reversíveis após a sua descontinuidade.

Considerando a hipótese de que um importante fator na iniciação da reabsorção dentária pode ser a presença de material mineralizado na superfície radicular e a sua fagocitose após um traumatismo, WESSELINK; BEERTSEN¹⁶⁷, em 1983, testaram a utilização de bisfosfonatos em incisivos de ratos congelados como modelo experimental. Procedeu-se administrando a dose de 10mgP/Kg/dia e com o congelamento do periodonto dos incisivos dos animais acreditando prevenir depósitos de minerais na superfície do dente reimplantado. O bisfosfonato etidronato foi utilizado em período de dois a 31 dias. Após 24 horas e um mês da última injeção da droga, os animais foram mortos e os tecidos processados para análise à microscopia ótica não evidenciando depósito de material mineralizado na superfície radicular e detectando-se muito pouca reabsorção. Grandes quantidades de matriz óssea estavam depositadas nos espaços interperiodontais e promovendo posterior anquilose alveolodentária. Um mês depois, nenhuma camada de tecido

mineralizado estava presente na superfície radicular, mas as reabsorções ocupavam 40% da superfície cementária. Nos animais tratados com solução salina este índice é de 60%. A interpretação dos resultados pelos autores em questão concluiu que o tratamento com o etidronato diminuiu a reabsorção, mas não a preveniu.

Verificando a disponibilidade e a liberação do flúor quando da influência dos bisfosfonatos, MAHESHWARI et al.⁹⁰, em 1983, observaram que além de não interferir na liberação de flúor os bisfosfonatos diminuíram a excreção de fluoreto aumentando o tempo de flúor disponível no sangue e tornando a excreção mais lenta.

A ação dos bisfosfonatos sobre a dentina em formação e a sua relação estrutural com o desenvolvimento das inserções das fibras periodontais tornaram-se objeto de um estudo de BEERTSEN; NIEHOF; EVERTS⁹, realizado em 1985, em incisivos em contínuo desenvolvimento. Os 32 ratos com idade de um mês foram divididos em oito grupos de quatro animais cada um, aos quais os pesquisadores, administraram, diariamente, uma solução de etidronato nas doses de 2, 4, 6, 8, 10, 14 e 18mgP/Kg, durante 10 dias. Os animais do grupo controle receberam a administração de solução de Ringer, diariamente, durante todo o período experimental. Decorridas 24 horas após a última injeção todos os animais foram mortos e suas mandíbulas dissecadas para posterior preparo das peças. Nesse momento, dividiram o material em dois subgrupos (A e B) que continham as mandíbulas de dois animais tratados com todas as dosagens da droga. O subgrupo A serviu para a determinação, à microscopia eletrônica, dos efeitos do etidronato na mineralização dos tecidos o subgrupo B foi utilizado para avaliações histomorfométricas, sendo os cortes microscópicos corados com azul de metileno e observados à microscopia de luz. Paralelamente a esse experimento principal, os pesquisadores desenvolveram mais dois trabalhos para investigações mais acuradas sobre o efeito do etidronato no desenvolvimento do periodonto e da dentina. No segundo experimento, os

autores⁹ utilizaram mais 30 animais, divididos em dois grupos, e à metade deles administraram diariamente e por via subcutânea, 10mgP/Kg, durante 13 dias. Após o sacrifício das cobaias, prepararam as porções basais das suas mandíbulas para a microscopia eletrônica. No terceiro experimento, observaram os efeitos do etidronato sobre a absorção e a deposição de ³H-serina na dentina. Utilizando 10 animais divididos em dois grupos, injetaram, então, em todos eles, por via subcutânea, 10mgP/Kg, durante sete dias. Decorridas 12 horas da última injeção administraram-lhes uma substância radioativa sendo mortos 24 horas depois. A porção basal das suas mandíbulas, contendo 4mm da região apical dos incisivos foi preparada e radioautografada, durante um mês, à temperatura de 4°C. Os resultados evidenciaram que, em doses inferiores à 8mgP/Kg, ocorreram não apenas a inibição da deposição dos cristais de minerais na dentina recentemente formada, como também uma completa paralisação da formação da camada de cemento acelular. Notaram que a droga interferiu na deposição de ³H-serina na região de interface pré-dentina-dentina, mas sem alterar a mineralização da dentina, fato sugestivo de que as proteínas que contêm essa substância - presumivelmente as fosfoproteínas - não desempenham um papel crítico na deposição de camadas minerais sobre aquelas previamente formadas. A ausência da camada de cemento não alterou o desenvolvimento do ligamento periodontal, que estabeleceu conexão com as camadas de análogos de dentina nas raízes. Finalmente, os autores⁹ observaram que a droga apresentou efeitos distintos na formação dos análogos da dentina nas regiões da coroa e da raiz. Enquanto os odontoblastos encontrados nas regiões da dentina das coroas continuaram a produzir matriz dentinária ao redor da polpa, os situados na região das raízes só produziram matriz nas áreas onde a camada de dentina superficial havia sido mineralizada antes da administração do etidronato, o que indica a existência de uma diferença na formação da dentina da coroa e da raiz.

A fim de investigar os efeitos do clodronato sobre a concentração de minerais do esmalte e dos ossos de cobaias e de determinar os padrões de

normalidade desses minerais, HYVÖNEN; HANHIJÄRVI; AHOSILTA⁶⁵, em 1986, utilizaram 32 animais, divididos em quatro grupos, aos quais administraram, por via bucal, respectivamente, 0, 100, 300 e 1000mgP/kg diariamente, em dose única, durante um período experimental de seis meses. As concentrações do flúor e do magnésio do esmalte foram obtidas pela técnica da biópsia de esmalte por ataque ácido, segundo método descrito por Hotz, em 1972. Determinaram as concentrações ósseas de cálcio, fósforo, flúor, magnésio, carbonatos e citratos por meio de análises de biópsias excisionais de cristas do ilíaco, sendo os valores calculados para o osso seco. As proporções entre cálcio/fósforo e cálcio/magnésio, por sua vez, foram determinadas para o esmalte e os ossos. No esmalte, a diminuição da concentração do magnésio mostrou-se dose-dependente, bem como a proporção cálcio/magnésio. Por outro lado, notou-se o aumento da proporção cálcio/fósforo. Nos ossos, o aumento da concentração do flúor revelou-se significativo e o aumento da proporção cálcio/magnésio, dose-dependente. Esses resultados sugeriram uma interferência do clodronato nos ciclos de desmineralização e mineralização do esmalte, por influência sobre o magnésio, diminuindo sua concentração no mineral. Concluíram que o clodronato não influencia na cinética do fluoreto.

Para verificar o efeito de diversos tipos de bisfosfonatos sobre o esmalte em formação, SIMMELINK¹⁴¹, em 1987, utilizou ratos Sprague-Dawley, com cinco dias de vida, nos quais injetou, via subcutânea, o etidronato, o pamidronato, o clodronato ou uma solução salina. A concentração das drogas variava de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0mgP/Kg. Um total de 48 animais, divididos em quatro grupos, recebeu uma única dose das drogas e foi sacrificado 24 horas após a sua administração. Suas maxilas dissecadas receberam tratamento para a microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Como um suplemento, mais quatro animais receberam durante 14 dias a administração diária do etidronato, na concentração de 5mgP/Kg. Após 24 horas da última injeção, o autor sacrificou os animais e preparou o terço apical dos seus incisivos superiores para

a microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados da microscopia óptica revelaram, como já esperado, a formação de cistos subameloblásticos, indicativos de severas alterações celulares. No entanto, verificaram maiores danos nos animais tratados com o etidronato e o pamidronato, na concentração de 2,5mgP/Kg, se comparados aos tratados com clodronato. Além disso, quando observados ao microscópio eletrônico, notaram distúrbios na formação dos cristais, na sua maioria similares aos originados por excesso de flúor, o que sugere uma toxicidade celular não-específica. Porém alguns efeitos sobre o crescimento dos cristais parecem ser específicos dos bisfosfonatos. Nos incisivos foram observados vários anéis indicativos de inibição e retorno à normalidade dos processos de formação e maturação do esmalte. Cada anel apresentou, aproximadamente, 2-3µm de espessura.

Conhecendo a propriedade dos bisfosfonatos de inibir as reabsorções ósseas, SCHMIDT; HOWE¹³⁸, em 1987, procuraram verificar a influência da administração do F₂MDP no controle da perda do osso alveolar nas doenças periodontais induzidas em ratos com 21 dias de vida. Um total de 12 machos e seis fêmeas, divididos em três grupos, foram submetidos a uma dieta considerada patogênica para o periodonto e receberam durante 12 semanas a administração subcutânea de uma das seguintes soluções: solução salina a 0,9%; solução de 10mg/Kg de clodronato ou solução de 10mg de F₂MDP/Kg. Decorrido o tempo experimental, os pesquisadores sacrificaram os animais, dissecaram suas mandíbulas, dividindo-as na linha mediana, e prepararam-nas para a análise macroscópica e microscópica de luz. Os resultados macroscópicos indicaram que no grupo controle ocorria doença periodontal e perda de osso em maiores proporções que nos grupos controlados pelas drogas. Nos grupos tratados, notaram que a crista alveolar se apresentava mais próxima da junção amelocementária, e que o grupo medicado com clodronato demonstrou maior efetividade. Os cortes microscópicos das regiões interproximais revelaram grande destruição tecidual no grupo não-tratado, que contrastou com os demais,

em que se observaram as fibras colágenas do tecido conjuntivo proeminentes e um contorno do osso alveolar regular, com a margem da crista alveolar localizando-se próxima à junção amelocementária.

Os efeitos do clodronato nos processos de remodelação óssea durante a migração fisiológica dos molares de ratos e no crescimento da maxila, tornaram-se objetivo de estudos de HARDT⁵⁷, em 1988. Um total de 30 ratas recém-nascidas foi dividido em cinco grupos, três controles e dois experimentais. Em um grupo controle, sacrificaram-se os animais quando estes completaram 10 semanas de vida. Nos demais grupos controle administraram-se soluções salinas, via subcutânea, a partir da 10^a semana de vida e até a 12^a e 20^a, quando, então, foram também sacrificados. Nesses grupos, injetaram marcadores ósseos fluorescentes nos intervalos de, respectivamente, oito e dois dias antes dos sacrifícios. Nos grupos experimentais, além da administração dos mesmos marcadores fluorescentes, injetaram diariamente e por via subcutânea, 10mg/Kg de peso de clodronato, durante o mesmo período experimental. Em seguida, secções verticais sobre as raízes linguais dos molares superiores mineralizados e desmineralizados foram preparadas para a histomorfometria. Os graus de aposição óssea, a atividade remodeladora e a população de células ósseas foram quantificados pela análise das regiões de reabsorção e pela aposição óssea no osso alveolar e nas corticais. O grau de inclinação dos primeiros molares foi igualmente calculado. Os resultados encontrados pelo autor HARDT⁵⁷ demonstraram maior movimentação espontâneo dos primeiros molares, o que sugere um estreitamento do osso na porção interdentária relacionada à idade. O bisfosfonato diminuiu a atividade de remodelação nas superfícies de reabsorção do osso alveolar, independentemente do aumento transitório de clastos, assim como reduziu o número de osteoblastos e o grau de aposição óssea nas superfícies de deposição do osso alveolar. Contudo não se observaram efeitos no número de blastos e de aposição óssea nas áreas corticais. Esses resultados reforçam os conceitos de que o clodronato influencia a formação óssea

indiretamente, por meio de um mecanismo de ligação entre formação e reabsorção óssea.

Objetivando avaliar o distúrbio do desenvolvimento do molar do rato induzido pelo etidronato e o clodronato, FOUDA, CARACATSANIS e HAMMASTROM⁴⁷ realizaram em 1989 experimentos em ratos Sprague-Dawley de ambos os gêneros. Em um primeiro experimento, 55 ratos receberam pela via subcutânea doses únicas de 10 mg P/Kg do etidronato ou clodronato, e em cinco ratos controles não foi administrado nenhuma substância. Todos os ratos foram mortos após seis horas, 24 horas, dois dias, quatro dias, ou sete dias. No segundo experimento, foi administrada dose única de 10mgP/Kg do etidronato ou clodronato em grupos de três ratos com três, quatro, cinco, seis ou sete dias de idade. Em dois animais controles não foi administrada nenhuma substância. Na tentativa de demonstrar os efeitos de injeções múltiplas desses bisfosfonatos sobre os molares do rato, foi realizado um terceiro experimento em 50 ratos com cinco dias de idade. Esses ratos receberam as mesmas doses utilizadas nos experimentos anteriores, porém, administradas por três dias consecutivos e foram mortos 24 horas após a última administração da droga. Após a decapitação, todos os espécimes foram preparados para posteriores análises. Um experimento adicional foi realizado para estudar os efeitos nas superfícies do esmalte da administração múltipla ou única do clodronato ou etidronato. Neste experimento foram administradas subcutaneamente 10 mg P/Kg em ratos com 15 dias de idade. Após 15 dias, os ratos foram mortos e seus primeiros molares superiores foram removidos da maxila, preparados e analisados em microscopia eletrônica. As administrações múltiplas e únicas dos bisfosfonatos causaram alterações no desenvolvimento do esmalte e da dentina. No esmalte foram observados a formação de cistos subameloblásticos, depósitos calcificados e hipoplasias nas áreas císticas. Os efeitos mais profundos provocados na dentina parecem estar mais associados ao etidronato. Segundo os autores notou-se na pré-dentina uma zona escura a qual necessita ser elucidada. A análise em

microscopia eletrônica das superfícies de esmalte dos molares irrompidos revelou a formação de lesões hipoplásicas localizadas preferencialmente no lado mesial das cúspides. A diversidade dos efeitos dos bisfosfonatos pode indicar que sua ação no desenvolvimento do esmalte é originada da toxicidade celular não específica; e nos outros tecidos dentários duros parece ser um mecanismo mais específico.

No mesmo ano, OGAWA et al.¹⁰¹ avaliaram os efeitos da administração do etidronato no processo de formação e mineralização da matriz dentinária. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley distribuídos em grupos experimentais e controle. Nos animais dos grupos experimentais doses de 0,5, 1, 2, 5, 10, 15 ou 30 mg P/Kg do etidronato foram administradas subcutaneamente. Nos animais do grupo controle foi administrado solução fisiológica. Os animais foram imolados em intervalos de 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 96 horas após a última administração da dose de 10 mgP/Kg do etidronato. Todos os outros animais foram mortos 96 horas após a última administração do fármaco. Após a decapitação, os incisivos superiores e o osso alveolar adjacente foram removidos, preparados e analisados radiograficamente e em microscopia ótica e eletrônica. Análises microrradiográficas demonstraram áreas não uniformes de hipomineralização e hipoplasias na dentina nos animais tratados com doses iguais ou superiores a 1mgP/Kg do etidronato. Na microscopia ótica todos os animais tratados com etidronato apresentaram alterações na formação do esmalte; na pré-dentina foi observada uma área pigmentada desconhecida, e na dentina um aumento de espessura. Na microscopia eletrônica as principais alterações observadas representavam distúrbios na fibrinogênese. Segundo os autores, esses distúrbios parecem ser atribuídos aos efeitos do etidronato na ativação de enzimas.

Conhecendo a afinidade da tetraciclina em associar-se aos tecidos duros, FOUDA, KUT, HAMMARSTROM⁴⁸ em 1992, a utilizaram como um marcador para estudar os efeitos das mudanças patológicas induzidas pelo etidronato e o

ácido fosfonofórmico sobre os padrões de mineralização do desenvolvimento do esmalte e da dentina. Para tanto, foram utilizados 35 ratos Sprague-Dawley com cinco dias de idade, distribuídos em grupo controle e experimental. Em um grupo experimental foram injetadas simultaneamente doses de 10 mg/Kg do etidronato e 50mg/Kg de tetraciclina pela via subcutânea. Em outro grupo experimental administraram as mesmas doses desses fármacos, porém, a tetraciclina foi administrada em intervalos de 1, 2 e 4 dias. Os animais controles receberam solução fisiológica pela mesma via. Após o período de observação de 1, 2 e 4 dias os ratos daqueles grupos experimentais foram mortos, e os espécimes preparados e analisados em microscopia eletrônica. A tetraciclina fluorescente foi observada em toda espessura da matriz de esmalte, nos depósitos calcificados e nos cistos subameloblásticos quando administrada simultaneamente com o etidronato. Na dentina, a tetraciclina acumulou-se na frente de mineralização sem interferir neste processo. A administração da tetraciclina em intervalos com a do etidronato, produziu no esmalte uma área fluorescente bem observada sobre os cistos subameloblásticos, e na dentina produziu defeitos semelhantes a nichos, interferindo na mineralização.

Os resultados da administração de uma única dose de etidronato sobre o esmalte dos incisivos em formação constituíram o objetivo do trabalho de WEILE; JOSEPHSEN; FEJERSKOV^{164,165}, em 1990¹⁶⁴ e em 1993¹⁶⁵ publicado em duas revistas distintas. Contando com 42 ratas Wistar divididas em seis grupos, sendo um controle e os demais experimentais, os autores administraram via subcutânea uma única dose de etidronato em concentração de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10mgP/Kg. O grupo controle recebeu a administração de uma solução salina. Os animais foram sacrificados em intervalos de dois e nove dias após a administração do etidronato. Como complementação, outros dois animais receberam duas injeções de etidronato, na concentração de 5mgP/Kg, em intervalos de três dias, sendo sacrificados nove dias após a última aplicação. Depois do sacrifício, os seus incisivos superiores receberam o preparo adequado

para a avaliação radiomicrográfica e os inferiores, para a microscopia eletrônica de varredura. Os resultados das radiomicrografias demonstraram áreas incrementais hipomineralizadas, independentemente da concentração da droga. A avaliação microscópica revelou três diferentes lesões do esmalte correspondentes aos estádios de sua formação e maturação, fato indicador de que uma única dose de etidronato pode interferir na formação do esmalte tanto pelos efeitos físico-químicos quanto pela ação sobre os ameloblastos.

A perda do osso alveolar se relaciona às alterações no equilíbrio normal entre a reabsorção e a formação óssea e supondo que os agentes terapêuticos capazes de impedir as reabsorções e de acelerar as aposições funcionam como protetores de perda de osso nas doenças periodontais, BRUNSVOLD et al.¹⁹, em 1992, propuseram-se a determinar os efeitos dos bisfosfonatos no desenvolvimento das periodontites em macacos *Cynomolgus*. Um total de 27 animais adultos foram avaliados clinicamente. Os animais foram divididos em três grupos. Dois receberam o alendronato (AHBuBP), na concentração de 0,05mg/kg ou de 0,25mg/kg, e o restante uma solução salina. Essas soluções foram administradas sistemicamente, por infusão endovenosa, a cada duas semanas, por um período de 16 semanas. Decorridos sete dias da primeira administração posicionaram uma ligadura de fio de sutura no nível da junção amelocementária dos primeiros molares e pré-molares. Após 14 e 28 dias, inocularam essas ligaduras com culturas de *Porphyromonas gingivales*. A coleta dos dados clínicos e radiográficos foi realizada oito e 16 semanas após a instalação das ligaduras. Para cada animal, duas regiões interproximais e a área de furca foram avaliadas por meio de radiografias, verificando-se as alterações da densidade óssea. Os resultados dos autores¹⁹ demonstraram que o bisfosfonato a 0,05mg/Kg apresentou efetividade na inibição da perda óssea alveolar, enquanto as doses mais elevadas não alteraram, significativamente, esta perda óssea. Em relação aos índices clínicos avaliados, não observaram nenhuma alteração significativa.

Com o objetivo de determinar a prevalência e a distribuição dos restos de Malassez no ligamento periodontal, em condições normais e após a administração do etidronato, WESSELINK; BEERTSEN¹⁶⁷, em 1993, utilizaram 72 ratos com quatro meses de vida, distribuídos em seis grupos de oito animais. Administraram, sistemicamente, 10mgP/Kg de bisfosfonato em três desses grupos, durante períodos experimentais de 10, 30 e 50 dias. Os outros três grupos receberam a administração de solução de Ringer pelos mesmos períodos experimentais. Todos os animais foram sacrificados 24 horas após a última injeção. Os 24 animais restantes receberam o etidronato durante 50 dias, sendo sacrificados, em grupos de seis animais, nos intervalos de 14, 28, 56 e 112 dias após a descontinuidade do tratamento. Um outro grupo, contendo 12 animais, não recebeu a administração da droga nem da solução de Ringer, sendo sacrificados aos sete e nove meses de vida. Subseqüentemente aos sacrifícios, as regiões dos molares inferiores foram preparadas para a microscopia óptica e eletrônica. Seus resultados¹⁶⁷ demonstraram, no grupo controle, a presença dos restos de Malassez distribuídos ao redor das raízes, exceto na porção mesial das raízes dos primeiros molares, bem como uma diminuição do seu número com o avançar da idade dos animais. Nos ratos tratados, observaram uma distribuição bastante similar à do grupo controle, apesar de se notar, nelas, a diminuição do espaço do ligamento periodontal e áreas de anquiose. Após a descontinuidade da administração do etidronato pôde-se observar a normalização da largura do espaço periodontal, decorrente do processo de reparação que se caracterizava por apresentar reabsorções radiculares, eliminação das áreas de anquiose, nova formação de cemento e regeneração do ligamento.

Estudando a eficiência do alendronato na redução da perda óssea causada por doença periodontal em macacos *Cynomolgus*, WEINREB et al.¹⁶⁶, em 1994, utilizaram 27 animais distribuídos em três grupos experimentais, de acordo com a dosagem da droga. Induziram a doença periodontal, passando uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior, na região da junção amelocementária e,

subseqüentemente, inoculando-a com culturas de *Porphyromonas gingivalis*. Os molares homólogos, sem ligaduras, serviram como controle. Os animais receberam, então, por via intravenosa, a administração de uma solução salina (placebo) e do alendronato, nas concentrações de 0,05 e 0,25mg/Kg, duas vezes por semana, durante 16 semanas. Após o sacrifício e o preparo histotécnico das peças, os cortes coronais dos molares foram submetidos à avaliação histomorfométrica. Os resultados indicaram que, nos animais placebo, a ligadura e a inoculação resultaram em significativa destruição de osso na região da junção amelocementária e na área de furca. Para os autores¹⁶⁶, a administração endovenosa do alendronato na concentração de 0,05mg/Kg, demonstrou significativa redução da perda óssea associada à periodontite experimental, porém na concentração de 0,25mg/kg demonstrou ser ineficiente na prevenção de perda óssea na região da furca e apenas levemente eficiente na região da junção amelocementária. Esses achados indicaram que o alendronato pode reduzir a perda óssea alveolar decorrente da doença periodontal e os autores sugeriram a sua utilização como uma nova modalidade nos tratamentos das periodontites.

A homeostase proposta entre os fibroblastos, no ligamento periodontal, e as células ósseas que recobrem a porção interna da parede alveolar são consideradas responsáveis pela manutenção da largura do espaço do ligamento periodontal. Tentando interferir neste equilíbrio, WESSELINK; BEERTSEN¹⁶⁸, ainda em 1994, administraram sistemicamente o etidronato em ratos. Para tanto, extraíram os primeiros molares superiores esquerdos dos ratos de um primeiro grupo, que passaram a receber doses diárias de 10mgP/Kg, via subcutânea, por períodos de 10, 30 e 50 dias. A um segundo grupo de animais, preservando-lhes os dentes, administraram as mesmas quantidades da droga. O grupo controle recebeu, via subcutânea, solução de Ringer. Após a última administração das drogas, sacrificaram os animais, e prepararam suas mandíbulas para a observação em microscópios de luz e eletrônico. As análises demonstraram que a administração do etidronato, proporcionalmente ao tempo de sua utilização,

causou uma significativa diminuição do espaço do ligamento periodontal. Os autores¹⁶⁸ observaram anquilose dentária após o 30º dia, predominantemente nas áreas inter-radiculares e ao redor dos dentes sem antagonistas. Em torno do 50º dia, notaram sinais de reabsorção ao longo da camada de cemento acelular. Durante a administração do etidronato, notaram também, a deposição de extensa matriz cementóide ao longo da camada de cemento celular, mas esta atividade não foi observada na área do cemento acelular. Estes resultados permitiram concluir que o etidronato interfere no mecanismo mediador da preservação do espaço do ligamento periodontal.

Num trabalho subsequente, WESSELING; BEERSEN¹⁶⁷, também em 1994, investigaram a seqüência de eventos que ocorrem após a interrupção da administração do etidronato e os efeitos da função oclusal no reparo do ligamento periodontal. Com esse objetivo, extraíram os primeiros molares superiores de 28 fêmeas de ratos, que passaram a receber uma dose de 10mgP/kg, via subcutânea, por um período de 50 dias. Após esse tempo experimental, sacrificaram os animais, em intervalos de 24 horas, 14, 28, 56 e 112 dias após aplicação da última dose da droga. Dissecaram e prepararam as mandíbulas para a observação no microscópio de luz. Nos cortes microscópicos, os autores notaram a presença de áreas de anquilose, com a diminuição da largura dos espaços periodontais. Depois da interrupção da administração da droga, o novo tecido ósseo formado foi, primeiramente, mineralizado e, posteriormente, reabsorvido, resultando no desaparecimento das áreas de anquilose. Além disso, regiões de reabsorção radicular puderam também ser notadas. Finalmente, o ligamento periodontal retomou à sua arquitetura e à sua dimensão normais, com depósito de nova camada de cemento. Os dentes que permaneceram em função apresentaram maior reabsorção quando comparados àqueles em hipofunção, além de um reparo periodontal mais rápido. Esses resultados permitiram concluir que, no período após a administração do etidronato, o ligamento periodontal restabeleceu suas dimensões normais por

meio de processos reparadores, que incluem extensa reabsorção radicular, considerada um acelerador do processo.

Buscando avaliar clínica, microscópica e radiograficamente, os efeitos do alendronato na progressão da doença periodontal em modelo experimental de cães da raça Beagle, REDDY et al.¹¹⁵, em 1995, utilizaram 16 animais que apresentavam perda óssea alveolar classificada de moderada a severa, por um período de seis meses. De cada animal, verificaram os índices gengival e de placa, a mobilidade dentária e o nível da junção do epitélio gengival em intervalos mensais. As radiografias intrabuciais foram obtidas em intervalos trimestrais e analisadas em imagens digitalizadas. A fim de acelerar o processo patológico, os autores posicionaram ligaduras ao redor dos pré-molares inferiores, durante três meses. Decorrido esse período, retiraram-nas para que se estabelecesse um processo crônico. O bisfosfonato, administrado, semanalmente, por via bucal, na dosagem de 3,0mg/kg, antes das refeições matinais foi avaliado em um estudo duplo-cego em que uma solução placebo serviu como controle. Após os seis meses, mataram os animais, preparando suas mandíbulas para a análise microscópica. Os resultados radiográficos revelaram uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de massa óssea entre os grupos. Os bisfosfonatos não apresentaram resultados clínicos satisfatórios em relação aos índices de placa e gengival, mas mostraram-se capazes de restringir a perda de inserção gengival e a mobilidade dentária. Os resultados histomorfométricos, por sua vez, apresentaram diferenças significativas na densidade óssea, sugerindo uma utilização benéfica dos bisfosfonatos nos tratamentos da perda óssea alveolar decorrente das doenças periodontais.

Pela inexistência de um tratamento efetivo para a reabsorção dentária por substituição LIEWEHR et al.⁸⁶, em 1995, propuseram-se a estudar o efeito dos bisfosfonatos e do nitrato de gálio nas reduções da reabsorção óssea e dentinária, nesta situação biológica *in vitro*. As células osteoclastos-like obtidas da tíbia de frangos no período pré-natal foram imersas, juntamente com fatias de dentina,

em uma solução salina ou em soluções de bisfosfonatos do tipo etidronato, clodronato e nitrato de gálio. As reabsorções mensuradas nestas fatias e os resultados observados indicaram que os grupos experimentais não diferiram muito entre si. Entretanto, quando comparada ao controle de solução salina, a reabsorção apresentou-se significativamente menor.

Para verificar as alterações do cemento provocadas pela administração de 10mgP/Kg de peso do bisfosfonato (etidronato) nos primeiros molares superiores de ratos Sprague-Dawley, com 10 a 12 dias de vida, ALATLI-KUT; HAMMARSTRÖM⁴, em 1996, aplicaram, via subcutânea, esse bisfosfonato em dois grupos experimentais. No primeiro grupo, injetaram uma única dose no 12º dia de vida, enquanto, no segundo grupo administraram a mesma dose, diariamente, durante três dias consecutivos. Outros dois grupos serviram como controle e receberam uma de solução salina, de acordo com os mesmos critérios dos grupos experimentais. A morte dos animais ocorreu após 9, 25, 35, 45 e 90 dias da administração da droga. O preparo dos dentes obedeceu aos critérios para a observação ao microscópio eletrônico de varredura. Os resultados indicaram que o etidronato administrado em dose única ou tripla inibiu a formação do cemento acelular e alterou a formação celular na superfície dos molares superiores analisados. Os mecanismos que envolvem o desenvolvimento desses cimentos atípicos não foram desvendados, mas podem estar relacionados aos efeitos seletivos do etidronato sobre uma população específica de células no periodonto.

Durante o reparo as populações celulares aumentam a sua proliferação para repovoar os tecidos extirpados, o que ocorre com as células ósseas, cementoblásticas e do ligamento periodontal. LEKIC et al.⁸², em 1997 observaram o efeito do etidronato na diferenciação celular em áreas de reparo em quatro grupos de ratos. Administraram bisfosfonato durante uma semana, na dosagem de 15mgP/Kg subcutaneamente, diariamente iniciando-se logo após a cirurgia, observando uma redução de 40% do espaço do ligamento periodontal.

A droga modulou as células do ligamento periodontal, o recrutamento de células contribuintes na formação do osso alveolar e provocou uma perda de largura do ligamento periodontal. Assim, concluíram que os bisfosfonatos podem ser utilizados terapeuticamente para alterar seletivamente a diferenciação de células do ligamento periodontal e promover a formação de osso alveolar e cimento.

Estudos em roedores osteopetróticos sugerem que quando da irrupção dentária deve ocorrer reabsorção óssea localizada. Considerando esta hipótese GRIER; WISE⁵⁴, em 1997 injetaram pamidronato 1,25µg/gP por dia, durante 15 dias, no período pós-natal de ratos, com o intuito de testar uma possível redução da reabsorção óssea, comparando o grupo experimental com o de controle, recebendo solução salina a 0,9%. A análise em microscopia eletrônica, microscopia ótica e PCR dos resultados demonstrou que os bisfosfonatos inibiram a erupção dos molares e incisivos aumentando o seu tempo de erupção. O pamidronato não inibiu a expressão gênica dos mediadores da erupção dentária como o fator estimulador de colônia- 1 e o *c-fos*, encontrados e expressos no folículo dentário. O pamidronato aumentou o tamanho dos clastos, inclusive o número de núcleos, sugerindo que os precursores mononucleares se fusionam ao formar os clastos. Constataram também a diminuição da habilidade clástica ao reabsorver osso, confirmando que a erupção dentária requer reabsorção óssea. Na conclusão do trabalho os autores asseveraram que o pamidronato reduziu a atividade osteoclástica atrasando parcialmente a erupção sem, entretanto, inibir os mediadores da erupção.

Ao estudar o processo de mineralização dentinária, TAKANO et al.¹⁴⁶, em 1998, verificaram o efeito inibitório do etidronato injetado subcutaneamente na dosagem de 8mgP/Kg, por sete a 14 dias, em ratos pesando 100g. Após o processamento e análise em microscopia eletrônica não observaram alteração do manto dentinário sob a utilização deste bisfosfonato.

Em 1999, PLATLAS et al.¹¹¹ propuseram-se a estudar os efeitos transplacentários de dois bisfosfonatos no esqueleto fetal de ratos. Trataram ratas prenhes do 11º ao 21º dias de gravidez com injeções cutâneas de 0,1mgP/Kg de alendronato ou de VSb6. Os exames microscópicos dos fetos com 21 dias revelaram um aumento do trabeculado ósseo das diáfises com uma discreta diminuição das diáfises nos fetos experimentais em comparação aos controles. A histomorfometria computadorizada confirmou estes resultados e detectou ainda uma diminuição no volume da medula óssea, mas sem alteração no volume cartilaginoso. A análise química dos ossos revelou um aumento no conteúdo cálcico nos fetos tratados. Demonstraram que o alendronato atravessa a barreira transplacentária e acumula-se nos ossos fetais, presumindo-se que estes bisfosfonatos acumulam-se nos ossos por longos períodos. Estes dados devem ser considerados durante a gravidez e a amamentação quando da necessidade de administração dos bisfosfonatos em mulheres grávidas.

Ao investigar a utilização do alendronato e seus efeitos na formação de dentina *in vitro*, SOMMERCORN et al.¹⁴², em 2000, analisaram molares e pré-molares humanos com rizogênese incompleta e os mantiveram em meio de cultura por 60 dias. Seis espécimes desenvolveram-se em meio de cultura sem a influência de qualquer bisfosfonato e 22 espécimes, denominados experimentais, desenvolveram-se sob a utilização de alendronato. A dentina foi corada e marcada para a avaliação de sua formação entre 1 a 3, 30 a 33 e 60 dias. No grupo sob a influência do alendronato o desenvolvimento apical apresentou-se maior, com um aumento de 57,15% em relação ao grupo controle. Para estes autores os resultados indicam que o alendronato é capaz de acelerar a produção de dentina *in vitro*.

Estudando os efeitos do alendronato em dentes gravemente traumatizados, LEVIN et al.⁸⁵, em 2001 e acreditando que esta terceira geração de bisfosfonatos pudesse inibir a atividade osteoclástica, trataram

endodonticamente e restauraram 82 raízes de pré-molares de cinco cães. Após a extração destas raízes, 70 foram desidratadas por 40 ou 60 minutos. Armazenaram-se 38 raízes durante cinco minutos em uma solução de 1 μ M de alendronato em solução balanceada de Hanks e em seguida reimplantadas. As 32 outras raízes foram embebidas também durante cinco minutos na mesma solução, mas sem o alendronato e então reimplantadas. Nas demais 12 raízes não expostas ao ressecamento realizaram-se defeitos de 0,5mm na porção radicular média lingual. Seis destas raízes foram armazenadas na solução com alendronato durante cinco minutos e reimplantadas. As outras seis, em solução de Hanks, sem alendronato durante cinco minutos e então reimplantadas. Quatro meses após os reimplantes efetuou-se a morte dos animais prepararam as raízes para a avaliação microscópica. Avaliaram cortes transversais considerando o estado da raiz e dos tecidos circunjacentes. Nas 12 raízes com defeitos observaram reparo com cimento e avaliaram as superfícies danificadas. A massa radicular residual determinou a extensão da estrutura radicular perdida em cada método. O reparo das 12 raízes com defeitos cementários artificialmente danificadas indicaram que o meio de armazenamento não inibiu a cementogênese. As raízes armazenadas na solução com alendronato revelaram estatisticamente um reparo maior do que as raízes armazenadas na solução sem o alendronato. O armazenamento em alendronato resultou em uma menor perda radicular durante a reabsorção das raízes ressecadas, quando comparadas ao armazenamento das raízes nas mesmas condições, em solução sem alendronato.

Em testes para verificar os efeitos dos bisfosfonatos em reações periimplantares dentárias em tíbias de ratos ovariectomizados, TOKUGAWA et al.¹⁵⁰, em 2003, observaram que os bisfosfonatos facilitavam a osteointegração dos implantes de titânio.

Objetivando observar o efeito preventivo do alendronato na reabsorção óssea alveolar após cirurgia com retalho mucoperiosteal KAYNAK et al.⁷², em

2003, utilizaram um modelo experimental em ratos. A amostra consistiu de animais operados recebendo injeções subcutâneas de solução salina (grupo controle) e solução de alendronato de 0,5mgP/Kg (grupo experimental). A administração do medicamento realizou-se durante o período entre uma semana previamente ao experimento até uma semana após. Analisaram a intensidade do infiltrado inflamatório, o grau de fibrose e de colagenização, o número e a morfologia dos clastos na região do osso alveolar e do septo interdentário, as lacunas de reabsorção e a atividade osteoblástica. Na microscopia óptica os resultados revelaram diferenças estatisticamente significantes a favor do grupo submetido ao alendronato na formação de colágeno e de fibrose, na morfologia dos clastos e na formação de lacunas de reabsorção. Para os autores os dados demonstraram que o alendronato, na dosagem utilizada seria eficaz na prevenção da perda óssea alveolar e na modulação dos fatores teciduais. Consideraram, portanto, a utilização do alendronato como uma interessante opção terapêutica, especialmente associado a outros componentes e procedimentos como: drogas antiinflamatórias, enxertos ósseos, técnicas de regeneração tecidual guiada e até mesmo com implantes dentários.

Considerando a sugestão de que os bisfosfonatos seriam elementos de prevenção da reabsorção óssea associada à periodontite, inibindo a atividade clástica, TANI-ISHII et al.¹⁴⁸, em 2003, observaram o efeito do incadronato na prevenção da destruição periodontal em ratos com periodontite induzida pela *Porphyromonas gingivalis*. Utilizaram 35 ratos administrando-se incadronato ou placebo por via bucal, dois dias por semanas durante dois, quatro e oito semanas. A periodontite induzida pela *Porphyromonas gingivalis* promoveu uma ampla destruição do ligamento periodontal, uma redução da densidade óssea e a migração de células inflamatórias. Os resultados obtidos radiográfica, morfométrica e microscopicamente revelaram que o incadronato aumentou a densidade óssea mineral e preveniu a destruição do ligamento periodontal, após oito semanas de administração, ocorrendo também uma significativa redução da

infiltração de leucócitos polimorfonucleares em casos de periodontite, induzida pela *Porphyromonas gingivalis*.

Os bisfosfonatos são capazes de unir-se a outros medicamentos como a tetraciclina atuando sinergicamente na supressão da perda óssea periodontal. Este efeito sinérgico decorre da incorporação de ambos na estrutura óssea durante a mineralização. Com o intuito de estudar este sinergismo YAFFE et al.¹⁷⁴, em 2003, injetaram alendronato endovenosamente em grupos de ratos assim constituídos: grupo 1, alendronato; grupo 2, doxiciclina; grupo 3, tetraciclina; grupo 4, alendronato + doxiciclina; e grupo 5, alendronato + tetraciclina. Realizaram nos animais cirurgias com retalho, rebatendo o periósteo da mandíbula e colocando abaixo dele bolinhas de gelfoan para atuarem como carreadores dos medicamentos. As drogas foram aplicadas topicamente no momento da cirurgia e a análise das peças foram realizadas após 21 dias, por meio de radiomicrografias. A doxiciclina revelou-se mais eficaz na redução da perda óssea, mas o alendronato também demonstrou uma ação efetiva. Por outro lado a tetraciclina não reduziu a perda óssea, entretanto quando associada ao alendronato produziu um efeito sinérgico, o que não ocorreu entre alendronato e doxiciclina. Na discussão do trabalho os autores enfatizaram seus resultados, pois ao carregar moléculas de antibióticos, os bisfosfonatos podem otimizar seus efeitos sobre as endotoxinas ou LPS, que são muito importantes na patogenia da doença periodontal, diminuindo a destruição dos tecidos na evolução e no tratamento da doença periodontal, especialmente a perda óssea alveolar. Ressaltaram também seus resultados, pois ao carregar moléculas de antibióticos, os bisfosfonatos podem otimizar seus efeitos sobre as endotoxinas ou LPS, que são fundamentais na patogenia da doença periodontal, diminuindo a destruição dos tecidos na evolução e no tratamento da doença periodontal, especialmente quanto à perda óssea alveolar.

A manutenção da espessura e altura do osso alveolar após a perda dentária é essencial na restauração dos dentes ausentes, com implantes osteointegráveis e posteriores a procedimentos protéticos. Ocorre um nível variado de reabsorção na crista óssea alveolar após a extração dentária principalmente nas corticais vestibular e lingual. Considerando que o alendronato consiste em um potente inibidor da reabsorção óssea ALTUNDAL; GUVENER⁶, em 2004, examinaram o efeito inibitório do alendronato na reabsorção óssea alveolar após a exodontia, em ratos. Para alcançar seus objetivos, estabeleceram grupos tratados com solução salina e com alendronato, administrado subcutaneamente, diariamente por duas e quatro semanas em dosagens de 0,25mgP/Kg. Foram executadas marcações da fosfatase alcalina sérica e cortes de quatro micrometros de espessura da região do primeiro molar inferior direito no sentido vestibulolingual. No grupo tratado com alendronato a redução do volume ósseo alveolar foi significativamente menor do que no grupo tratado com solução salina. Este resultado foi atribuído a uma pronunciada supressão da reabsorção óssea promovida pelo alendronato.

2.5 Influência dos bisfosfonatos no movimento dentário induzido

Em 1988, ENGSTROM³² estudou as reabsorções radiculares em gatos com hipocalcemia e submetidos ao tratamento com bisfosfonatos durante o movimento dentário induzido. Cada grupo continha oito animais. Injetaram clodronato subcutaneamente, diariamente, duas semanas antes da instalação do aparelho até a morte dos animais, na dosagem de 0,5mgP/Kg e aplicando uma força de 50g durante seis semanas. Analisaram os resultados por meio de microscopia ótica e de fosfatase alcalina. Os gatos apresentam uma conhecida predisposição às reabsorções radiculares e quando submetidos à movimentação dentária induzida apresentam níveis significativamente maiores de reabsorções. No grupo recebendo bisfosfonatos as reabsorções induzidas pela movimentação

dentária foram significativamente menores. O movimento dentário apresentou-se diminuído nos grupos tratados com bisfosfonatos, mas as reabsorções foram menos freqüentes.

Em 1988, COLLINS; SINCLAIR²³ demonstraram que a administração tópica de 1,25-diidroxicolecalciferol aumenta o grau do movimento, sem efeito colateral bioquímico, microscópico ou clínico aparente. Após 21 dias de administração de uma injeção de 1,25D no espaço do ligamento periodontal de gatos, observaram o aumento de 60% no grau de movimento. Os resultados microscópicos revelaram reabsorção frontal dos ossos alveolares, com a presença de numerosos clastos mononucleados e células precursoras clásticas.

Para verificar a influência de dois monofosfonatos e dois bisfosfonatos na formação dentária, FOUDA et al.⁴⁶, 1991 injetaram subcutaneamente uma única aplicação de 10-30mgP/Kg de etidronato e de clodronato, em ratos de cinco, dez e 15 dias. A análise microscópica revelou: 1) a separação dos ameloblastos da superfície da matriz do esmalte e também observada sob a injeção de outros monofosfonatos injetados experimentalmente, portanto não específica dos bisfosfonatos. Em algumas áreas a superfície do esmalte parecia hipermineralizadas e em outras, hipoplásica; 2) os efeitos na dentina e no osso alveolar apresentaram-se muito variados, mas em geral ocorria uma linha hipomineralizada seguida por uma zona de dentina hipermineralizada; 3) os odontoblastos apresentaram-se normais, com calcosferitas menores, mas sem justificativa apresentada.

Estudando os efeitos da administração local de etidronato sobre os movimentos dentários induzidos, WARITA et al.¹⁶², em 1992, utilizaram ratos, com 10 semanas de vida, em que injetaram o bisfosfonato quatro vezes durante o período experimental na dosagem de 1,6mgP/Kg na submucosa da região do septo inter-radicular dos primeiros molares superiores do grupo experimental. No grupo controle, aplicaram uma solução salina. Dois dias após a primeira

injeção, posicionaram uma mola fechada de níquel-titânio superelástica, que exercia 9g de força, dos primeiros molares superiores esquerdo aos incisivos, durante 10 dias. Aferiram a distância entre os primeiros e segundos molares superiores em intervalos de 0, 1, 4, 7 e 10 dias após o início das movimentações dentárias. Imolados os animais, suas maxilas receberam tratamento para a microscopia óptica, quando foram avaliados os tecidos periodontais do septo inter-radicular dos primeiros molares. Observaram uma diferença significativa na quantidade de movimentação dentária entre os grupos, em todos os períodos avaliados. As lacunas de Howship apresentaram-se escassas nas superfícies do osso alveolar, nas regiões de pressão do grupo experimental, além de se comprovar uma diminuição do número de células gigantes multinucleadas. Esses resultados sugeriram que a administração local do etidronato inibiu significativamente o grau de movimentação dentária decorrente dos efeitos inibitórios sobre a reabsorção óssea.

Estudando a movimentação ortodôntica em um modelo utilizando coelhos com osteoporose induzida por corticosteróides ASHCRAFT et al.⁸, em 1992, observaram que o movimento ortodôntico ocorria mais rapidamente. Considerando seus resultados, estes autores não recomendam que os corticóides sejam utilizados como coadjuvantes em Ortodontia. A utilização dos bisfosfonatos de maneira adequada poderia regularizar esta osteoporose, propiciando o movimento dentário induzido.

No intuito de estudar os efeitos do alendronato, um potente bloqueador de reabsorções ósseas na movimentação dentária induzida em ratos, IGARASHI et al.³⁵, em 1994, desenvolveram em experimento em três fases. Na etapa inicial, os primeiros molares superiores dos animais foram vestibularizados, durante três semanas, por meio de uma mola de expansão padronizada, em concomitância com a administração sistêmica diária do alendronato. A movimentação dentária total, com a aplicação de uma dose de 0,5mgP/Kg, quando comparada à do grupo controle, representou apenas 40%. Na segunda fase, os primeiros molares

superiores também foram vestibularizados durante três semanas. Após esse período, retiraram-se as molas e iniciou-se a administração sistêmica do bisfosfonato. A recidiva observada representou 50% da ocorrida no grupo controle. O resultado microscópico dessas duas fases demonstrou que, nos animais experimentais, havia menor número de clastos na superfície do osso alveolar e que foram inibidas tanto a reabsorção óssea quanto a radicular. Na última etapa do experimento, os pesquisadores administraram, topicamente, o alendronato na região subperióstea adjacente ao primeiro molar superior esquerdo e, como resultado, notaram a inibição da movimentação dentária, sugerindo que esse bisfosfonato pode ser útil no aumento da ancoragem ou na contenção dos dentes movimentados ortodonticamente.

Valorizando a ancoragem no sucesso do tratamento ortodôntico ADACHI et al.¹, em 1994, propuseram-se a examinar o efeito tópico de risedronato no movimento dentário em 126 ratos, considerando que esta droga constitui um potente bloqueador da reabsorção óssea. Moveram os primeiros molares superiores para vestibular por meio de uma mola por três semanas com a força de 165mN. Após a remoção da mola iniciaram a injeção do risedronato subperiostealmente, na área adjacente ao primeiro molar esquerdo na dosagem de 50µl de solução de risedronato em uma concentração de 0, 125, 250, ou 500µmol/L a cada três dias durante as três semanas do experimento. A mola movendo ambos os primeiros molares produziu uma expansão e a aplicação tópica do risedronato inibiu a recidiva. No primeiro molar direito injetaram solução salina a 0,9% como controle. A administração tópica do risedronato provocou uma significativa redução do movimento dentário induzido pela força aplicada. Em sua conclusão os autores sugerem que a aplicação tópica do risedronato pode auxiliar na ancoragem dos dentes, durante tratamento ortodôntico.

Dois anos mais tarde, ALATLI; HELLSING; HAMMARSTRÖM³, investigaram a resistência do cimento acelular hiperplásico, resultante da

administração do etidronato, à reabsorção radicular, comparando sua efetividade protetora à do cimento normal, quando submetido às forças ortodônticas. Um total de 30 ratos Sprague-Dawley recém-nascidos foram divididos em cinco subgrupos de seis animais. Os pesquisadores administraram, em metade desses animais uma única injeção de etidronato, via subcutânea, na concentração de 10mgP/Kg de peso, aos 12 dias de vida. Os demais ratos dos grupos receberam a administração de solução salina, servindo como controle. Decorridos 15 dias da administração do fármaco, os seis animais do grupo 1 foram mortos. Nos animais restantes foram instalados dispositivos ortodônticos colados aos primeiros molares superiores, contornando a abóbada palatina. A força imprimida pelos aparelhos provocou a vestibularização dos dentes de ancoragem. Os aparelhos permaneceram em posição por um período de sete dias, nos grupos 2, 4 e 5, e 14 dias, no grupo 3. Os animais dos grupos 2 e 3 foram sacrificados imediatamente após a remoção dos aparelhos. No grupo 4, o sacrifício ocorreu sete dias após a remoção dos dispositivos, permitindo uma recidiva das movimentações. Antes de serem sacrificados, os animais do grupo 5 permaneceram 28 dias sem os aparelhos. As regiões dos primeiros molares superiores, preparadas pelos procedimentos histotécnicos rotineiros, foram observadas ao microscópio óptico. Seus resultados³ demonstraram maiores e mais severas reabsorções radiculares nos animais tratados com o etidronato, quando comparados aos controles. Além disso, constataram uma eliminação mais rápida das áreas hialinas nos animais tratados, possivelmente em decorrência de uma menor densidade dessas regiões, resultante do efeito do bisfosfonato. Nos animais controle, não foram observadas reabsorções radiculares nas regiões imediatamente abaixo das áreas hialinas, diferindo dos animais tratados em que se notaram áreas de reabsorção nessas regiões, que se estendiam profundamente pela dentina.

Para examinar os efeitos da administração do etidronato IGARASHI et al.⁶⁷, em 1996, analisaram a reabsorção radicular em dentes de ratos

movimentados bem como o reparo das superfícies radiculares após o movimento dentário induzido. Em um primeiro experimento movimentaram ambos os primeiros molares superiores para vestibular com uma mola de expansão, sob a administração de risedronato. Após sete dias ocorreu uma extensa reabsorção radicular no lado controle com um tamanho máximo da área afetada aos 14 dias. A administração tópica de risedronato provocou uma significativa inibição da reabsorção dentária após a aplicação da força ortodôntica. Em um segundo experimento, vestibularizaram os primeiros molares superiores por três semanas. Aplicaram topicamente o risedronato e no dia em que a mola foi removida, por via subperiosteal na região adjacente ao primeiro molar na dosagem de $500\mu\text{mol/L}$ a cada três dias durante as 3 semanas do experimento. Após a remoção da força as áreas de reabsorções foram restauradas com o depósito de cimento reparatório ou cimentoídeo. Avaliaram-se os animais aos 0, 3, 7, 14 e 21 dias. A análise microscópica revelou que a administração tópica de risedronato não inibiu o processo de reparo das reabsorções radiculares. Para estes autores, os resultados sugerem que a administração tópica de risedronato pode prevenir a reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico. Ao final do trabalho os autores afirmam que é possível inibir a reabsorção radicular sem afetar significativamente o movimento ortodôntico. Sugerem também que futuros trabalhos determinem: a distribuição do bisfosfonato na superfície radicular; a concentração necessária para inibir a função clástica sobre os dentes e por quanto tempo o bisfosfonato permanece na superfície radicular.

Com o fim precípuo de avaliar o potencial de inibição da recidiva pela utilizaram de bisfosfonatos, KIM et al.⁷⁵, em 1999, avaliaram 42 ratos com 67 dias de vida submetidos à movimentação dentária induzida por meio da inserção de um elastômero entre o primeiro e segundo molares. Os elásticos foram mantidos em posição por 21 dias. Um dia antes da remoção da liga elástica os ratos receberam uma dose intravenosa de $1,5\text{mg}/1,0\text{mL}/\text{Kg}/\text{dia}$ do bisfosfonato

pamidronato dissódico e mantidos por zero, cinco e dez dias antes da análise microscópica de luz e eletrônica de transmissão. De acordo com a análise realizada a recidiva foi menor estatisticamente aos cinco e dez dias comparados com os controles, sendo menos proeminente aos dez dias. Apesar da dose sistêmica única administrada os autores relatam que a diminuição da recidiva foi evidente, observando-se alteração dos clastos com menos acúmulos vacuolares, irregularidade das bordas pregueadas, ausência de clastos aderidos à superfície óssea e apoptoses clásticas.

Confirmando o efeito imediato da administração de bisfosfonato na movimentação dentária induzida, MAZZIEIRO⁹³, em 1999, avaliou microscopicamente, a influência do clodronato sobre a morfologia do osso alveolar, do ligamento periodontal e do cimento dos primeiros molares superiores de 45 ratas com 90 dias de vida, nos tempos experimentais de 24 horas, 3, 5, 7, 10 e 21 dias de movimento. Os resultados microscópicos revelaram que a administração do clodronato não interferiu em nenhuma das situações referidas, inclusive durante o movimento dentário induzido, nas diversas fases analisadas.

Na fase inicial da reabsorção óssea os cristais de hidroxiapatita são desmineralizados pela acidificação subclástica em microambientes pelo tipo-vacuolar H^+ -ATPase localizadas nas membranas das bordas pregueadas dos clastos. As lacunas de reabsorção são formadas pela degradação do osso colágeno tipo-I mediada pela catepsina K, uma proteinase lisossomal alta e seletivamente expressas pelos clastos. Por meio de exames imunocitoquímicos é possível quantificar a expressão do tipo-vacuolar H^+ -ATPase e catepsina K nos clastos durante a movimentação dentária experimental em ratos. Desta forma, avaliando imunocitoquimicamente a influência do bisfosfanato pamidronato na atuação dos clastos durante a movimentação dentária induzida experimentalmente em ratos Wistar, SATO et al.¹³⁷ em 2000 realizaram a inserção de um elastômero entre o primeiro e o segundo molares superiores por

quatro dias. Administraram de uma única dose intraperitoneal de 1,5mg/1,0ml/Kg de pamidronato um dia antes da instalação do elastômero intermolares. Os resultados sugerem que o pamidronato inibiu-se a atuação dos clastos que exibiram bordas pregueadas irregulares, zonas claras de diferentes extensões, decréscimo da expressão de H^+ -ATPase e catepsina K nos clastos durante a movimentação dentária induzida.

Em uma revisão sobre os efeitos de drogas e fatores sistêmicos no movimento ortodôntico TYROVOLA; SPYROPOULOS¹⁵³, em 2001 atribuem aos bisfosfonatos a capacidade de inibição da movimentação ortodôntica, sem apresentar qualquer metodologia experimental, citando apenas como referência o trabalho de MIYAJIMA; NAGAHARA; IIZUKA⁹⁷ que refere-se ao tratamento ortodôntico de apenas uma paciente pós-menopausada sem estado osteoporótico demonstrado ou relatado. Tratava-se, portanto de uma paciente normal, apresentando apenas doença periodontal e posicionamentos dentários inadequados. Neste mesmo trabalho, TYROVOLA; SPYROPOULOS¹⁵³ sem mencionar qualquer fundamentação metodológica sugere a inibição do movimento ortodôntico quando da aplicação tópica de bisfosfonatos e o aumento da ancoragem para o movimento ortodôntico de outros dentes, sem qualquer citação que suporte esta assertiva.

Com a finalidade de investigar os efeitos dos bisfosfonatos na remodelação da sutura palatina de ratos após a expansão rápida (ERM), LEE et al.⁸⁰ em 2001, utilizaram de quatro grupos de animais submetendo-os à expansão mecânica com força de 60g por três dias, em 44 ratos, sendo que cada grupo continha 11. Imediatamente após a expansão removeram os aparelhos dos animais de dois grupos. Em um dos grupos injetaram diariamente, durante três dias solução salina; em um outro, por sete dias antes da morte dos animais. Nos dois outros grupos injetaram subcutaneamente, diariamente, etidronato por três e sete dias antes de serem imolados. Ao analisarem os resultados em microscopia ótica e imunoistoquímica, avaliaram-se a quantidade de recidiva e a remodelação

óssea utilizando um índice de recidiva e por meio do número de clastos. No grupo controle e submetido aos bisfosfonatos por sete dias o índice de recidiva foi respectivamente de 54,11 e 32,53%. O número de clastos três dias pós-injeção de solução salina foi de 15,47 enquanto que no grupo de bisfosfonato foi 5,26. Esses resultados demonstraram que o bisfosfonato após ERM quando combinada a uma contenção mecânica pode inibir a reabsorção óssea e garantir uma maior estabilidade movimento. Os autores⁸⁰ indicam, portanto, a possibilidade farmacológica de reduzir as recidivas esqueléticas após a mecanoterapia ortodôntica.

Para estudar o movimento dentário induzido sob condições ósseas metabólicas alteradas VERNA; DALSTRA; MELSEN¹⁵⁷, em 2000 utilizaram ratos com alto e baixo turnover ósseos farmacologicamente induzidos, e compararam com um grupo de animais normais. O alto e baixo turnover foram obtidos injetando-se hormônio T4 e dieta com restrição de iodo, respectivamente. Aplicaram forças no primeiro molar inferior por um período de três semanas por meio de molas fechadas, estiradas do molar ao incisivo superior. Mensuraram o deslocamento dentário por meio de uma sonda eletrônica e pela inclinação dentária por meio de um tomógrafo específico para avaliação dentária. Nos animais com alto turnover ósseo, o movimento dentário apresentou-se maior e no de baixo turnover, menor. Concluíram que os desvios metabólicos do turnover ósseo influenciam na remodelação durante o movimento ortodôntico, sugerindo que esta condição seja considerada no planejamento ortodôntico em pacientes com doenças ósseas metabólicas ou que tomem medicamentos de forma crônica para regular o metabolismo ósseo. Em um segundo trabalho de 2003, estas mesmas autoras¹⁵⁷ utilizando o mesmo modelo experimental e uma análise histomorfométrica, observaram que apesar das condições metabólicas afetarem a qualidade do movimento dentário induzido, não ocorreram diferenças significantes em termos de reabsorções dentárias, quando de turnover ósseo alterado. Entretanto, mesmo assim sugerem

que em pacientes com turnover ósseo diminuído pode-se esperar níveis mais elevados de reabsorção dentária.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

As premissas para a proposição deste trabalho foram as informações e questionamentos resgatados da literatura e a experiência adquirida com o modelo experimental de movimentação dentária induzida em ratos, que permitem avaliar:

- ⊙ as alterações na morfologia óssea dos maxilares, inclusive as decorrentes da ação de medicamentos utilizados no tratamento de várias doenças e com uso simultâneo no tratamento ortodôntico;
- ⊙ os fenômenos biológicos relacionados à movimentação dentária induzida e suas variáveis, incluindo-se a ação dos medicamentos que possam influenciar a sua qualidade e velocidade;
- ⊙ a frequência, intensidade e morfologia das reabsorções dentárias e os efeitos de variáveis físicas, biológicas e químicas como a possibilidade dos medicamentos aumentarem a resistência à reabsorção radicular;

Conseqüentemente, no presente experimento propusemo-nos a:

- ⊙ avaliar os efeitos dos bisfosfonatos, especificamente do alendronato, sobre os fenômenos celulares e teciduais próprios da movimentação dentária induzida;
- ⊙ avaliar a influência dos bisfosfonatos, especialmente do alendronato, na frequência e morfologia da reabsorção nos dentes movimentados;
- ⊙ comparar os resultados e avaliar os fundamentos biológicos da hipótese na qual a incorporação dos bisfosfonatos durante a odontogênese e rizogênese aumentaria a resistência às reabsorções.

MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e Métodos*

4.1 Amostragem

Os animais envolvidos neste projeto constituíram um total de 86, cujos molares foram seccionados longitudinal e transversalmente para a avaliação microscópica. Entretanto, os 30 animais cujos molares foram cortados transversalmente serão analisados em outro trabalho. Os molares dos 56 animais, 27 machos e 29 fêmeas, participantes da amostra avaliada neste trabalho foram seccionados no sentido longitudinal.

Portanto a amostra deste trabalho constituiu-se de 56 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*), 47 com média de 120 dias de vida e os 9 restantes com média de 216 dias, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram acondicionados em gaiolas, contendo cada uma, de 3 a 6 animais. Manteve-se o ambiente com iluminação natural e temperatura ambiente, apresentando-se constantemente limpo e arejado. A alimentação dos animais constituiu-se de ração de nome comercial *Labina*, da marca Purina fornecida *ad libitum*, assim como o provimento de água. Mantiveram-se os animais durante a administração do bisfosfonato e acasalamento no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru até os 90 dias e posteriormente no biotério da Disciplina de Patologia Bucal da FOB/USP, durante a fase de instalação dos aparelhos até o final do experimento. Durante o período em que os animais permaneceram com o aparelho em posição a alimentação constituiu-se da mesma ração, triturada em

* O protocolo sugere que os números ordinais de 0 a 10 sejam escritos por extenso. Entretanto, para a maior facilidade de compreensão dos dados a respeito do número de animais por grupo e dos dias de movimentação, optou-se pela forma numérica de apresentação.

um pequeno pilão e depositada em um recipiente de vidro em cada gaiola, da mesma forma sem restrição quanto à quantidade. A trituração da ração objetivou reduzir o esforço durante a mastigação, evitando a danificação e a remoção dos dispositivos ortodônticos pelos animais, durante a alimentação.

4.1.1 Distribuição dos animais e qualificação da amostra

Dividimos a amostragem em 4 grupos distintos, sendo que cada um destes subdivide-se em grupos submetidos ou não à movimentação dentária induzida (c/MDI e s/MDI) sob diferentes protocolos de medicação com o bisfosfonato alendronato. Os grupos sem medicação ou controle foram instituídos com o intuito de observar as características advindas apenas do medicamento empregado nas estruturas ósseas e dentárias, sem interferência da movimentação dentária.

Procedemos à instalação dos aparelhos ortodônticos movimentando mesialmente o primeiro molar superior esquerdo, ancorando-o nos incisivos superiores.

❖ **Grupo Controle:** constituído por 27 animais não submetidos à medicação com o bisfosfonato.

◆ **Controle s/MDI:** constituído por 10 animais, sem qualquer medicação e não submetidos à movimentação dentária induzida:

- 4 machos e 6 fêmeas sem movimentação e sem medicação;

◆ **Controle c/MDI:** constituído por 17 animais não submetidos à medicação com o bisfosfonato e com movimentação dentária induzida durante **3, 5 e 7 dias:**

- 6 fêmeas submetidas a **3** dias de movimentação;
- 4 machos e 2 fêmeas submetidos a **5** dias de movimentação;
- e 5 fêmeas submetidas a **7** dias de movimentação dentária induzida.

❖ **Grupo Experimental:** constituído por 31 animais submetidos à medicação com o bisfosfonato desde a vida intrauterina até o momento de imolação dos animais. Este é o grupo principal do estudo e foi instituído no afã de constatar os efeitos da incorporação do alendronato tanto nos dentes como no osso.

◆ **Grupo Experimental s/MDI:** constituído por 9 animais medicados com o bisfosfonato, desde a vida intrauterina e não submetidos à movimentação dentária induzida:

- 6 machos e 3 fêmeas medicados desde a vida intrauterina e sem movimentação.

◆ **Grupo Experimental c/MDI:** constituído por 22 animais submetidos à medicação com o bisfosfonato desde a vida intrauterina até final do experimento e com movimentação dentária induzida durante **3, 5 e 7** dias, antes de efetuada a imolação dos animais:

- 6 machos e 3 fêmeas submetidos a **3** dias de movimentação;
- 6 machos e 1 fêmea submetidos a **5** dias de movimentação;
- 3 machos e 3 fêmeas submetidos a **7** dias de movimentação.

❖ **Grupo Ensaio 1:** constituído por 14 animais submetidos à medicação com o bisfosfonato desde a vida intrauterina até os 74 dias de vida, quando se interrompeu o fornecimento de alendronato até a imolação dos animais, 41, 43 e 45 dias depois. Este grupo foi instituído secundariamente com o objetivo de avaliar a incorporação dos bisfosfonatos nos dentes e permitir a eliminação deste do osso. Desta forma interrompeu-se a medicação, permitindo o turnover do osso murino que se renova a cada mês⁸⁷.

◆ **Grupo Ensaio 1 s/MDI:** constituído por 6 animais não submetidos à movimentação ortodôntica e medicados com o bisfosfonato desde a vida intrauterina até os 74 dias de vida, quando se interrompeu o fornecimento de alendronato, até a imolação dos espécimes:

- 4 machos e 2 fêmeas sem movimentação, medicados até os 74 dias de vida e imolados aos 117 (machos) e 119 dias (fêmeas).

◆ **Grupo Ensaio 1 c/MDI:** constituído por 8 animais submetidos à medicação com o bisfosfonato desde a vida intrauterina até os 74 dias de vida, quando se interrompeu o fornecimento de alendronato, até a imolação dos animais aos 115, 117 e 119 dias. A movimentação dentária induzida destes espécimes procedeu-se por **3, 5 e 7** dias antes de efetuada a imolação dos animais e 41, 43 e 45 dias após a interrupção da terapia com o bisfosfonato:

- 2 fêmeas com **3** dias de movimentação, imoladas aos 115 dias;
- 4 machos com **5** dias de movimentação, imolados aos 117 dias;
- 2 fêmeas submetidas a **7** dias de movimentação, imoladas aos 119 dias.

❖ **Grupo Ensaio 2***: constituído por 9 animais submetidos à medicação com o bisfosfonato a partir do 118º dia de vida até a data da imolação destes; 96, 98 e 100 dias depois. Inúmeros pacientes adultos recebem rotineiramente medicação com bisfosfonatos, após o término da rizogênese e são submetidos a tratamento ortodôntico. Este grupo foi instituído secundariamente com a finalidade de observar o que ocorre na movimentação de dentes deste tipo de pacientes, com bisfosfonatos incorporados apenas à estrutura óssea e não aos dentes.

◆ **Grupo Ensaio 2 s/MDI**: constituído por 8 animais não submetidos à movimentação ortodôntica e medicados com o bisfosfonato a partir do 118º dia de vida até a data da imolação dos espécimes:

- 4 machos e 4 fêmeas sem movimentação, medicados a partir do 118º dia de vida até a data da imolação; aos 96 e 98 dias.

◆ **Grupo Ensaio 2 c/MDI** : constituído por 9 animais submetidos à medicação com o bisfosfonato a partir do 118º dia de vida até o final do experimento. A movimentação dentária induzida destes espécimes procedeu-se por **3, 5 e 7** dias antes de imolados.

- 3 fêmeas com **3** dias de movimentação, imolados aos 214 dias;
- 3 machos com **5** dias de movimentação, imolados aos 216 dias;
- 2 fêmeas e 1 macho submetidos a **7** dias de movimentação, imolados aos 218 dias.

* O Ensaio 2 foi instituído como forma de eticamente aproveitar todos os espécimes envolvidos para a obtenção dos animais com bisfosfonatos incorporados às estruturas dentárias. Este grupo foi constituído pelos progenitores dos animais submetidos à medicação com bisfosfonatos desde a vida intrauterina.

	s/MDI		3 dias		5 dias		7 dias		Total	
Controle	10	4♂	6	0♂	6	4♂	5	0♂	27	4♂
		6♀		6♀		2♀		5♀		13♀
Experimental	9	6♂	9	6♂	7	6♂	6	3♂	31	15♂
		3♀		3♀		1♀		3♀		7♀
Ensaio 1	6	4♂	2	0♂	4	4♂	2	0♂	14	4♂
		2♀		2♀		0♀		2♀		4♀
Ensaio 2	8	4♂	3	0♂	3	3♂	3	1♂	17	4♂
		4♀		3♀		0♀		2♀		5♀
Total	33	18♂	20	6♂	20	17♂	16	4♂	89	27♂
		15♀		14♀		3♀		12♀		29♀

Tabela 4.1 - Desenho experimental deste trabalho, relacionando-se o gênero e número de animais por grupo e subgrupo.

4.2 Administração e preparo do medicamento

Os ratos receberam o medicamento, por via bucal, sempre no mesmo período do dia, por meio de uma cânula introduzindo o medicamento diretamente no trato gastrintestinal.

A dosagem do bisfosfonato utilizado, alendronato sódico, da marca comercial *Alendil* (Farmoquímica) foi calculada de acordo com a equivalência do peso dos animais à dose recomendada a um humano adulto que consiste em um comprimido semanal de alendronato sódico de 70mg^{69,139}, ou seja, 1mgP/Kg. Considerando que o índice metabólico de murinos apresenta-se duas vezes maior que o de humanos^{10,73}, as doses administradas em todo o experimento foram de duas doses semanais de 1mgP/Kg.

Calculou-se a quantidade de medicamento em cada comprimido pesando 350mg. Posteriormente, calculava-se o peso de comprimido fragmentado para a

quantidade de ratos a receber o medicamento adicionado a uma dose a mais, descontando uma pequena perda de material durante a manipulação, evidenciada em procedimento piloto.

Para a manutenção da regularidade da dosagem de acordo com o peso dos animais, foram necessárias repesagens semanais de 1 macho e de 1 fêmea de cada grupo para a realização de um novo cálculo. Realizou-se este procedimento de redosagem mesmo para os ratos já adultos, apresentando perceptivelmente um aumento de tamanho e peso dos animais após o início da administração do alendronato sódico.

Após a dosagem do medicamento e pesagem do fragmento do comprimido, este era triturado com um grau e pistilo e dissolvido em água destilada, permanecendo esta solução em um Becker sobre o agitador durante 10 minutos. Devido ao pouco potencial de dissolução dos componentes do comprimido e evitando a decantação do material, a solução era aspirada por seringas na dosagem individual por rato, ainda com o Becker sobre o agitador, quando as partículas ainda estavam suspensas. Conforme o previsto ocorria sempre uma pequena perda de material, que como descrito, já havia sido descontada.

As seringas eram tampadas com as agulhas encapadas e voltadas para baixo, permanecendo em um vidro na posição vertical, de forma que o material decantado permanecia na ponta da seringa e era o primeiro elemento ingerido pelos animais.

Realizava-se a administração acoplando-se as seringas a uma sonda uretral cortada com o comprimento de 7cm, imediatamente antes da introdução da cânula da sonda no trato gastrintestinal, que é facilmente introduzida pela garganta do animal em qualquer idade, sem risco de regurgitação do medicamento.

O primeiro grupo a receber o medicamento foi o Ensaio 2, no 118º dia de vida. Tratava-se inicialmente de um grupo de 12 ratos, 6 machos e 6 fêmeas, ou seja 6 casais. Estes animais foram postos para o acasalamento duas semanas após o início da administração do alendronato sódico. Os animais dos Grupos Experimentais 1 e 2 receberam, portanto desde a vida intrauterina o medicamento, pois este é capaz de ultrapassar a barreira transplacentária.

Os progenitores adultos, tanto os machos quanto as fêmeas, continuaram a receber o alendronato sódico até a data de imolação, aos 96, 98 e 100 dias depois. Estes casais deram origem a 54 animais que após o desmame receberam o medicamento via bucal, da mesma forma já descrita. Dos animais obtidos destes acasalamentos, 36 participam deste trabalho onde se realizaram cortes longitudinais das peças de análise. Os 18 demais foram designados para os cortes transversais, para outro trabalho.

O Grupo Experimental recebeu o medicamento inclusive durante o período em que permaneceram com o aparelho ortodôntico até a data de imolação aos 98, 100 e 102 dias.

O Grupo Ensaio 1 recebeu medicamento até o 74º dia de vida quando se interrompeu a sua administração. Instalou-se o aparelho nos animais deste grupo 7 dias antes de imolados os espécimes; 41, 43 e 45 dias após a interrupção da medicação.

4.3 Anestesia dos animais

Para os procedimentos de instalação dos aparelhos ortodônticos os animais foram anestesiados com uma única dose contendo a mistura de 1mlP/Kg de cloridrato de xilazina (nome comercial *Anasedan* da marca *Purina*), um sedativo relaxante muscular analgésico, e cloridrato de ketamina (nome

comercial *Dopalen* também da marca *Purina*), anestésico geral injetável, ambos os medicamentos de uso veterinário. Injetou-se a mistura anestésica por via intraperitoneal, obtendo-se um período de duas a quatro horas de anestesia.

4.4 Instalação e ativação dos aparelhos para movimentação dentária

Após a perda de sentidos dos animais em decorrência da anestesia realizava-se o posicionamento em uma mesa operatória, modificada por SALES¹³⁴, a partir de HOUSTON⁶¹. Instalaram-se os dispositivos para a movimentação dentária induzida, construídos de acordo com HELLER; NANDA⁵⁹, com alguns aprimoramentos desenvolvidos a partir de um projeto piloto.

Para a instalação do dispositivo ortodôntico foram essenciais os seguintes componentes e materiais:

- uma mesa operatória modificada por SALES¹³⁴, a partir de HOUSTON⁶¹ (**Figura 4**);
- uma mola de aço espiralada fechada de 4mm de comprimento com fio de .006 x .022 polegadas, da marca comercial Morelli;
- fio de amarrilho 0,12 milímetros, fornecidos pela empresa Morelli de materiais ortodônticos;
- fio de aço inox com 0,25 milímetros, também Morelli;
- um compasso de pontas secas;
- um compasso de Willis;
- um alicate de corte de amarrilho;
- um porta agulha Mathieu, 11cm;
- uma pinça clínica;

- um dobrador de amarelo;
- uma broca diamantada fina 2200F da KG Sorensen;
- resina composta da marca comercial 3M, Concise Ortodôntico;
- microbrush, da marca KG brush;
- um compressor e uma seringa tríplice;
- uma caneta de alta rotação Kavo;
- e um refletor odontológico.

Figura 4 - Posicionamento do animal na mesa cirúrgica específica para trabalhos intrabucais em ratos anestesiados e acesso à cavidade bucal por meio de instrumentos.

Cada aparelho instalado nos animais (**Figuras 5, 6 e 7**) foi confeccionado metodicamente seguindo os seguintes passos, sempre sob a luz do refletor odontológico:

1. Preparo das molas utilizadas:

- Realizamos três marcas consecutivas no rolo de mola fechada previamente ao corte, utilizando para esta marcação o alicate de corte de amarrilho. A primeira marca aproximadamente 2 a 3 helicoides à frente da segunda, há exatos 4mm da marca anterior, aferida com o compasso de pontas secas previamente calibrado pelo compasso de Willis.
- Uma última marca 2 a 3 helicóides após a segunda marca. E assim sucessivamente. Cada mola então era composta dos 4mm efetivos para a ativação e 2 a 3 helicóides em cada extremidade para a união dos amarrilhos aos dentes.
- Dois segmentos de fio de amarrilho de 0,25mm de aproximadamente 7cm de comprimento eram amarrados a uma única extremidade da mola e cada segmento era unido em suas pontas para não se soltarem da mola. Uma vez prontas as molas iniciava-se a instalação propriamente dita.

2. União da mola ao primeiro molar superior esquerdo:

- Utilizando um porta agulha Mathieu e afastando-se a mucosa jugal do rato com uma pinça clínica, inseria-se inicialmente por lingual e pelo espaço interproximal entre o primeiro e segundo molares superiores esquerdos, a ponta de um segmento de fio de aproximadamente 7cm de amarrilho 0,12mm. Esta ponta de 5mm era previamente manipulada tomando a forma de anzol. Esta

passagem requer treinamento para ser realizado com sucesso e com um mínimo de dano aos tecidos periodontais circundantes.

- Uma vez apreendida a ponta deste “anzol” por vestibular do espaço interproximal com o porta agulha Mathieu, puxava-se o fio até a metade de seu comprimento.
- Inserimos a ponta da porção lingual deste segmento de amarrilho à extremidade livre da mola, amarrando-o de forma que a mola se posicionasse por mesial e o mais próximo possível da coroa do primeiro molar superior esquerdo. O fio de amarrilho 0,12mm seria análogo a uma banda, abraçando o primeiro molar superior esquerdo e ao mesmo tempo fixando uma das extremidades da mola.

Normalmente, os trabalhos realizam a união da mola ao incisivo superior esquerdo apenas, no máximo fixando esta união com resina composta. Entretanto, no trabalho piloto ocorreram dificuldades como quebras dos aparelhos pela interferência dos incisivos inferiores durante a alimentação e/ou quebra do incisivo superior esquerdo, mesmo triturando a ração ingerida pelos animais. Portanto, no afã de garantir a integridade dos aparelhos e a fidelidade à metodologia empregada, implementamos ainda uma amarração sobressalente, também com fio 0.25mm no incisivo superior direito, conforme descrição a seguir:

3. União da mola aos incisivos superiores:

- Utilizando uma broca tronco cônica diamantada fina em alta rotação, devidamente refrigerada, realizaram-se nas faces distais e mesiais de ambos os incisivos superiores, sulcos de retenção o mais cervical possível. As bordas das retenções apresentavam um

ângulo vivo, nunca arredondado, possibilitando uma maior apreensão do fio.

- Cada segmento de fio 0,25mm previamente unidos à extremidade da mola eram então amarrados aos incisivos. Cada segmento de fio para cada incisivo separadamente, distendendo a mola 2mm.
- Realizamos a aferição do comprimento da mola em 6mm com o compasso de pontas secas, calibrado pelo compasso de Willis, a cada amarração sistematicamente, garantindo assim o comprimento exato da mola, ao final do procedimento.

A força despendida por esta distensão da mola sobre o primeiro molar superior esquerdo foi de 75cN⁷⁰ medida e padronizada previamente com um dinamômetro da marca Morelli de 25 a 250g, devidamente calibrado e aferido. Devido às propriedades do aço, esta força dissipava-se gradualmente ao longo dos dias em que o aparelho permanecia na cavidade bucal.

- Finalmente, após o condicionamento ácido, depositava-se uma camada de resina composta Concise Ortodôntico recobrindo os fios de amarrilho ao redor dos incisivos. Realizava-se também o recobrimento dos fios de amarrilho 0,25mm por lingual até a extremidade da mola, protegendo-a da interferência dos incisivos inferiores durante a alimentação.

A resina depositada sobre os fios de amarrilho 0,25mm, por lingual dos incisivos até a extremidade da mola, serviu-nos de alarme quanto a uma quebra dos aparelhos. Todos os dias os ratos eram examinados quanto ao correto posicionamento do dispositivo ortodôntico (**Figuras 5, 6 e 7**). Os espécimes que não mais apresentassem a resina em posição eram então anestesiados novamente para um novo recobrimento de resina nesta posição, evitando o contato direto dos incisivos inferiores sobre o aparelho.

Desta forma (**Figuras 5, 6 e 7**), não ocorreu nenhuma quebra de aparelho durante o período experimental e nem tampouco se realizou qualquer ativação adicional. O correto posicionamento dos aparelhos foi conferido diariamente, não ocorreu nenhuma fratura e seu correto posicionamento era conferido diariamente.

Os incisivos superiores serviram desta forma como ancoragem para o movimento mesial do primeiro molar superior esquerdo, não sendo avaliados neste estudo.

Conforme mencionado, alguns segmentos de molares superiores do lado direito foram preparados para a observação microscópica objetivando verificar as características advindas apenas do medicamento empregado nas estruturas ósseas e dentárias sem a interferência da movimentação dentária induzida.

Figura 5 - Aspectos intrabuciais do rato e passos da instalação do aparelho específico para movimentação dentária induzida do primeiro molar superior esquerdo.

Figura 6 - Desenho do aparelho para movimentação dentária induzida do primeiro molar superior esquerdo de ratos e seu posicionamento demonstrado em peças cirúrgicas do experimento. Em D, a peça cirúrgica foi desmineralizada e seccionada para inclusão e obtenção de cortes teciduais para exame microscópico.

Figura 7 – Aspectos estereomicroscópicos dos aparelhos de movimentação dentária induzida instalados nos primeiros molares de ratos e seu efeito aos 7 dias imediatamente após a sua remoção.

4.5 Imolação dos animais, obtenção e preparo histotécnico das peças cirúrgicas

Ao término dos períodos experimentais os animais foram imolados por meio de dose excessiva da mistura anestésica ketamina e xilazina. Em seguida, utilizando tesouras Íris e Metzembaum, os animais foram decapitados procedendo com a dessecação, removendo-se os componentes epiteliais e musculares circundantes à maxila. Padronizou-se o *modus operandi* e a quantidade de dessecação evitando que uma quantidade excessiva de tecido remanescente interferisse na velocidade de desmineralização intergrupos ou interespécimes.

As maxilas foram colocadas em uma solução tamponada de formol a 10%, para fixação, permanecendo nesta solução até a obtenção de todos os espécimes do experimento para a realização simultânea da desmineralização das peças.

Realizamos a desmineralização em solução de Morse, por um período de uma semana, sendo a solução trocada a cada 2 dias e o ponto de desmineralização verificado todos os dias. Como o processo de desmineralização nesta solução é extremamente rápido foi necessário por vezes sua verificação do processo em algumas peças a cada 6 ou 12 horas, para a obtenção do ponto perfeito de corte. O julgamento do ponto de corte utilizando a solução desmineralizadora de Morse demandou treinamento prévio e controle minucioso para evitar a perda de peças.

Para observação imediata utilizamos uma lupa. Os remanescentes do aparelho foram removidos apenas após a desmineralização das peças com alicate de corte de amarelo.

Utilizando uma lâmina de barbear para cada peça, realizou-se o preparo macroscópico das maxilas desmineralizadas, que se constituiu da seguinte seqüência:

1. Um corte inicial frontal 4mm à frente dos primeiros molares superiores (à frente da segunda prega palatina anterior aos molares superiores) com uma inclinação de aproximadamente 45°, dividindo a maxila em 2 segmentos, anterior e posterior.
2. Um corte no sentido ântero-posterior, perpendicular ao plano oclusal no centro do palato eqüidistante dos molares superiores esquerdos e direitos, separando as hemimaxilas. Em seguida, procedia-se com a *toilette* das peças.
3. Um corte vertical bastante conservador, paralelamente ao longo eixo do primeiro molar, determinando o plano de corte por vestibular de cada segmento de molares superiores, no sentido mesiodistal (**Figuras 8, 9 e 10**).

No estudo piloto, verificamos que é extremamente arriscado realizar este corte dividindo os molares ao meio no sentido mesiodistal (**Figuras 8, 9 e 10**). Esta manobra pode comprometer a visualização da área adequada para a análise microscópica, quando do posicionamento do bloco no micrótomo.

4. Complementamos o acabamento das peças com um ajuste do plano de corte com delicado refinamento. Este ajuste envolveu no mesmo plano pelo menos as raízes mesial e distal do primeiro molar superior.

Foi possível observar macroscopicamente e sem lupa o aumento do espaço interproximal entre o primeiro e segundo molar superior esquerdo, nos espécimes submetidos à movimentação dentária induzida por mais de 5 dias (**Figura 7**).

Em seguida aos cortes macroscópicos, as peças foram armazenadas individualmente, juntamente com as respectivas identificações, em formol a 10% e desidratadas em banhos sucessivos de álcool e parafina.

Incluíram-se os segmentos de molares superiores parafinizados no sentido mesiodistal, paralelamente ao longo eixo dos primeiros molares (**Figuras 8, 9 e 10**). As peças foram ajustadas utilizando uma pinça clínica e realizando uma suave pressão do plano de corte de encontro no fundo da caixa.

Realizou-se o posicionamento dos blocos no micrótomo de forma que a primeira parte desgastada fosse a menos importante, envolvendo o terceiro e o segundo molar até que o corte englobasse toda a peça e atingisse a região do primeiro molar superior. Controlaram-se os cortes passo a passo, observando a sequência no microscópio ótico, mesmo sem coloração e orientando o aprimoramento do posicionamento do bloco. Desta forma, possibilitou-se a obtenção das raízes mesial e distal do primeiro molar superior em um mesmo corte.

Em cada lâmina visualizamos cinco cortes em média. Estas lâminas receberam coloração pelo método hematoxilina-eosina de Harris e Lison. Após a montagem das lamínulas de vidro em resina e secagem, acondicionamos as lâminas identificadas e os respectivos cortes corados, em caixas apropriadas, armazenadas em ambiente seco e fresco.

4.6 Análise microscópica

Examinaram-se os cortes teciduais provenientes do processamento histotécnico em com microscópio binocular Olympus CH-2.

Figura 8 – Aspectos anatômicos do crânio e da mandíbula de ratos adultos jovens com três meses de idade.

Figura 9 – Aspectos anatômicos dos dentes murinos no contexto do crânio e em corte longitudinal para demonstrar suas relações com o tecido ósseo alveolar e com os incisivos.

4.6.1 Critérios de análise dos fenômenos microscópicos relacionados à movimentação dentária induzida (Figuras 10 à 26)

Os primeiros molares superiores esquerdos dos animais foram observados tanto nas regiões apicais quanto cervicais. Observa-se um padrão de distribuição de forças característico deste modelo experimental, portanto, nas regiões cervicais pode-se observar com maior exuberância os fenômenos da movimentação dentária induzida. No terço cervical da raiz mesial do primeiro molar murino podem-se analisar os fenômenos microscópicos produzidos pela aplicação de uma força suave ou moderada. Já no terço cervical da raiz distal, podem-se observar os fenômenos produzidos por uma força intensa (**Figura 10**), sendo esta região a de maior interesse para o estudo das reabsorções dentárias.

Aos fenômenos teciduais e celulares passíveis de serem observados durante a movimentação dentária induzida foram determinados escores de 0 a 20, de acordo com a sua intensidade. Para cada período avaliado no experimento este mesmo critério foi adotado. Estes fenômenos estão classicamente demonstrados na literatura pertinente^{24,25,108,119,120,155,156}. Os registros dos escores foram realizados em quadros especificamente idealizados para esta finalidade como se demonstra no capítulo de resultados e no apêndice. Para cada grupo e subgrupo se estabeleceu a média dos escores que permitiu abordagens comparativas de cada condicionante variável do experimento. Os escores correspondiam aos seguintes fenômenos:

- 0 = normal;
- 1 = áreas hialinas focais;
- 2 = reabsorção óssea frontal;
- 3 = áreas hialinas segmentares em até $\frac{1}{4}$ da extensão do ligamento periodontal;
- 4 = áreas hialinas segmentares em $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da extensão do ligamento periodontal;
- 5 = áreas hialinas segmentares em $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ da extensão do ligamento periodontal;
- 6 = áreas hialinas segmentares em mais $\frac{3}{4}$ da extensão do ligamento periodontal;

Figura 10 – Morfologia e relações dos tecidos dentários murinos com o tecido ósseo alveolar e gengival. O esmalte apresenta-se preenchido, a dentina branca e o cimento pontilhado. Destaca-se a forma de clava das raízes dos molares em função da espessura do cimento apical. Na região **cervical da raiz mesial** do primeiro molar superior esquerdo (**seta fina**) observam-se os fenômenos microscópicos produzidos por uma **força suave ou moderada** e na região **cervical da raiz distal**, os fenômenos produzidos por uma **força intensa (seta cheia)**.

- 7 = reabsorção óssea à distância focal discreta;
- 8 = reabsorção óssea à distância focal moderada;
- 9 = reabsorção óssea à distância focal intensa;
- 10 = reabsorção óssea à distância generalizada discreta;
- 11 = reabsorção óssea à distância generalizada moderada;
- 12 = reabsorção óssea à distância generalizada intensa;
- 13 = reabsorção dentária superficial (cementária) de até $\frac{1}{4}$ da extensão da raiz;
- 14 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de até $\frac{1}{4}$ da extensão da raiz;
- 15 = reabsorção dentária superficial (cementária) de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da extensão da raiz;
- 16 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da extensão da raiz;
- 17 = reabsorção dentária superficial (cementária) de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz;
- 18 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz;
- 19 = reabsorção dentária superficial (cementária) de mais $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz;
- 20 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de mais $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz.

Realizou-se de forma metodizada o registro do escore mais grave observado para cada animal, em quadros como o exemplificado na página seguinte:

		Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
		Espécies	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	M	
Forças Moderadas	Terço cervical	A♂																							
		B♂																							
		C♂																							
		D♂																							
		E♂																							
		F♂																							
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	M	
		A♂																							
		B♂																							
		C♂																							
		D♂																							
		E♂																							
Forças Intensas	Terço cervical	F♂																							
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	M	
		A♀																							
		B♀																							
		C♀																							
		D♀																							
	Terço apical	E♀																							
		F♀																							
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	M	
		A♂																							
		B♂																							
		C♂																							

4.7 Análise estatística

Aos resultados referentes às regiões de pressão cervical moderada e intensa aplicaram-se os testes Quiquadrado, Kruskal-Wallis e Dunn para a verificação das diferenças intergrupos.

Decorridos 30 dias da primeira análise microscópica selecionaram-se aleatoriamente 30 casos e compararam-se os resultados da primeira e da segunda análise da região de pressão cervical intensa, obtendo-se o índice Kappa da avaliação intra-examinador (de um único examinador). Os dados para a interpretação qualitativa do resultado deste teste apresentam-se a seguir:

Coeficiente Kappa	Nível de concordância
< 0,00	-
0,00 – 0,20	Baixo
0,21 – 0,40	Médio
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeito

Quadro 4.1 – Quadro de transformação e interpretação do índice Kappa dos resultados quantitativos em variáveis qualitativas de acordo com LANDIS; KOCH⁷⁷.

- 7 = reabsorção óssea à distância focal discreta;
- 8 = reabsorção óssea à distância focal moderada;
- 9 = reabsorção óssea à distância focal intensa;
- 10 = reabsorção óssea à distância generalizada discreta;
- 11 = reabsorção óssea à distância generalizada moderada;
- 12 = reabsorção óssea à distância generalizada intensa;
- 13 = reabsorção dentária superficial (cementária) de até $\frac{1}{4}$ da extensão da raiz;
- 14 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de até $\frac{1}{4}$ da extensão da raiz;
- 15 = reabsorção dentária superficial (cementária) de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da extensão da raiz;
- 16 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da extensão da raiz;
- 17 = reabsorção dentária superficial (cementária) de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz;
- 18 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz;
- 19 = reabsorção dentária superficial (cementária) de mais $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz;
- 20 = reabsorção dentária profunda (dentinária) de mais $\frac{3}{4}$ da extensão da raiz.

Realizou-se de forma metodizada o registro do escore mais grave observado para cada animal, em quadros como o exemplificado na página seguinte:

[illegible]

RESULTADOS

5 Resultados*

Os resultados serão apresentados considerando-se dois tópicos principais: a análise microscópica semiquantitativa, a partir dos escores estabelecidos, e a análise microscópica descritiva a partir de observações morfológicas comparativas entre os grupos experimentais e seus respectivos subgrupos determinados pelo tempo transcorrido.

5.1 Análise microscópica semiquantitativa

Aplicou-se o índice Kappa para a análise da calibração intra-examinador, sobre uma nova leitura de 30 dos cortes microscópicos, exaustivamente conferidos na checagem dos critérios de observação e determinação do escores. O coeficiente de concordância apresentou o valor de 0,85, que de acordo com o quadro (**Quadro 4.1**) de transformação⁷⁷ corresponde qualitativamente a um nível quase perfeito.

* O protocolo sugere que os números ordinais de 0 a 10 sejam escritos por extenso. Entretanto, para a maior facilidade de compreensão dos dados a respeito do número de animais por grupo e dos dias de movimentação, optou-se pela forma numérica de apresentação.

5.1.1 Média dos escores progressivos e resultados estatísticos quanto à comparação intergrupos dos fenômenos teciduais

	Forças Moderadas								Forças Intensas							
	Terço cervical				Terço apical				Terço cervical				Terço apical			
	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias
Grupos																
Controle	0	1,83	2,00	1,60	0	2,16	4,00	6,20	0	7,50	13,8	16,2	0	1,16	2,50	1,40
Experimental	0	1,66	1,28	1,50	0	0,33	0,71	3,00	0,11	6,00	6,42*	8,16*	0	0,22	0,28	0
Ensaio 1	0,16	2,00	1,75	1,00	0	1,50	0,75	0	0	5,50	5,75*	10,5**	0	0	0	0
Ensaio 2	0,25	2,00	2,00	1,66	0	0,25	3,00	0	0	7,00	7,00**	9,00**	0	1,00	0	0

* Significante para nível de 5% em relação ao Grupo Controle

** Significante para nível de 10% em relação ao Grupo Controle

Tabela 5.1 - Médias dos escores e resultados da comparação estatística intergrupos.

Na **Tabela 5.1** e nos **Anexos** destaca-se a redução significativa dos valores médios dos escores do Grupo Controle para o Grupo Experimental e os Ensaio 1 e 2 em todos os tempos de observação. A redução foi maior na região do terço cervical voltado para o septo inter-radicular na raiz distal do primeiro molar murino, local onde as forças de pressão são mais intensas^{155,156}.

Destaca-se que a redução dos escores médios do Grupo Controle para o Grupo Experimental foi observada nos períodos de 3, 5 e 7 dias, mas para o Grupo Ensaio 1 foi maior ainda no período de 5 dias. Também houve diferenças entre o Grupo Controle e os Grupos Ensaio 1 e 2 (**Tabela 5.1 e Anexos**).

Um ponto interessante e notável corresponde à exuberância dos fenômenos observados especialmente nos terços cervicais; nos terços apicais eles são mais discretos. Estes resultados têm relação com a morfologia radicular.

O objetivo principal do trabalho está relacionado com a ocorrência ou não de reabsorções dentárias e neste modelo experimental o local onde potencialmente ocorrem é a região cervical submetida a forças intensas. Os escores determinados para esta região mostraram significância estatística na aplicação dos testes Quiquadrado, Kruskal-Wallis e Dunn ao nível de 5% entre

os Grupo Experimental e o Grupo Controle nos subgrupos de 5 e 7 dias de movimentação dentária induzida. Aos 3 dias de movimentação não há tempo hábil biologicamente para a ocorrência de reabsorções dentárias e em decorrência não se observou significância estatística (**Tabela 5.1 e Anexos**).

Nos Grupos Ensaio 1 e 2, com menor número de animais, a significância nos mesmos períodos de observação foi detectada ao nível de 10%. Nas demais regiões de análise microscópica, como o esperado, os resultados dos Grupos Experimental e Ensaio 1 e 2 eram estatisticamente semelhantes em nível de significância de 5 e 10% quando comparados ao Grupo Controle (**Tabela 5.1 e Anexos**).

Quando do agrupamento dos escores por grupo, independentemente dos tempos de observação, revelou-se que estatisticamente também os grupos eram significativamente diferentes em relação ao Grupo Controle quanto à reabsorção radicular.

Nas demais regiões observadas durante o experimento não se observou diferença estatística intergrupos (**Anexos**).

5.1.2 Dados proporcionais dos dentes com reabsorção óssea frontal

Para comparar a frequência da reabsorção óssea frontal nos vários grupos, elaborou-se a **Tabela 5.2**. Nela estão registrados os números de dentes que apresentaram este fenômeno proporcionalmente ao número de ratos de seu subgrupo. Isto permitirá a comparação entre os vários grupos para ajudar na análise da reação óssea na movimentação dentária induzida em ratos normais e aos submetidos à ação do alendronato, permitindo na discussão analisar se os ossos com bisfosfonatos têm mais ou menos deflexão óssea, ou mesmo, se reagem diferentemente quando submetidos a estímulos mecânicos.

	Forças Moderadas								Forças Intensas							
	Terço cervical				Terço apical				Terço cervical				Terço apical			
	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias
Grupos																
Controle	0:10	5:6	6:6	3:5	0:10	4:6	3:6	3:5	0:10	0:6	0:6	0:5	0:10	2:6	3:6	3:5
Experimental	0:9	6:9	3:7	3:6	0:9	1:9	2:7	2:6	0:9	0:9	0:7	0:6	0:9	1:9	1:7	0:6
Ensaio 1	0:6	2:2	3:4	0:2	0:6	0:2	1:4	0:2	0:6	0:2	1:4	0:2	0:6	0:2	0:4	0:2
Ensaio 2	0:8	4:4	3:3	2:3	0:8	0:4	1:3	0:3	0:8	0:2	0:3	0:3	0:8	2:4	0:4	0:3

Negrito = Presença

Tabela 5.2 - Número de molares com reabsorção óssea frontal por grupo e subgrupo de acordo com os dias de movimentação dentária induzida.

Na **Tabela 5.2**, percebe-se que os fenômenos da reabsorção óssea frontal são mais exuberantes no terço cervical por ação de forças moderadas do que no terço cervical com ação de forças intensas, pois neste último local ocorre reabsorção óssea à distância considerando-se que a hialinização segmentar do ligamento periodontal nesta área esteve presente em todos os dentes movimentados como está representado na **Tabela 5.3**.

Outro fator que contribuiu para os eventos se apresentarem mais exuberantes nos terços cervicais é a morfologia radicular, que no rato tem a forma invertida em relação ao do homem, ou seja, tem a forma de clava e seu término arredondado contribui para uma melhor distribuição de forças.

5.1.3 Dados proporcionais dos dentes com reabsorção óssea à distância

Na **Tabela 5.3**, estão apresentados os números de primeiros molares de ratos com reabsorção óssea à distância durante a movimentação dentária induzida nos vários grupos e subgrupos para se obter um efeito comparativo das reações ósseas sem e com a ação do alendronato.

	Forças Moderadas								Forças Intensas							
	Terço cervical				Terço apical				Terço cervical				Terço apical			
	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias
Grupos																
Controle	0:10	0:6	0:6	0:5	0:10	0:6	1:6	1:5	0:10	6:6	6:6	5:5	0:10	0:6	0:6	0:5
Experimental	0:9	0:9	0:7	0:6	0:9	0:9	0:7	2:6	0:9	6:9	6:7	6:6	0:9	0:9	0:7	0:6
Ensaio 1	0:6	0:2	0:4	0:2	0:6	0:2	0:4	0:2	0:6	1:2	3:4	2:2	0:6	0:2	0:4	0:2
Ensaio 2	0:8	0:3	0:3	0:3	0:8	0:3	1:3	0:3	0:8	4:4	3:3	3:3	0:8	0:3	0:3	0:3

Negrito = Presença

Tabela 5.3 - Número de molares com reabsorção óssea à distância por grupo e subgrupo de acordo com os dias de movimentação dentária induzida.

O terço cervical da raiz distal na face voltada para o septo inter-radicular foi o mais exuberantemente envolvido pela reabsorção óssea à distância durante a movimentação dentária induzida nos primeiros molares dos ratos. Nos vários grupos e subgrupos neste local, o fenômeno não se mostrou diferente e isto pode indicar que o alendronato não afeta as propriedades mecânicas do osso alveolar, especialmente do septo inter-radicular, pois estes dados sugerem que o seu grau de deformação e absorção de forças nas condições diferenciadas do experimento foi mantido.

5.1.4 Dentes com reabsorção radicular

Na **Tabela 5.4**, estão apresentados os números de primeiros molares de ratos com reabsorção radicular durante a movimentação dentária induzida nos vários grupos e subgrupos para se obter um efeito comparativo da ação do alendronato.

	Forças Moderadas								Forças Intensas							
	Terço cervical				Terço apical				Terço cervical				Terço apical			
	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias	s/ MDI	3 dias	5 dias	7 dias
Grupos																
Controle	0:10	0:6	0:6	0:5	0:10	0:6	1:6	2:5	0:10	0:6	5:6	5:5	0:10	0:6	0:6	0:5
Experimental	0:9	0:9	0:7	0:6	0:9	0:9	0:7	0:6	0:9	0:9	0:7	1:6	0:9	0:9	0:7	0:6
Ensaio 1	0:6	0:2	0:4	0:2	0:6	0:2	0:4	0:2	0:6	0:2	0:4	1:2	0:6	0:2	0:4	0:2
Ensaio 2	0:8	0:3	0:3	0:3	0:8	0:3	0:3	0:3	0:8	0:3	0:3	1:3	0:8	0:3	0:3	0:3

Negrito = Presença

Tabela 5.4 - Número de molares com reabsorção radicular por grupo e subgrupo de acordo com os dias de movimentação dentária induzida.

Nesta **Tabela 5.4**, destaca-se a menor frequência da reabsorção radicular no Grupo Experimental no qual a redução foi evidente em relação ao Grupo Controle. Nos Grupos Ensaio 1 e 2 os dentes afetados pela reabsorção também foram poucos, mas o número de animais do subgrupo é muito pequeno para uma análise segura e conclusiva, muito embora as reabsorções detectadas nestes dois grupos sejam pequenas, pontuais e superficiais.

5.2 Análise microscópica descritiva

5.2.1 Grupo Controle (Figuras 11 à 16)

5.2.1.1 Áreas de forças moderadas

Na área cervical submetida a forças moderadas a superfície óssea periodontal do osso alveolar fasciculado, aos 3 e 5 dias de observação, revelaram lacunas de Howship com clastos no contexto de unidades osteorremodeladoras. Os clastos, osteoblastos e macrófagos das unidades osteorremodeladoras apresentavam aspecto de normalidade; o número médio de unidades variava entre 7 a 10 por cada corte examinado da região. A reabsorção óssea frontal

estava presente em todos os espécimes aos 3 e 5 dias de observação. No ligamento periodontal correspondente havia, na maioria dos espécimes examinados deste período de 3 e 5 dias, áreas hialinas focais que também serviam para indicar se as forças aplicadas foram atuantes nos tecidos. Nesta região cervical submetida a forças moderadas, no período de 7 dias, a maior parte das superfícies ósseas periodontais estavam com as lacunas sem clastos ou já regularizadas por neoformação óssea, ou seja, a reabsorção óssea estava paralisada ou reparada; em 3 espécimes poderia ainda ser caracteriza a reabsorção óssea frontal.

Na região apical, as forças moderadas induziram discretas alterações morfológicas geralmente representadas por áreas hialinas focais em alguns poucos espécimes. Eventualmente, alguns dentes revelavam nesta área pequenos segmentos de ligamento periodontal hialinizado (em 7 de 17 espécimes).

5.2.1.2 Áreas de forças intensas

A área cervical submetida a forças intensas em quase todos os espécimes apresentava segmentos de hialinização nos 3 períodos de observação; estes segmentos variavam, em média, de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ na extensão do comprometimento da superfície radicular no sentido longitudinal. Nesta região, as células desapareciam por migração ou morte, incluindo-se os osteoblastos e cementoblastos. As áreas hialinas apresentavam eventualmente aspectos residuais de trombose na sua porção mais central. Nos cortes longitudinais das raízes, acima ou abaixo das áreas hialinizadas segmentares, havia reabsorção óssea, bem como nos canais vasculares e espaços medulares do osso alveolar. As unidades osteorremodeladoras em geral eram abundantes e caracterizavam a reabsorção óssea à distância, no conjunto dos aspectos morfológicos da área examinada. No Grupo Controle, especialmente aos 7 dias, muitos espécimes (5 entre 10 espécimes) apresentavam reabsorções radiculares na periferia das áreas

hialinizadas do ligamento periodontal, ora eram superficiais por se limitarem ao cimento, ora eram profundas por afetarem a dentina subjacente, como pode se confirmar no apêndice em tabela correspondente **(Tabela 5.4)**. A atividade clástica nas superfícies ósseas e radiculares era intensa no Grupo Controle, especialmente no terço cervical da raiz distal submetida a forças intensas.

As reabsorções radiculares estiveram presentes em 10 espécimes, sendo 5 aos 5 dias e outros 5 aos 7 dias de observação. As áreas hialinas durante a sua fagocitose por parte de macrófagos e clastos em sua periferia nas partes voltadas para a região apical e cervical apresentavam-se em fagocitose ou reabsorção por células clásticas. Ao mesmo tempo nas superfícies cementárias diretamente expostas ao ligamento periodontal inflamado pela morte dos cementoblastos que a protegia havia intensa atividade dos clastos e unidades osteorremodeladoras morfológicamente detectáveis. A maior parte dos clastos na superfície estava associados a lacunas de Howship.

Na região apical as forças intensas foram devidamente dissipadas ou distribuídas de forma uniforme, pois induziram discretas alterações morfológicas geralmente representadas por áreas hialinas focais em alguns espécimes (8 espécimes em 17). Em 7 espécimes observou-se segmentos de áreas hialinas e reabsorção óssea frontal em 8 dos 17 espécimes do grupo.

Figura 11 – Aspectos microscópicos normais do **Grupo Controle**, sem movimentação, das **regiões cervical e apical da raiz mesial** do molar do rato, que independentemente da incorporação do bisfosfonato, apresenta as mesmas características. Quando da movimentação dentária induzida, estas regiões (cervical e apical da raiz mesial) foram submetidas à ação de forças moderadas (H.E. - aumentos originais = 40X).

Figura 12 – Aspectos microscópicos normais do **Grupo Controle, sem movimentação da região cervical, na face mesial da raiz distal** do primeiro molar do rato, sem movimentação, que independentemente da incorporação do bisfosfonato, apresenta as mesmas características. Quando da movimentação dentária induzida, esta região foi submetida à ação de forças intensas (H.E. - aumentos originais = 40X).

Figura 13 – Alterações morfológicas induzidas na região cervical da **raiz mesial** (**A e B**), submetida a **forças moderadas** com reabsorção óssea frontal; e na região cervical da **raiz distal**, submetida a **forças intensas** (**C e D**); no **Grupo Controle**, após 3 dias de movimentação dentária induzida (H.E. - aumentos originais A e C = 40X, B e D = 100X).

Figura 14 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados na **área cervical**, submetida a **forças intensas** na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **5 dias** de movimentação dentária induzida, no **Grupo Controle**. Observa-se a hialinização segmentar do ligamento periodontal e a reabsorção óssea à distância, caracterizada pela grande quantidade de unidades osteorremodeladoras nos espaços medulares e na face periodontal do osso alveolar (H.E. – aumentos originais: A, D = 20X, B, E, F = 40X, C = 100X).

Figura 15 – Reabsorção radicular no **Grupo Controle**, na área **cervical da raiz distal** do primeiro molar murino, submetida a **forças intensas**, após **5 dias** de movimentação dentária induzida. (H.E. – aumentos originais: A, = 40X, B = 100X).

Figura 16 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Controle**, na **área cervical**, submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **7 dias** de movimentação dentária induzida. Observa-se a fagocitose da hialinização segmentar do ligamento e exuberante reabsorção radicular, com diversas unidades osteorremodeladoras (H.E. – aumentos originais: A, D = 20X, B, E = 40X, C, F = 100X).

5.2.2 Grupo Experimental (Figuras 17 à 20)

5.2.2.1 Áreas de forças moderadas

Nos primeiros molares dos ratos submetidos à ação do alendronato desde a vida intrauterina, a área cervical quando submetida a forças moderadas a superfície óssea periodontal do osso alveolar fasciculado, aos 3 e 5 dias de observação, também se revelaram lacunas de Howship com clastos no contexto de unidades osteorremodeladoras. Os clastos, osteoblastos e macrófagos das unidades osteorremodeladoras apresentavam aspecto de normalidade. No ligamento periodontal correspondente, havia, na quase totalidade dos espécimes examinados deste período de 3 e 5 dias, áreas hialinas focais que indicavam efeito das forças aplicadas nos tecidos, mas não se caracterizou reabsorção óssea frontal em todos os espécimes como no Grupo Controle. Nesta região cervical submetida a forças moderadas, no período de 7 dias, a maior parte das superfícies ósseas periodontais estavam com as lacunas sem clastos ou já regularizadas por neoformação óssea, ou seja, a reabsorção óssea estava paralisada ou reparada. Houve reabsorção óssea frontal neste período em 3 de 7 animais, uma proporção semelhante à do Grupo Controle.

Na região apical, as forças moderadas, induziram discretas alterações morfológicas geralmente representadas por esparsas áreas hialinas focais em alguns poucos espécimes (2 em 22). Eventualmente alguns dentes (3 espécimes em 22) revelavam nesta área pequenos segmentos de ligamento periodontal hialinizado. Em 5 de 22 espécimes houve reabsorção óssea frontal nesta região apical submetida a forças moderadas, um número menor do que no Grupo Controle.

5.2.2.2 Áreas de forças intensas

A área cervical submetida a forças intensas em todos os espécimes apresentava segmentos de hialinização nos 3 períodos de observação. Estes segmentos variavam, em média, de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ na extensão do comprometimento da superfície radicular no sentido longitudinal. No entanto, em alguns espécimes (4 em 22) a área hialinizada chegava a acometer $\frac{3}{4}$ da extensão radicular. Nesta região, os aspectos morfológicos também sugeriam que as células desapareciam por migração ou morte, incluindo-se os osteoblastos e cementoblastos. As áreas hialinas apresentavam eventualmente aspectos residuais de trombose na sua porção mais central. Nos cortes longitudinais das raízes, acima ou abaixo das áreas hialinizadas segmentares, havia reabsorção óssea, bem como nos canais vasculares e espaços medulares do osso alveolar. As unidades osteorremodeladoras em geral eram abundantes e caracterizavam a reabsorção óssea à distância, no conjunto dos aspectos morfológicos da área examinada. No Grupo Experimental, especialmente aos 7 dias, 1 entre 6 espécimes (**Tabela 5.4**) apresentou reabsorções radiculares na periferia das áreas hialinizadas do ligamento periodontal, mas era focal, pois se limitava a uma ou duas unidades osteorremodeladoras conforme o corte examinado. A atividade clástica nas superfícies ósseas apresentava morfolologicamente uma magnitude parecida ao do Grupo Controle, especialmente no terço cervical da raiz distal submetida a forças intensas, mas também assim foi na região cervical submetida a forças moderadas, sugerindo que no Grupo Experimental este fenômeno não foi afetado pelo alendronato.

Um achado morfológico interessante e intrigante neste Grupo Experimental, sob a ação do alendronato, foi uma considerável redução do número de dentes e de extensão de área das reabsorções radiculares. As áreas hialinas durante a sua fagocitose por parte de macrófagos e clastos em sua periferia nas partes voltadas para a região apical e cervical apresentavam-se da mesma forma que no Grupo Controle, mas nas superfícies cementárias

diretamente expostas ao ligamento periodontal inflamado e envolvido pelo processo não havia acoplamento de clastos e atividade de unidades osteorremodeladoras. Alguns clastos praticamente apresentavam-se justapostos, sem bordas ativas, na superfície, mas sem atividade representada por lacunas de Howship. Isto não foi observado no Grupo Controle no qual quando a superfície cementária estava exposta, também havia presença de clastos ativos. Em um espécime, porém, a reabsorção radicular esteve presente com 3 lacunas de Howship detectáveis morfológicamente.

Na região apical, as forças intensas não atuaram significante do ponto de vista morfológico, pois não houve alterações morfológicas, nem mesmo discretas. Isto está coerente com os achados na área cervical submetida a forças intensas. A hialinização segmentar do ligamento periodontal impede a movimentação dentária induzida no alvéolo, pois não haverá de imediato reabsorção óssea frontal, logo forças não atuaram diretamente no ligamento periodontal apical de forma significativa.

Figura 17 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Experimental**, com administração do **alendronato**, na área **cervical**, submetida a **forças intensas** na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **3 dias** de movimentação dentária induzida. Os clastos associados à reabsorção radicular apresentam-se com núcleos picnóticos, desorganizados e com aparente fragmentação eventual (H.E. – aumentos originais: A, B = 20X, C, D = 40X).

Figura 18 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Experimental** com administração do **alendronato**, na área **cervical** submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino (**A, B, C**); e área **cervical** na fase mesial da **raiz mesial**, submetida a **forças moderadas** (**D, E, F**), após **5 dias** de movimentação dentária induzida. (H.E. – aumentos originais: A, D = 20X, B, E = 40X, C, F = 100X).

Figura 19 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Experimental** com administração do **alendronato**, na área **cervical** submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **5 dias** de movimentação dentária induzida. Destaca-se a ausência de interação entre os clastos e a superfície radicular (H.E. – aumentos originais: A = 20X, B = 40X, C = 100X).

Figura 20 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Experimental**, com administração do **alendronato**, na área cervical, submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **7 dias** de movimentação dentária induzida. Quando as reabsorções radiculares ocorreram, foram pontuais ou focais. Outras áreas de cimento desnudo de cementoblastos não interagem com os clastos da região. (H.E. – aumentos originais: A = 20X, B = 40X, C, D = 100X).

5.2.3 Grupo Ensaio 1 (Figuras 21, 22 e 23)

5.2.3.1 Áreas de forças moderadas

Na área cervical, quando submetida às forças moderadas a superfície óssea periodontal do osso alveolar fasciculado, aos 3 e 5 dias de observação - nos primeiros molares dos ratos submetidos à ação do alendronato desde a concepção, durante a fase intrauterina até o 74º dia de vida e movimentados ortodonticamente 41 dias após a interrupção da medicação - também se revelaram lacunas de Howship com clastos no contexto de unidades osteorremodeladoras. Os clastos, osteoblastos e macrófagos das unidades osteorremodeladoras apresentavam aspecto morfológico de normalidade. No ligamento periodontal correspondente, havia, na quase totalidade dos espécimes examinados deste período de 3 e 5 dias, áreas hialinas focais que indicavam efeito das forças aplicadas nos tecidos, com reabsorção óssea frontal em 5 de 8 espécimes. Nesta região cervical submetida a forças moderadas, no período de 7 dias, a superfície óssea periodontal estava sem clastos e as irregularidades provocadas pelas lacunas de Howship anteriormente instalada estavam regularizadas por neoformação óssea.

A característica marcante do Grupo Ensaio 1 foi a sua maior velocidade de reparação óssea após a movimentação dentária induzida. Apesar dos fenômenos próprios da movimentação dentária induzida terem ocorrido de forma semelhante nos períodos experimentais de 3 e 5 dias, aos 7 dias a crista óssea alveolar já estava reorganizada.

Na região apical, as forças moderadas induziram discretas alterações morfológicas de magnitude semelhante ao Grupo Experimental aos 5 dias de movimentação. Aos 7 dias praticamente não foram detectadas alterações morfológicas nesta região do Grupo Ensaio 1 sugerindo mais uma vez que a reparação periodontal e óssea estavam aceleradas.

5.2.3.2 Áreas de forças intensas

Assim como nos Grupos anteriores a área cervical submetida a forças intensas em todos os espécimes do Grupo Ensaio 1 apresentavam segmentos de hialinização nos 3 períodos de observação. Estes segmentos variavam, em média, de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ na extensão do comprometimento da superfície radicular no sentido longitudinal. A reabsorção óssea à distância neste Grupo Ensaio 1 mostrou-se muito semelhante morfológicamente ao Grupo Controle, mas com uma importante diferença na frequência e na morfologia das reabsorções radiculares associadas. Da mesma forma que no Grupo Experimental, neste Grupo Ensaio 1 as superfícies cementárias expostas pela morte dos cementoblastos em sua maior extensão não apresentavam clastos e lacunas de Howship, muito embora os clastos estivessem na sua proximidade imediata. Isto está relacionado à baixa frequência de reabsorções nos Grupos Experimental e Ensaio1 quando comparada com a do Grupo Controle. Em um dos espécimes deste grupo o clasto mostrava evidências morfológicas de apoptose.

Na região apical, as forças intensas não atuaram significante do ponto de vista morfológico, pois não houve alterações morfológicas, nem mesmo discretas. Mais uma vez isto está coerente com os achados na área cervical submetida a forças intensas. A hialinização segmentar do ligamento periodontal impede a movimentação dentária induzida no alvéolo, pois não haverá de imediato reabsorção óssea frontal, logo forças não atuaram diretamente no ligamento periodontal apical de forma significativa.

Figura 21 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Ensaio 1**, com administração do **alendronato**, na área **cervical** submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **3 dias** de movimentação dentária induzida. As áreas de cimento desnudo de cementoblastos não interagem com os clastos da região. (H.E. – aumentos originais: A = 20X, B = 100X).

Figura 22 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Ensaio 1**, com administração do **alendronato**, na área **cervical** submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **5 dias** de movimentação dentária induzida. As áreas de cimento desnudo de cementoblastos não interagem com os clastos apesar de sua proximidade. (H.E. – aumentos originais: A, B = 40X).

5.2.4 Grupo Ensaio 2 (Figuras 24, 25 e 26)

5.2.4.1 Áreas de forças moderadas

Na área cervical, quando submetida às forças moderadas a superfície óssea periodontal do osso alveolar fasciculado, aos 3 e 5 dias de observação - nos primeiros molares dos ratos submetidos à ação do alendronato já em idade adulta, a partir 118º dia de vida, por três meses até o final do experimento e submetidos à movimentação dentária induzida uma semana antes da imolação destes animais - também se revelaram lacunas de Howship com clastos no contexto de unidades osteorremodeladoras. Os clastos, osteoblastos e macrófagos das unidades osteorremodeladoras apresentavam aspecto morfológico de normalidade. No ligamento periodontal correspondente havia, na quase totalidade dos espécimes examinados deste período de 3 e 5 dias, áreas hialinas focais que indicavam efeito das forças aplicadas nos tecidos, com reabsorção óssea frontal em 9 de 10 espécimes. Neste grupo morfológicamente não houve diferenças com o grupo controle.

Por outro lado, na região apical as forças moderadas induziram discretas alterações morfológicas de magnitude semelhante ao Grupo Ensaio 1. Aos 7 dias ainda foram detectadas alterações morfológicas nesta região.

5.2.4.2 Áreas de forças intensas

Da mesma forma que nos Grupos anteriores a área cervical submetida a forças intensas em todos os espécimes do Grupo Ensaio 2 apresentavam segmentos de hialinização nos 3 períodos de observação. Estes segmentos variavam, em média, de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ na extensão do comprometimento da superfície radicular no sentido longitudinal. A reabsorção óssea à distância neste Grupo Ensaio 2 mostrou-se muito semelhante, quanto à frequência e à morfologia, aos demais grupos sob utilização do alendronato. Assim como no Grupo

Experimental e Ensaio 1, neste Grupo Ensaio 2 as superfícies cementárias expostas pela morte dos cementoblastos em sua maior extensão não apresentavam clastos e lacunas de Howship, muito embora os clastos estivessem na sua proximidade imediata.

Na região apical, as forças intensas não atuaram significativamente do ponto de vista morfológico, pois não houve alterações morfológicas, nem mesmo discretas, exceto no período de 3 dias.

Figura 24 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Ensaio 2**, com administração do **alendronato**, na área **cervical** submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **3 dias** de movimentação dentária induzida. Não se observa reabsorção radicular. (H.E. – aumentos originais: A = 20X, B = 40X).

Figura 25 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Ensaio 2**, na área **cervical** submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **5 dias** de movimentação dentária induzida com administração do **alendronato**. Não se observa reabsorção radicular, apesar de áreas radiculares sem revestimento de cementoblastos. (H.E. – aumentos originais: A = 20X, B = 40X).

Figura 26 – Aspectos microscópicos dos fenômenos observados no **Grupo Ensaio 2**, com administração do **alendronato**, na área **cervical** submetida a **forças intensas**, na face mesial da **raiz distal** do primeiro molar murino, após **7 dias** de movimentação dentária induzida. Nota-se um clasto aderido à superfície do cimento apresentando fragmentação nuclear, irregularidade em seu contorno e superfície, sem conseguir estabelecer uma lacuna de Howship. (H.E. – aumentos originais: A = 20X, B = 100X).

DISCUSSÃO

6 Discussão

6.1 Da concepção do trabalho

O modelo experimental em molares de ratos permite avaliar: 1) os fenômenos biológicos relacionados à movimentação dentária induzida e suas variáveis, incluindo-se a ação de medicamentos que possam influenciar a sua qualidade e a velocidade; 2) a frequência, intensidade e morfologia das reabsorções dentárias e os efeitos de variáveis físicas, biológicas e químicas como a possibilidade de medicamentos aumentarem a resistência à reabsorção radicular; mas também 3) as alterações na morfologia óssea dos maxilares, inclusive as decorrentes da ação medicamentos utilizados no tratamento de várias doenças e com uso simultâneo no tratamento ortodôntico.

A promissora e atual perspectiva terapêutica dos bisfosfonato torna premente a necessidade de estudos avaliando a influência destas drogas nas estruturas dentárias e circunjacentes. Por hipótese e em perspectiva, os bisfosfonatos podem aumentar a resistência dentária à reabsorção radicular e por isso propusemo-nos a determinar a influência da incorporação do alendronato na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções dentárias.

Desde os trabalhos pioneiros da primeira metade do século passado sedimentou-se o conhecimento de que os dentes não atuam como reservatório de íons minerais que poderiam ser mobilizados assim que se fizesse necessário em função dos índices séricos de cálcio baixos.

Recentemente, o trabalho de FRANCISCHONE⁴⁹ demonstrou em pacientes endocrinopatas que os dentes não participam do turnover ósseo e não

constituem reservas de cálcio para o organismo, mesmo em situações hormonais extremamente críticas, como no hiperparatireoidismo, os dentes permanecem preservados. O conteúdo mineral contido nos dentes é perene, a menos que removido por meio da reabsorção dentária proveniente da morte local de cementoblastos, desprovidos de receptores para os mediadores da remodelação óssea.

Por analogia quase que perfeita, o flúor também se incorpora nas estruturas mineralizadas por afinidade com os cristais de apatita¹¹⁶⁻¹¹⁸. Uma vez incorporado nos tecidos dentários permitem uma proteção à cárie. Diante destas evidências providencia-se a fluoretação das águas de abastecimento.

A concepção do presente trabalho adotou a hipótese de que presença dos bisfosfonatos na estrutura cementária e dentinária poderia inibir ou reduzir consideravelmente a reabsorção radicular durante a movimentação dentária induzida. Por extrapolação, pode-se aplicar o mesmo raciocínio hipotético para a movimentação ortodôntica, para os dentes traumatizados, clareados internamente ou submetidos a cirurgias paraendodônticas. Estas situações mencionadas são algumas das mais associadas às reabsorções radiculares indesejáveis.

Em trabalho anterior da mesma linha de pesquisa MAZZIEIRO⁹³ em 1999, administrou um tipo de bisfosfonato, do tipo clodronato, durante o experimento avaliando a movimentação dentaria experimentalmente em ratos, porém realizou-se a medicação apenas concomitantemente ao período de utilização dos dispositivos ortodônticos, não havendo, portanto tempo para a incorporação do bisfosfonatos ao osso. O referido trabalho revelou, de forma esperada, que a administração por curtos períodos de bisfosfonato não influencia na qualidade ou quantidade de movimento dentário induzido. Estes resultados são de extrema importância, pois a literatura menciona diversos trabalhos com

metodologia semelhante e conclusões duvidosas, afirmando exatamente o inverso.

Cientes então, das propriedades farmacocinéticas dos bisfosfonatos e de seus mecanismos de ação, projetou-se este trabalho avaliando a utilização a longo prazo dos bisfosfonatos, do tipo alendronato pela comprovada efetividade e por utilização clínica mais difundida, avaliando a sua incorporação aos tecidos dentários e a possibilidade de uma inibição das reabsorções dentárias.

Durante o período experimental questionou-se ainda mais além, a respeito da necessidade da administração dos bisfosfonatos além do período da rizogênese. Uma vez que os objetivos terapêuticos de interesse constituem a incorporação destas drogas à dentina e ao cimento, já não seria necessário o prolongamento desta terapêutica e a manutenção dos níveis ósseos de alendronato.

Este *insight* deu origem ao Grupo Ensaio 1, separando-se alguns animais e interrompendo a medicação com os bisfosfonatos a partir do segundo mês de vida, uma vez findada a rizogênese. Considerando que o turnover ósseo do murino é de um mês⁸⁷, realizou-se o movimento dentário induzido 41 dias depois. Presumindo-se a remoção do alendronato da superfície óssea alveolar neste período e a permanência do medicamento no dente, de forma ousada poderia-se imaginar que este seria o grupo com os resultados mais favoráveis. O número de animais designado para este grupo só não foi maior porque se optou por não interferir no número de animais constituintes do grupo principal, o Grupo Experimental e mantendo-se fiel ao objetivo e à metodologia inicial da pesquisa para o qual idealizou-se o trabalho.

A constituição do Grupo Ensaio 2 estabeleceu-se como uma forma ética de aproveitamento dos animais progenitores do Grupo Experimental e Ensaio 1. A premissa do trabalho propunha uma avaliação da incorporação dos

bisfosfonatos aos tecidos dentários desde o início da odontogênese, certificando a incorporação ininterrupta de alendronato ao dente. Com este intuito seria necessária a medicação prévia de animais matrizes e durante a gestação. Na verdade, não haveria necessidade da administração da droga aos machos, entretanto, já com o objetivo de aproveitar estes animais, optou-se pela medicação também dos machos e a observação dos efeitos do alendronato a longo prazo em adultos.

Os resultados do Grupo Ensaio 2 são de grande valia, considerando que a terapêutica mais difundida desta classe de drogas é indicada a adultos e estes cada vez mais procuram o tratamento ortodôntico. Qual seria a influencia da utilização prolongada em adultos? Os animais deste grupo, inicialmente destinados ao descarte, tornaram-se também importantes, afinal, um grupo de nove animais, quando analisado de forma agrupada, não é necessariamente pequeno, considerando que diversos trabalhos analisam grupos de três a seis animais^{93,108,109,155}, mas poderia ser ampliado para a maior consistência dos resultados.

6.2 Da metodologia empregada:

6.2.1 Sobre o modelo experimental: o animal

A interpretação das mudanças nos dentes e em seus tecidos de suporte, durante o movimento dentário induzido, baseiam-se em simulações e nos estudos de modelos experimentais desde SANDSTEDT¹³⁵ (1901) em cães, OPPENHEIM¹⁰³ (1911), em coelhos⁸, gatos³², posteriormente em macacos²⁶, e, mais freqüente e atualmente, em ratos^{1,5,17,66,76,81,89,93,108,136,137,151,155,161}. Nos ratos o primeiro molar é o dente movimentado pela ativação de uma mola ancorada nos incisivos (**Figuras 5, 6 e 7**). Os molares murinos são bem menos volumosos que os incisivos e apresentam 5 a 6 raízes cuja formação se completa

aproximadamente aos 70 dias³³ (**Figuras 8, 9 e 27**). Os incisivos são monorradiculados e apresentam rizogênese contínua durante toda a vida para compensar o constante desgaste promovido pela sua função de roer; sua raiz é longa e curva para trás e o ápice fica

localizado logo abaixo da região periapical dos primeiro e segundo molares. Sua exuberante base de implantação óssea permite a sua utilização como ancoragem para a movimentação do primeiro molar (**Figuras 8 e 9**).

Figura 27 – Cronologia da odontogênese e rizogênese murina de acordo com FARRIS³³

A remodelação óssea objetiva adaptar a forma do osso às demandas funcionais e mecânicas sobre ele exercidas, este processo caracteriza a homeostasia óssea^{124,125}. Os bisfosfonatos atuam na regularização desta homeostasia. A movimentação dentária induzida compartilha deste mesmo princípio, pois representa uma resposta adaptativa modificando a posição do dente sob a ação de forças.

A colocação de fios e molas nos molares exige habilidade para não lesar as papilas gengivais e sua permanência pelo tempo necessário não devem promover a instalação de doença periodontal (**Figuras 5, 6 e 7**). Ambas situações comprometem direta ou indiretamente a análise dos efeitos da movimentação dentária induzida na crista óssea e região cervical das raízes, a ponto de afirmar-se que se houver sangramento durante a colocação dos aparelhos, algo deve ter acontecido de errado e o espécime deve ser descartado da amostra. Muitos trabalhos publicados apresentam resultados comprometidos por inflamação extensa da papila gengival e do ligamento periodontal com perda óssea distal ao primeiro molar, pela utilização de fios grossos, elásticos grandes, traumatismos na instalação do aparelho, por contaminação bacteriana, dieta inapropriadamente sólida e outros fatores.

A figura geométrica formada por planos tangenciais às faces mesial, vestibular, distal e lingual dos primeiros molares murinos mais os planos tangenciais dos seus ápices radiculares e de suas cúspides está representada por um trapézio (**Figuras 9 e 10**). A ativação da mola com ancoragem no incisivo promovem forças biologicamente aceitáveis na raiz mesial em suas áreas de pressão e tensão. Nas regiões cervicais e apicais da raiz mesial do primeiro molar murino ocorrem os fenômenos celulares e teciduais em níveis desejáveis para que ocorra a movimentação dentária induzida com o mínimo dano estrutural e compatível com a normalidade das estruturas periodontais. Estas alterações podem assim ser estudadas em modelos experimentais para análises comparativas de variáveis propostas que possam interferir na movimentação dentária induzida.

Na raiz distal do primeiro molar murino, em função da forma trapezoidal deste dente (**Figuras 14, 15, 16, 18, 19 e 28**), além das forças geradas pela mola, há uma rotação potencial do dente no alvéolo, mas principalmente da raiz distal, aumentando o efeito das forças nos tecidos periodontais. Desta forma, na raiz

distal de um mesmo molar tem-se a oportunidade de estudar comparativamente os efeitos de variáveis sob condições de forças intensas biologicamente mais lesivas aos tecidos periodontais. Em suma, em um mesmo dente é possível estudar o efeito da mesma variável experimental aplicada sob condições de forças biologicamente aceitáveis e lesivas ao mesmo tempo. Estes aspectos morfológicos foram demonstrados em trabalhos anteriores realizados^{155,156}.

Os molares murinos não apresentam rizogênese contínua e esta característica, associada à morfologia radicular favorável, permitem a extrapolação para humanos de resultados obtidos neste modelo experimental de movimentação dentária induzida (**Figuras 9 e 10**), considerando-se as limitações inerentes à qualquer metodologia e animal experimental. Apesar de sua dentição diferir da humana, por serem monofiodontes e seus incisivos apresentarem crescimento contínuo, os molares assemelham-se aos dos humanos, guardando as mesmas proporções de tamanho e outras peculiaridades anatômicas, que permitem assim seu uso nesses tipos de experimentos^{113,140}.

O primeiro molar superior do rato apresenta cinco a seis raízes, sendo a mesiovestibular e a distovestibular⁶⁴ as maiores e mais utilizadas nas análises microscópicas, devido à localização das raízes em planos diferentes, impossibilitando a obtenção de todas em um mesmo corte longitudinal. (**Figura 28**). Os trabalhos utilizando cortes transversais das raízes do molar superior do rato ainda são escassos (**Figura 29**), talvez porque os critérios de análise deste modelo transversal ainda não estejam muito bem estabelecidos e necessitam de aprimoramentos como propõe-se em um dos trabalhos desta mesma linha, ainda em fase de realização (*)

* FRACALLOSSI, A. C. C. - Dissertação de mestrado intitulada: *Análise da movimentação dentária induzida e reabsorções radiculares em ratos normais e sob administração de bisfosfonatos: estudo comparativo em cortes longitudinais e transversais*; em fase de desenvolvimento para o Programa de Pós-Graduação em Patologia Bucal da FOB-USP, sob orientação do Prof. Dr. Alberto Consolaro.

Figura 28 – Observa-se claramente a forma trapezoidal do primeiro molar murino em microscopia eletrônica de varredura, com (B) e sem reabsorções dentárias (A). (Modificado de ALATLI-KUT; HULTENBY; HAMMARSTRÖM⁵, de 1994).

Figura 29 – Imagens de TANAKA et al.¹⁴⁷ e VERNA; ZAFFE; SICILIANI¹⁵⁹, demonstrando a dificuldade da obtenção de mais de duas raízes do primeiro molar murino, em um mesmo corte longitudinal. Por isto, a necessidade de estabelecer melhores critérios para a análise longitudinal.

O rato apresenta-se como um animal experimental acessível e de fácil manuseio e sua manutenção é mais barata quando comparada com às dos primatas, gatos e cães. A utilização de ratos em experimentos com movimentação dentária induzida oferece algumas vantagens, como a facilidade de obtenção dos animais, devido ao curto tempo de procriação e às ninhadas com muitos filhotes, o que permite, também, um melhor controle genético, padronização do experimento, facilidade de repetições e amostras com grande número de animais com padronização da alimentação e a docilidade dos animais. O modelo utilizando ratos, apesar do tamanho reduzido, possibilita condições adequadas para a instalação e manutenção do aparelho e a obtenção de quantidades representativas de tecidos para a inclusão e análise microscópica^{113,140}.

Os molares dos ratos apresentam as maiores semelhanças com os dentes humanos. O ciclo completo de seu desenvolvimento processa-se aos 100 - 120 dias iniciais de vida dos animais. Esses dentes sofrem desgaste muito lentamente, o que permite observações, mesmo na idade adulta, de alterações nos processos de desenvolvimento dentário³³ (**Figura 27**) das fases. A formação do cemento secundário inicia-se em torno do 35º dia, concomitantemente ao estresse funcional imposto aos dentes e, a partir daí, sua deposição torna-se constante durante toda a vida do rato, de modo que, na idade adulta, 1/3, ou mais, da raiz do dente é formada por cemento.

O primeiro molar superior apresenta cinco a seis raízes, sendo a mesiovestibular e a distovestibular as maiores e mais utilizadas nas análises microscópicas, devido à localização das raízes em planos diferentes, impossibilitando a obtenção de todas em um mesmo corte longitudinal. A região inter-radicular é ampla, havendo pouca deposição de cemento acelular no terço cervical. Os molares inferiores são pouco utilizados em pesquisas devido ao seu tamanho e às dificuldades que a mandíbula oferece para a instalação de

dispositivos ortodônticos. Além disso, as raízes dos incisivos inferiores passam abaixo das raízes dos molares, podendo-se especular que a utilização destes incisivos como ancoragem poderia provocar uma deformação óssea na região dos molares e interferir na interpretação dos eventos da movimentação dentária induzida¹⁴⁰.

O osso alveolar murino apresenta poucos espaços medulares e maior densidade em relação ao osso alveolar humano (**Figura 8**). O tecido osteóide é abundante, com linhas de reversão relacionadas à periodicidade dos processos de remodelação óssea. As fibras de Sharpey estão presentes, com inclinação peculiar, nas regiões cervical e supra-alveolar, diferindo, apenas moderadamente, das observadas em dentes humanos.

No ligamento periodontal, os vasos sangüíneos, os fibroblastos e as células mesenquimais encontram-se proporcionalmente distribuídos, lembrando o periodonto humano, inclusive na largura entre o osso e o dente. Os restos epiteliais de Malassez encontram-se presentes em número reduzido e caracteristicamente em forma de ilhotas.

No presente trabalho, utilizaram-se ratos da linhagem, Wistar (*Rattus norvegicus*). Um rato de 90 dias correspondente a um adulto jovem, já não existe mais crescimento e os animais encontram-se sexualmente maduros. A maturidade sexual destes animais ocorre em torno do 50º e 60º dia de vida. Recentes trabalhos indicam que 60% dos animais desta linhagem atingem a maturidade sexual em torno do 30º ao 50º dia, no gênero feminino e entre o 18º e o 31º para 85% dos animais do gênero masculino. A menopausa acontece por volta do 450º dia de vida^{113,140}.

Para se estudar a movimentação dentária induzida experimentalmente em ratos deve-se considerar a idade dos animais durante o experimento. A idade e peso corporal mais utilizados na literatura correspondem a animais de 90 a 120

dias pesando em média 350g^{93, 108, 155, 156}. Características que equivalem à fase adulta jovem do homem, pois os ratos apresentam um período de vida médio de um ano e meio³³. Neste período ocorre a completa formação das raízes dos molares.

O ideal seria a aplicação das drogas xilazina e ketamina em doses separadas para a anestesia, pois estas substâncias competem pelos mesmos receptores. Além disso, há risco de bradicardia pela administração do cloridrato de xilazina. Infelizmente o nível de estresse dos ratos seria de difícil controle após uma primeira injeção sem efeito anestésico, sendo necessária uma dose ainda maior para moderar a adrenalina endógena liberada pelos animais. É importante que a administração da solução anestésica não seja apenas subcutânea, pois se pode observar a necrose dos tecidos circundantes em cerca de 24 horas quando deste tipo de abordagem.

6.2.2 Sobre o modelo experimental: o aparelho

O tipo de aparelho utilizado para a movimentação dentária induzida em ratos pode variar em alguns trabalhos, mas nos dias atuais predominam *designs* semelhantes aos utilizados neste trabalho. As variações principais estão relacionadas com o tipo de fio, a extensão da mola, a forma de fixação no molar e no incisivo. A padronização deve ser promovida em todos os trabalhos para evitar-se que influências decorrentes das variáveis estudadas sofram modificações conseqüentes de componentes não padronizados dos aparelhos.

Alguns trabalhos,^{93,108,109,155,157,158} utilizaram o mesmo aparelho, mas com fios mais espessos que promovem lesões na papila interdentária e favorecem a instalação de doença periodontal. As lesões na papila dentária e a doença periodontal concomitante interferem significativamente nos resultados dos trabalhos de movimentação dentária induzida em ratos. Como sugestão, na

análise crítica de trabalhos sobre o assunto e na elaboração de trabalhos sobre o tema é sempre importante a apresentação de fotomicrografias em aumento menor que permitam a observação das estruturas periodontais vizinhas.

Outros modelos de aparelhos experimentais para a movimentação dentária induzida em ratos são parafusos expansores entre os primeiros molares superiores, molas promovendo a vestibularização dos primeiros molares superiores^{1,66,67} ou ainda a introdução de elastômeros entre o primeiro e o segundo molar superior^{74,75,161,178}.

O modelo de aparelho utilizando mola transversal^{1,74,75}, atua tanto nos dentes quanto da sutura palatina sem uma determinação segura da proporção em que isso ocorre. Não é possível uma aferição da padronização destas molas. A tabua óssea do rato é muito fina e limita o grau de observação microscópica, além de provocar deiscências.

Muitos trabalhos apresentam metodologias mal padronizadas, os aparelhos são instalados de forma muito aleatória. O modelo mais crítico é o de WALDO¹⁶¹, que preconiza a inserção de um elastômero entre o primeiro e o segundo molares superiores para induzir movimentação dentária. Esta forma de aplicação de força não permite a sua padronização ou quantificação exata, exercendo uma força não tão eficiente e nem tão contínua, mas rapidamente dissipante, pois atua sobre dois dentes, em vez de apenas um. Além disso, a força ainda é absorvida por uma considerável deflexão das cristas e septos ósseos de dois dentes, e não apenas de um.

O modelo utilizando as molas transversais de vestibularização dos molares e a inserção de um elastômero entre os molares do rato não permitem uma quantificação exata das forças empregas e, portanto, impedem uma padronização do modelo.

Em trabalhos anteriores, realizados na Disciplina de Patologia Bucal, utilizou-se uma mola de 6mm distendendo-a 2mm quando da ativação. No trabalho piloto desta tese, percebeu-se que a mola distendida em um comprimento total de 8mm, juntamente com as alças de dois a três helicóides nas extremidades, tornava-se um pouco grande para o espaço entre o primeiro molar superior esquerdo e o incisivo, dificultando a ativação em animais menores como nas fêmeas, por exemplo. Por isso optou-se por uma nova medida da mola de 4mm, ativando-se 2mm na instalação do aparelho e despendendo uma força de aproximadamente 75cN⁷⁰, no momento da ativação.

A utilização deste modelo utilizando uma mola fechada permite a quantificação e padronização das forças utilizadas neste modelo experimental e conferindo maior credibilidade aos resultados obtidos.

Os trabalhos VERNA; DALSTRA; MELSEN^{157,158} utilizaram o mesmo modelo de aparelho deste trabalho, ancorando-se no incisivos superior. A forma do incisivo do rato apresenta-se curvada para o palato, a sua erupção contínua desloca a mola para a incisal e lingual, reduzindo significativamente a efetividade da força ao longo de três semanas. Contrastando com a nossa experiência com este mesmo modelo experimental, após três semanas ou bem menos do que isso, a ancoragem se elimina pelo desgaste natural da borda incisal do incisivo devido à função mastigatória de alimentação do animal. Observa-se também que a movimentação dentária em ratos atinge seu pico máximo entre sete a dez dias, quando novas ativações dos aparelhos e nova fixação da ancoragem deve ser providenciada quando da necessidade de novos ciclos de movimentos dentários.

Considerando as figuras apresentadas e a espessura dos fios utilizados na movimentação dentária no experimento de VERNA, ZAFFE, SICILIANI¹⁵⁹, associado ao longo tempo de utilização do aparelho, três semanas, é bem provável que a perda óssea observada com a movimentação esteja mais associada à instalação de doença de periodontal do que ao movimento dentário

ou ao turnover ósseo alterado. Finalmente, não se realizaram análises microscópicas dos tecidos, utilizando-se apenas de mensurações da distância entre os dentes as imagens tomográficas.

6.2.3 Sobre o modelo experimental: o tempo de observação e critérios de análise

O tempo de observação dos efeitos periodontais das forças aplicadas na movimentação dentária induzida é fundamental para a consistência dos resultados obtidos. No estudo piloto deste trabalho, realizado para confirmar os melhores períodos de observação utilizados em outros trabalhos realizados da mesma equipe^{26,49,50,93,108,109,134,155,156} pudemos verificar que antes dos 3 dias, os efeitos periodontais são ainda iniciais e de difícil avaliação morfológica microscópica, provavelmente porque ainda estão ocorrendo ao nível molecular e bioquímico, predominando ainda a ativação metabólica celular e a mobilização celular.

Aos 3 dias pode-se observar as áreas hialinas, as primeiras BMUs a partir da observação dos clastos multinucleados e as primeiras lacunas de Howship. Aos 5 dias as áreas hialinas chegam a sua expressão morfológica máxima, as BMUs são numerosas e se houver lesão da camada cementoblástica morfológicamente, ela pode ser detectada. Nas áreas com hialinização segmentar do ligamento periodontal detecta-se a reabsorção óssea à distância. Em alguns espécimes pode ser detectada área de reabsorção dentária, ainda focal e inicial. Aos 7 dias, os fenômenos já estão em resolução; as áreas hialinas encontram-se em fagocitose com muitos macrófagos presentes permeados a fibroblastos e outras células mesenquimais participantes do reparo periodontal. Os cementoblastos ainda estão ausentes e áreas mais extensas de reabsorção radicular podem ser detectadas. Na periferia desta área periodontal as BMUs são

numerosas e presentes caracterizando classicamente a reabsorção óssea à distância.

Estes períodos de tempos experimentais permitem avaliar o amplo espectro de fenômenos periodontais da movimentação dentária induzida que se estende do primeiro aos 7-10 dias quando os tecidos periodontais tendem à normalidade. Após este período a mola perde sua ativação, não exercendo mais forças em decorrência da movimentação dentária obtida, mas também em decorrência da erupção contínua do incisivo que ao elevar a ancoragem para a margem incisal diminui a força exercida.

A análise dos efeitos de forças antes dos 3 dias ou após 7 dias, do ponto de vista microscópico óptico, não trás resultados comparativamente significantes entre as variáveis propostas a serem estudadas, pois não abrangem os principais fenômenos teciduais e celulares da movimentação dentária induzida.

Estas observações confirmam as de YOKOYA¹⁷⁸, que ao analisar a movimentação dentária em ratos em microscopia eletrônica e ótica observou da mesma forma que o número de clastos aumenta até o sétimo dia de movimentação e depois diminui até o 14º dia. Os clastos formam-se e são observados primeiramente nos canais vasculares da crista óssea alveolar no lado de pressão para depois atingirem à superfície óssea periodontal.

Entretanto, no trabalho de YOKOYA¹⁷⁸ observaram-se clastos um dia após o início do movimento, diferindo das observações deste trabalho utilizando aparelhos instalados e acionados com molas de aço. No modelo utilizado molas, os clastos aumentam significativamente até o terceiro dia, pois a força exercida é eficiente e bastante contínua. YOKOYA¹⁷⁸ utiliza o modelo de Waldo interpondo um elastômero entre o primeiro e o segundo molares superiores exercendo uma força não tão eficiente e nem tão contínua, mas rapidamente

dissipante, pois atua sobre dois dentes, em vez de apenas um. Além disso, a força ainda é absorvida por uma considerável deflexão das cristas e septos ósseos de ambos os molares.

Em trabalhos anteriores a análise microscópica registrava cada fenômeno e característica celular dos componentes envolvidos na movimentação dentária induzida. Esta forma extremamente detalhada permite um registro preciso e minucioso, mas não determinava e permitia mensurações diagnósticas como: reabsorção óssea a distância, reabsorção óssea frontal, reabsorção dentária, hialinização segmentar do ligamento periodontal em seus vários graus de severidade. Em termos de avaliação de efeitos e variações da movimentação dentária induzida e da reabsorção dentária a determinação e mensuração diagnósticas facilitam a comparação e compreensão prática dos resultados obtidos. Se aplicássemos os critérios agora adotados nos trabalhos de PEREIRA^{108,109} e de VASCONCELOS¹⁵⁵ com certeza os resultados teriam sido melhor compreendidos e difundidos.

6.2.4 Sobre o modelo experimental: o tempo de administração do bisfosfonato

Entre as variáveis estudadas experimentalmente na movimentação dentária induzida está a influência de certas drogas na velocidade de deslocamento dentário e na frequência de reabsorções radiculares^{32,75,93,137,157,158}. Um cuidado muito importante, mas nem sempre relevado nas metodologias se refere à dosagem, geralmente muito alta⁹⁵. Para uma extrapolação exequível deve se utilizar uma dosagem comparável à humana. Ainda em relação à dosagem deve se considerar o índice metabólico do animal experimental. Este índice metabólico determina a velocidade e tempo em que a droga permanecerá em níveis terapeuticamente ativos na circulação sanguínea e nos tecidos. Para a

determinação deste índice metabólico o peso não é a principal variável, mas também a superfície corporal. O índice metabólico de cada animal é muito variável de espécie para espécie; os ratos têm um índice metabólico próximo a 2 vezes mais veloz que a do homem^{10,73}. Na dosagem das drogas empregadas em experimentos em ratos a quantidade deve ser a correlata ao do homem, mas em frequência de administração deve ser dobrada. Por exemplo, se a dosagem humana corresponde a uma dose a cada 24 horas, no rato deverá ser a cada 12 horas.

Conforme o esperado a meia vida do bisfosfonato em humanos é muito maior do que nos ratos. Em estudos em murinos com 80 dias, o alendronato incorporado ao osso parece declinar após doses intravenosas com uma meia vida de 30 dias⁸⁷. O comportamento dos bisfosfonatos é dose e tempo dependente. Considerando a farmacocinética e o mecanismo de ação dos bisfosfonatos, como já mencionado no tópico a respeito dos efeitos e influência destas drogas nos tecidos dentários e circunjacentes, não se deve projetar trabalhos em ratos administrando os bisfosfonatos por períodos curtos inferiores a um mês no modelo experimental utilizando ratos. Sabe-se^{37,38,39,40,41,42,127} que os efeitos sistêmicos dos bisfosfonatos não são imediatos, que apesar das propriedades dos bisfosfonatos de inibir calcificações *in vitro*, percebeu-se que para que houvesse inibição eficaz da reabsorção óssea a administração dos bisfosfonatos deveria ser prolongada e os seus efeitos observados tardiamente de forma eficiente, constatando-se assim que a sua incorporação no osso é essencial^{124,125,126,127}.

No trabalho de MAZZIEIRO⁹³, realizado nesta linha de pesquisa de movimentação dentária induzida em ratos, constatou-se que a administração simultânea a movimentação ortodôntica de clodronato durante um período de até 21 dias não influenciou as estruturas ósseas alveolares e periodontais que permaneceram inalteradas quando comparadas aos grupos controle, nem tampouco quando da movimentação dentária induzida.

Por este motivo, além do intuito de permitir a incorporação do bisfosfonato às estruturas dentárias e, portanto em fase precoce desde a vida intrauterina, conscientemente administrou-se o alendronato por período suficiente para a avaliação dos seus efeitos enquanto droga do grupo dos bisfosfonatos.

No entanto, muitos autores^{1,66,67,75,80,82,137,153}, talvez, por superficialidade de conhecimento, efetuaram trabalhos com metodologia inadequada administrando os bisfosfonatos por períodos demasiadamente curtos, até mesmo insistindo em apresentar resultados favoráveis quanto à hipótese testada, expondo observações improváveis e resultados estatísticos altamente questionáveis. Alguns dentes trabalhos apresentam-se discutidos a seguir:

Os resultados do trabalho de ENGSTROM³² avaliando a reabsorção dentária em gatos hipocalcêmicos submetidos a movimentação dentária induzida e a bisfosfonatos, são questionáveis quanto: 1) os gatos apresentam predisposição à reabsorções dentárias cervicais e não nas porções laterais ou apicais de raízes e menos ainda quando submetidos à tratamento ortodôntico. O gato como modelo animal é interessante para o estudo da reabsorção cervical externa, relacionada a traumatismos e a clareação dentária; 2) o período de administração do bisfosfonato foi demasiadamente curto e insuficiente para a incorporação de suas moléculas no osso ou nos dentes; 3) na metodologia do trabalho não há descrição explícita da mensuração do movimento dentário *in vivo*. A pressuposição do trabalho é interessante, mas a metodologia, a forma de apresentação dos resultados não permite utilizar os dados como parâmetro ou modelo de fundamento para explicar os efeitos dos bisfosfonatos no movimento dentário induzido e reabsorções radiculares associadas.

O trabalho de LEKIC et al.⁸² avaliando o reparo pós-cirúrgico do ligamento periodontal sob a administração de etidronato relatou uma diminuição de 40% do espaço do ligamento periodontal. Os autores atribuíram estes

resultados a um favorecimento da instalação da anquilose alveolodentária pela administração do bisfosfonato. Entretanto, em nenhum momento o trabalho descreve ou discute a respeito da presença dos restos epiteliais de Malassez como protetor do espaço periodontal, mesmo em regime de administração de bisfosfonatos. A dose de bisfosfonato administrada foi altíssima em um curto período. Não seria talvez a toxicidade do bisfosfonato excessivo que mataria as células dos restos epiteliais de Malassez?

No trabalho de KIM et al.⁷⁵, por exemplo, além da utilização de elastômeros para a movimentação em ratos, os molares foram observados apenas após 21 dias de movimentação, quando já não é possível observar os fenômenos principais da movimentação dentária. A premissa do trabalho constitui na avaliação do potencial de inibição de recidiva da movimentação dentária pelo pamidronato e, portanto advoga que a permanência do elástico por 21 dias objetivando uma estabilização da movimentação realizada. A remoção do elástico por si só já é traumática ao periodonto podendo gerar novas mobilizações celulares interferindo nos resultados. Além disso, foi realizada uma única administração endovenosa de bisfosfonato apenas um dia antes da remoção do elástico intermolares, não sendo possível a incorporação do bisfosfonato ao osso. Esta metodologia não permite uma extrapolação adequada dos efeitos do bisfosfonato uma vez que sua atuação mais efetiva ocorre da sua incorporação ao osso e posterior liberação por meio da atividade clástica, Estes autores sugerem a atuação dos bisfosfonatos apenas sobre os clastos, com uma única administração de bisfosfonato. Tão poucos dias não seriam suficientes para a incorporação do bisfosfonatos no osso.

Da mesma forma, o trabalho de SATO et al.¹³⁷ relata a diminuição da expressão de H⁺-ATPase e catepsina K e a alteração da morfologia clástica durante a movimentação dentária induzida sob a administração de pamidronato dissódico. Estes resultados parecem também questionáveis, pois foi realizada

uma única administração via intraperitoneal de 1,5mg/1,0ml/Kg de bisfosfonato apenas um dia antes do início da movimentação dentária utilizando o elastômero intermolares. Seria improvável, portanto, observar quaisquer alterações sem a incorporação do bisfosfonato no osso e a sua posterior liberação quando da reabsorção.

A revisão de TYROVOLA; SPYROPOULOS¹⁵³ afiança a inibição do movimento dentário induzido ortodonticamente suportando-se no relato de um caso clínico⁹⁷ bastante questionável, de uma paciente submetida à terapêutica com bisfosfonatos. No mesmo trabalho, sem nenhuma citação adicional estes mesmos autores afirmam de forma irresponsável que a aplicação tópica de bisfosfonatos pode aumentar a ancoragem para o movimento ortodôntico de outros dentes. Esta declaração além de não metodologicamente e adequadamente testada pode acarretar efeitos deletérios quando aplicados à clínica ortodôntica diária.

A análise do turnover ósseo e a movimentação ortodôntica devem considerar que na maxila e mandíbula o turnover é naturalmente lento e a renovação óssea ocorre por períodos mais longos do que em outras partes do esqueleto. Outro fator que reforça essa condição é o caráter compensatório que o sistema endócrino apresenta. No trabalho de VERNA; DALSTRA; MELSEN¹⁵⁷ quando da injeção de hormônios em ratos, a tireóide reduziu a secreção endócrina e o nível sanguíneo aproximou-se ao normal. Ressalta-se ainda que o índice metabólico do animal é duas vezes mais alto que o do homem. As doses medicamentosas e hormonais devem ser diariamente duplicadas, ou seja, o tempo de administração deve ser reduzido à metade e as doses humanas mantidas. Nestes referidos trabalhos de VERNA; DALSTRA; MELSEN^{157,158} não se mencionou nenhum cuidado quanto à dosagem hormonal administrada.

6.2.5 Sobre o modelo experimental: a influência e efeito dos bisfosfonatos nas estruturas dentárias e circunjacentes

Os efeitos da utilização do alendronato na formação dentinária de raízes dentárias humanas imaturas foram avaliados em um modelo de estudo *in vitro*, por LIEWEHR, F.R. et al.⁸⁶. Os resultados demonstraram uma ação do alendronato sobre os odontoblastos, acelerando esta formação dentinária. Esta seria mais uma perspectiva de utilização destes agentes na prevenção e controle da reabsorção por substituição em dentes avulsionados.

No presente estudo à microscopia ótica de luz não se observaram alterações discrepantes no esmalte e na dentina dos ratos sob a utilização do alendronato, na baixa dosagem recomendada para humanos, desde o período pré-natal. Entretanto, não se utilizou uma metodologia específica ou um marcador para a observação da incorporação do alendronato na dentina e no esmalte, portanto seria necessário um estudo complementar que confirmasse estes dados no esmalte e na dentina.

Os trabalhos em tecidos dentários geralmente utilizam doses únicas de bisfosfonatos^{9,16,34,46,47,48,79,101,133,146,164,165}. O trabalho de FOUDA et al⁴⁶ apresenta dados e conclusões bastante imprecisos a respeito da interferência dos bisfosfonatos na dentina. O trabalho menciona a presença de hipoplasia de esmalte e redução na mineralização da dentina, mas muito variável e com uma única administração de bisfosfonatos. Outros trabalhos da mesma equipe Dinamarquesa e outros utilizam a mesma metodologia com doses únicas de bisfosfonatos apresentando resultados semelhantes, desta forma os efeitos dos bisfosfonatos na dentina e no esmalte são bastante questionáveis. Os dados destes trabalhos asseveram a incorporação dos bisfosfonatos ao dente, mesmo com doses únicas elevadas^{9,16,34,46,47,48,79,101,133,146,164,165}.

Em trabalhos sem a utilização da dosagem terapêutica recomendada para humanos torna-se difícil a extrapolação dos resultados para humanos. Já um trabalho mais recente, de TAKANO et al.¹⁴⁶, utilizando uma dosagem mais baixa de bisfosfonato, mas ainda elevada, não observou alteração do manto dentinário e sob a utilização de etidronato, quando da observação em microscopia eletrônica.

Os resultados do trabalho de WESSELINK; BEERTSEN¹⁷⁰ atribuem aos bisfosfonatos uma capacidade de redução da reabsorção dentária em casos de traumatismo radicular. O curto período de administração do bisfosfonato não permite a sua incorporação no dente nem no osso a ponto de atuar terapêuticamente. A célula chave da reabsorção dentária é o cementoblasto que precisa ser localmente destruído para expor a raiz a uma reabsorção dentária. No trabalho de WESSELINK; BEERTSEN¹⁷⁰ os incisivos reimplantados foram congelados e quando reimplantados já não mais apresentavam cementoblastos. Os bisfosfonatos não foram capazes de prevenir reabsorções totalmente uma vez que toda a superfície radicular cementária apresentava-se diretamente exposta. Entretanto, os efeitos observados no grupo após um mês de medicação justificam-se em decorrência de um efeito inicial dos bisfosfonatos já incorporados no osso, visto que um mês corresponde a 1/18 avos do tempo de vida do rato.

Em alguns trabalhos como os de YAFFE et al.^{174,177} e de WESSELINK; BEERTSEN¹⁷⁰, onde se aplica topicamente bisfosfonatos deve-se considerar que uma única aplicação tópica ou a administração intravenosa por curtos períodos, foram provavelmente instituídas considerando-se os efeitos destas drogas *in vitro* e em superfícies em que os bisfosfonatos atuam impedindo calcificações, mineralizações de matéria orgânica e evitando a calcificação da placa dentobacteriana. Os pirofosfatos são industrialmente utilizados em produtos de limpeza com finalidade de impedir calcificações e usualmente são

componentes dos dentifrícios antitártaro, amplamente disponíveis no mercado. Este efeito direto representa uma das aplicações dos bisfosfonatos, mas não o mecanismo de ação no tratamento dos quadros clínicos da osteoporose e de outras doenças ósseas sistêmicas. Nestes casos o mecanismo de ação associa-se à incorporação das moléculas de bisfosfonatos na estrutura óssea mineralizada. Os estudos sobre o efeito tópico dos bisfosfonatos em dentes avulsionados ou transplantados devem ser realizados e avaliados criteriosamente com metodologias refinadas para esclarecer definitivamente o assunto.

A presença de bisfosfonatos na estrutura radicular de dentes com periapicopatias crônicas poderia hipoteticamente apresentar efeito sobre os clastos, mas também sobre as bactérias e seus produtos na região apical, melhorando o prognóstico destes casos. Esta extrapolação de raciocínio da região periodontal para apical parece ser muito interessante e importante e requer estudos para se estabelecer alguma evidência de aplicabilidade clínica.

A utilização dos bisfosfonatos como elementos preventivos de perda óssea periodontal em cirurgias com retalhos mucoperiosteais, após exodontias, doença periodontal, deve se basear em morfologias mais refinadas do que a aplicada por KAYANAC et al.⁷², ALTUNDAL; GÜVENER⁶; ROCHA et al.¹²³ e outros^{13,19,71,72,83,115,138,166,176}. As metodologias utilizadas muitas vezes apresentam administrações únicas ou curtas de bisfosfonatos e revelam dados estatisticamente frágeis, com elevado desvio padrão, denotando diferenças questionáveis entre os grupos em que se utilizaram solução salina e alendronato. De forma intrigante estes autores^{13,19,71,72,83,115,138,166,176} utilizaram em seus trabalhos alendronato por períodos de uma semana antes e até por quatro semanas após a exodontia ou a cirurgia periodontal. É sabido que o efeito dos bisfosfonatos depende da sua incorporação prévia à matriz óssea e para isso requerem-se meses ou até um ano de terapêutica sistemática com os bisfosfonatos. Em pequenos períodos, de uma a quatro semanas, provavelmente

não houve tempo suficiente para a ação eficaz da droga, principalmente considerando a fragilidade estatística dos dados apresentados nos trabalhos mencionados.

Os resultados de TANI-ISHII¹⁴⁸ procedem com o mecanismo farmacocinético dos bisfosfonatos, considerando que um período de oito semanas de administração do incadronato constitui um período considerável da vida de um rato, havendo assim tempo para a incorporação do medicamento ao osso e sua posterior liberação por meio da remodelação óssea.

O mesmo raciocínio quanto à liberação primária dos bisfosfonatos por meio da remodelação óssea^{39,127} deve ser aplicado para a análise da real influência dos bisfosfonatos sobre a movimentação dentária induzida e as reabsorções radiculares a ela associadas. Os trabalhos propondo-se a estudá-las devem ter como base a farmacocinética da droga e a rigidez da análise morfológica e estatística dos dados obtidos.

O trabalho de GRIER; WISE⁵⁴, 1997, sobre a influência dos bisfosfonatos na erupção dentária sugere que a detecção de moléculas que de forma localizada promovam a reabsorção óssea podendo prover no futuro métodos de indução da erupção de dentes impactados, bem como promover a aceleração de movimentos ortodônticos. O efeito colateral de retardo de erupção advindo da terapêutica com os bisfosfonatos poderia ser favorável para um desejável prolongamento do período de dentadura mista, quando ainda se podem realizar procedimentos ortodônticos preventivos ou interceptores.

Segundo LEVIN et al.⁸⁵ a vida média do alendronato em humanos, quando incorporado a hidroxiapatita é de dez anos. A aplicação tópica do alendronato promoveria a sua ligação à dentina, assim explicando uma inibição ou retardo na reabsorção óssea de dentes desidratados de cães, mesmo na presença de anquilose. Para estes autores a solução empregada apresentava-se

relativamente concentrada e saturou a superfície das raízes com a droga e assim justificando os resultados na redução da reabsorção, quando da embebição no alendronato em comparação com o resultado obtido em soluções fluoretadas ou ao Emdogain. Apesar de meritória, a proposição destes autores e as explicações oferecidas para os efeitos benéficos obtidos são de difícil compreensão, pois consideram uma possibilidade de incorporação das moléculas de bisfosfonatos no cimento e na dentina quando embebidas em bisfosfonatos durante apenas cinco minutos. Os efeitos observados não poderiam ser decorrentes do pH da solução? Ou ainda, de prováveis efeitos antimicrobianos comprovados dos bisfosfonatos^{55,88,172}? Ou mesmo da própria solução de Hanks, utilizada como veículo? Alguns questionamentos a respeito da utilização tópica de bisfosfonato e seu efeito imediato requerem maiores esclarecidos, especialmente nos traumatismos dentários.

No trabalho de LIEWEHR et al.⁸⁶, ao estudar o efeito dos bisfosfonatos e do nitrato de gálio na redução da reabsorção óssea e dentinária em situação de reabsorção por substituição *in vitro*, mais uma vez os resultados sugerem que a superfície de dentes traumatizados ou de fatias de dentina com qualquer uma das soluções empregadas, inclusive bisfosfonatos reduzem a reabsorção radicular quando comparadas com as soluções controle, em geral salinas. Isto mostra que os efeitos das drogas não são específicos, mas provavelmente estejam relacionados ao pH, à ação microbiana, à estimulação celular iônica e não a um especial e específico efeito anti-reabsortivo.

6.3 Dos resultados

6.3.1 Da análise microscópica

A tese de FURQUIM⁵⁰, de 2002, demonstrou que raízes de forma rombóides e retangulares favorecem uma melhor distribuição da força

ortodôntica, quando comparadas a raízes de forma triangular. Da mesma forma, demonstrou que as cristas ósseas mais retangulares absorvem menos forças do que as mais triangulares, que por sua configuração mais delicada cedem mais quando submetidas à força. Cristas mais rígidas e retangulares concentram mais forças no ligamento periodontal, ocasionando a morte de cementoblastos e a instalação de reabsorções dentárias.

O primeiro molar superior do rato apresenta as raízes com a forma de uma clava, uma forma invertida em relação ao molar humano. A parte mais estreita e de maior concentração de força é a região cervical. Portanto, o movimento dentário tende a concentrar-se na região cervical e distribui-se melhor na região apical, cujo formato favorece a distribuição de forças, explicada por FURQUIM⁵⁰. Nas áreas apicais de pressão intensa, os fenômenos da movimentação dentária apresentaram-se inexpressivos, pois ocorrendo a hialinização segmentar e a reabsorção cervical a distancia a região apical permanece livre de fenômenos (**Figuras 11 e 27**).

Na raiz mesial, a crista óssea alveolar do primeiro molar do rato constitui uma face livre, uma vez que o rato não apresenta pré-molares ou caninos e, portanto nesta região as forças são bem absorvidas pela deflexão desta crista. Neste modelo, utilizando molas ancorando-se no incisivo para a mesialização do molar os resultados são mais significantes nas áreas cervicais da raiz distal devido à forma trapezoidal do molar, (**Figura 9 e 28**) que gira no alvéolo para mesial, concentrando as forças na raiz distal, comprimida contra a crista o septo interdentário e contra o volumoso septo inter-radicular.

Os resultados observados neste trabalho permitem afirmar que os bisfosfonatos incorporados à estrutura dentária e óssea não interferiram marcadamente na remodelação óssea e nos fenômenos típicos da movimentação dentária como mostram a **Tabelas 5.1 e 5.4**, inclusive nas reabsorções ósseas frontais e à distância e nas reabsorções dentárias.

A área de hialinização e as reabsorções ósseas à distancia apresentaram se iguais entre os grupos controle e bisfosfonatos. Microscopicamente, a única alteração marcante observada foi a reabsorção dentária. A morfologia do osso da distribuição dos clastos e BMUs apresentou-se normal no osso alveolar.

As reabsorções ósseas frontais e à distância apresentaram-se praticamente normais nos grupos experimentais, quando comparados ao controle, em termos estruturais e mecânicos. A utilização de altas dosagens de bisfosfonatos diminuíram o grau de crescimento ósseo, sem, porém interferir na qualidade de resistência mecânica do osso⁸⁴, ou seja há uma prevenção da reabsorção pelo alendronato, mas o osso mantém suas características estruturais e mecânicas normais⁵¹. De acordo com RODAN¹²⁶ o bisfosfonato torna o turnover ósseo mais lento e proporciona mais tempo para a sua organização estrutural, sem prejudicar ou alterar a organização estrutural do osso ou suas propriedades mecânicas. Estes dados explicam porque o bisfosfonato não altera as propriedades mecânicas do osso frente ao movimento dentário.

Os efeitos terapêuticos dramáticos dos bisfosfonatos não dependem da inibição da remodelação óssea normal, mas sim da reabsorção óssea patológica¹⁰⁷. Por este motivo não observam alterações na qualidade da movimentação ortodôntica, pois esta possui um caráter fisiológico (mesmo que com finalidade terapêuticas).

Morfológicamente o osso apresenta-se comparativamente igual ao do grupo controle quanto a distribuição e quantidade de linhas de reversão, proporção espaços medulares e trabéculas, espessuras das corticais e altura óssea periodontal. Outra observação corresponde ao número de clastos e unidades osteorremodeladoras e sua distribuição na estrutura óssea analisada, comparativamente igual nos grupos controle e experimentais com bisfosfonatos aplicados de formas diferentes. Estas observações corroboram com as conclusões de MAZZIEIRO⁹³ que também não observou diferença na

movimentação dentária induzida entre animais normais e os submetidos à administração de bisfosfonatos.

Provavelmente a incorporação dos bisfosfonatos desde o início da formação embrionária incluindo-se as fases de diferenciação, migração e maturação tecidual permitam uma estabilização bioquímica na atividade celular perante os bisfosfonatos com um aumento compensatório na secreção de hormônio paratireoidiano (PTH) e uma elevação nos níveis de 1,25-dihidroxitamina D. TUCCI et al.¹⁵² e CHESNUT et al.²² relataram este fenômeno compensatório de regulação em pacientes osteoporóticas tratadas com alendronato por um período de três e dois anos, respectivamente.

A diferença microscópica observada entre os Grupo Controle Experimental é realmente muito discrepante e só pode ser atribuída à presença de bisfosfonato no osso. Nos Grupos Ensaio 1 e 2, a diferença só não se apresentou mais significativa porque o número de animais por grupo foi realmente muito pequeno, pois se tratavam apenas de um grupo de aproveitamento dos animais progenitores dos demais grupos sob a utilização do alendronato.

De acordo com BERGSTROM et al.¹¹ o alendronato incorpora-se ao osso preferencialmente nas superfícies ósseas de reabsorção por ligar-se aos minerais dos fosfatos de cálcio expostos. A inibição da reabsorção propiciada pelo o alendronato em nosso trabalho corrobora com os resultados de ALAKANGAS et al.² pois nos Grupos Experimental, Ensaio 1 e 2, submetidos ao alendronato, os clastos pareciam “soltos”, despregados do osso, embora próximos à superfície². À microscopia de luz, observou-se a presença clástica, mas em maior número por área de reabsorção quando na superfície radicular. As BMUs presentes nas raízes do grupos experimentais estavam em pequeno número, em média com um a três clastos. Nos grupos experimentais alguns clastos apresentavam nitidamente morfologia de células em apoptose. Estes clastos,

mesmo que justapostos à superfície cementária sem cementoblastos, não reabsorviam dente, pois não havia lacunas de Howship.

A apoptose observada morfológicamente em nosso trabalho é concorde com a literatura a respeito do mecanismo de ação dos bisfosfonatos^{11,15,62,6374,75,105,124,125,131,143,154,163}. Os bisfosfonatos inibem a FPP (“farnesyl diphosphate syntase”) que constitui uma enzima essencial para a organização do citoesqueleto e para o transporte vesicular nos clastos. A inativação desta enzima desencadeia a inativação destas células quando da administração do alendronato. A interferência na função desta enzima pode induzir a apoptose nos clastos. Este mecanismo de interferência na via do mevalonato constitui um mecanismo específico do alendronato⁷. Além disso, confirmou-se^{136,137} que o alendronato ligado à superfície óssea é secretado durante a acidificação da lacuna de Howship e paralisa a reabsorção por meio da atuação nas bordas clásticas ativas.

As reabsorções ósseas e dentárias observadas indicam que os grupos experimentais não diferiram muito entre si. Entretanto, quando comparados com o controle não medicado com o alendronato a quantidade e o padrão de reabsorção dentária foi significativamente diferente, principalmente quando comparado ao Grupo Experimental.

No homem, determinados locais como o fêmur e o esterno sofrem remodelação da superfície óssea trabecular aproximadamente a cada dois anos e o processo de remodelação de uma nova unidade estrutural aproximadamente a cada seis meses. Esta informação explica porque a meia vida do bisfosfonato no osso varia de espécie para espécie⁸⁷. A afinidade do alendronato para com o fosfato de cálcio e sua persistente ligação com a hidroxiapatita promove a sua rápida incorporação no esqueleto³⁷. Uma vez incorporado no esqueleto a vida média de atividade do alendronato é alta, ao redor de 1000 dias em cães ou 3 anos⁸⁷ e dez anos para humanos.

No Grupo Ensaio 1, com bisfosfonatos incorporados desde a formação intrauterina e após a suspensão da medicação por um mês, é provável que tenha havido uma re-acomodação dos níveis metabólicos sem bisfosfonatos e a eliminação dos bisfosfonatos anteriormente incorporados pela remodelação óssea continuamente atuante. Considerando que o processo da remodelação óssea no rato ocorre ao redor de um mês⁸⁷ e que um rato vive em média um ano e meio e atinge a idade adulta aos 50 dias. Um mês de remodelação óssea é bastante significativo para a renovação de grande parte do seu esqueleto, mas os dentes formados permanecem com o bisfosfonatos incorporados. Depois de um mês da suspensão da administração dos bisfosfonatos movimentaram-se os dentes do Grupo Ensaio 1.

RODAN* revelou que o alendronato atua na superfície. Em profundidade este bisfosfonato não atua na reabsorção, ou seja, não adianta a presença grandes massas ósseas profundas incorporadas com alendronato. Para a inibição da reabsorção óssea é necessário que o alendronato apresente-se na superfície. Uma vez incorporado o bisfosfonato é liberado novamente apenas quando o osso for reabsorvido. A meia vida do bisfosfonato depende praticamente em sua totalidade do índice do turnover ósseo⁸⁷.

Na movimentação dentária induzida em ratos, os fenômenos reabsortivos são iniciais nos primeiros três dias, exuberantes aos cinco dias e suas conseqüências marcadamente presentes aos sete dias¹⁷⁸, período em que as áreas hialinizadas estão em franca reabsorção, a reabsorção óssea à distância presentes e os macrófagos e clastos presentes nas superfícies radicular promovendo a reabsorção superficial da raiz, preparando-a para uma nova fase de re-inserção das fibras colágenas e recoberto por parte dos novos cementoblastos.

Aos três dias de observação não houve diferença quanto à frequência de

* Em comunicação pessoal⁸⁷.

reabsorção, pois neste estágio de evolução do movimento dentário induzido em ratos ainda não há a instalação de reabsorções óssea ou dentária (**Figuras 13, 17, 21e 24**).

Quanto às áreas apicais de pressão intensa os fenômenos da movimentação dentária apresentaram-se também inexpressivos, pois ocorrendo a hialinização segmentar e a reabsorção cervical à distancia a região apical permanece livre de fenômenos. A análise das reabsorções dentárias neste modelo deve valorizar, portanto as regiões cervicais, especialmente na região cervical da raiz distal, onde há maior concentração de forças e a maior exuberância dos fenômenos reabsortivos.

A aplicação da força nos dentes do Grupo Ensaio 1 promoveu os mesmos fenômenos teciduais e celulares observados no Grupo Controle e típicos de uma área submetida à movimentação dentária com forças de intensidade aceitáveis biologicamente como às submetidas a forças intensas e lesivas para os tecidos. Dentre os fenômenos teciduais e celulares da movimentação dentária induzida o mais indesejável de suas conseqüências são as reabsorções radiculares e esta não estava presente nos dentes movimentados neste grupo de animais em que houve a suspensão da droga e cujos dentes foram movimentados depois de um mês da interrupção da administração do bisfosfonato. Com exceção de um espécime com reabsorção dentária, nos demais, mesmo com extensa hialinização segmentar do ligamento periodontal, ausência de cementoblastos e exposição da raiz, não houve reabsorção radicular.

6.3.2 Dos resultados estatísticos (Tabela 5.1 e Anexos)

Os testes não paramétricos utilizados com a finalidade de diferenciar estatisticamente os grupos quanto aos eventos microscópicos categorizados em forma de escores, demonstraram matematicamente que realmente os grupos

experimentais comportaram-se significativamente diferente do Grupo Controle, quanto à reabsorção radicular. Confirmando portanto, que a administração prolongada do alendronato e a sua incorporação ao osso e estruturas dentárias pode reduzir os níveis de reabsorções radiculares provocadas por movimentação dentária induzida.

No terço cervical, onde ocorre a maior concentração da força ortodôntica e local apropriado para a avaliação da reabsorção radicular neste modelo experimental, o Grupo Experimental apresentou níveis de reabsorção estatisticamente reduzidos ou ausentes, para um nível de significância de 5%.

Os grupos Ensaio 1 e 2 não se apresentaram diferentes do Grupo Controle para um nível de significância menor que 5%, apenas para um nível de significância menos exigente de 10%, ou seja com 10% de chance de erro. Devemos considerar entretanto, que estes grupos secundários, não eram o foco principal do trabalho e foram então constituídos de poucos animais. Em um novo experimento aumentando estas amostras, provavelmente esta diferença quanto à reabsorção dentária torne-se estatisticamente significativa para um nível de exigência de 5%, ou seja com apenas 5% de chance de equívoco.

Nas demais regiões observadas durante o trabalho não se observou diferenças estaticamente significantes. Esta ausência de diferença estatística corresponde com o esperado, dada a morfologia do molar murino e a experiência prévia de movimentação dentária induzida utilizando este modelo.

Os resultados estatísticos deste trabalho correspondem com fidedignidade as observações microscópicas realizadas, afiançando o método de avaliação e a calibração do examinador.

6.3.3 Quanto à tolerabilidade aos bisfosfonatos

Não se observou qualquer alteração macroscópica nos animais recebendo alendronato desde durante o período pré-natal neste trabalho. O trabalho de PATLAS et al.¹¹¹ relata algumas alterações ósseas nos fetos por dois bisfosfonatos administrados durante a vida intrauterina como diminuição do peso e do volume de medula óssea, mas sem interferência no volume cartilaginoso. Estes dados são justificados pela intensa remodelação óssea durante a vida intrauterina explicando a diminuição de peso nestes fetos e merecem confirmação antes da instituição da terapêutica com bisfosfonatos na gravidez.

No presente estudo, não se constatarem efeitos colaterais ou alterações observáveis nas estruturas examinadas, seja óssea ou dentária, mesmo quando da administração desde a vida intrauterina. Estes resultados corroboram com o obtido por GUY et al.⁵⁶ e LEPOLA et al.⁸⁴, quando da administração de alendronato e de clodronato por longo prazo em ratos em crescimento. Estes trabalhos são concordes ao relatar um aumento de massa e resistência óssea nos animais sem efeitos adversos da utilização de bisfosfonatos em baixas dosagens.

Ensaio clínico^{69,87,139} estabeleceram que a dosagem ideal de alendronato é de 10mg/dia administrados oralmente. Apesar de sua fraca biodisponibilidade após a administração oral, o alendronato é altamente eficaz na prevenção da perda óssea associada à ausência de estrógeno endógeno e demais quadros osteoporóticos com excesso de reabsorção óssea. Convencionou-se que a melhor dose de administração seria 10mg/dia por via bucal ou 0,25mg por via endovenosa^{69,139}.

A conveniência na dosagem é elemento chave no tratamento de uma doença crônica e principalmente no tratamento a longo prazo da osteoporose, portanto as marcas comerciais mais comuns e ensaios clínicos¹³⁹ preconizam

um comprimido de 70mg por semana para um adulto de 70Kg, ou seja, 10mg/dia via bucal, ou 1mgP/Kg semanalmente. Deste modo, administrou-se para os animais deste trabalho a mesma dose de 1mgP/kg em dose dobrada, duas vezes por semana.

Os relatos de efeitos colaterais dos bisfosfonatos e exacerbações de processos de mineralização ocorreram em organismos que receberam dosagens exageradas em trabalhos experimentais^{57, 95, 169, 170}.

Grande parte destes trabalhos em ratos^{57, 95, 169, 170}, utilizou dosagens de bisfosfonatos de 10mgP/Kg em vez de 1mgP/Kg, ou seja, dosagens dez vezes maiores que o correlato para humanos. Talvez tenha ocorrido algum engano quando da compreensão da dose ideal de administração. A dose ideal é de 10mg/dia para um indivíduo de 70Kg, ou seja, um valor de aproximadamente 0,14mgP/Kg por dia e não 10mgP/Kg por dia.

As reações adversas advindas da terapia com alendronato sódico são transitórias e normalmente associadas ao trato gastrointestinal superior como: náuseas, dispepsia e diarreia⁶⁹. Estes efeitos adversos demonstraram-se dose-dependentes, relatadas em 3 a 7% dos pacientes e não relacionada à dose de 5 a 20mg/dia. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre a frequência de reações adversas relatadas por pacientes do grupo placebo ou alendronato^{69, 78}.

Observou-se que nos dias seguintes à primeira administração do medicamento aos animais adultos, as fezes apresentaram-se com consistência alterada e mais amolecida, mas não caracterizando diarreia típica. Ocorreu uma breve regulação intestinal nos animais normalizando esta condição. A diarreia constitui um dos efeitos colaterais transitórios comum aos bisfosfonatos envolvendo o trato gastrointestinal^{69, 78}.

Mesmo para a administração do medicamento aos ratos adultos foi necessário redosar regularmente a diluição do medicamento, pois se alterou

significativamente o peso tanto dos machos quanto das fêmeas após o início da administração do alendronato sódico. A redosagem foi então necessária para a manutenção da administração de 1mgP/Kg duas vezes por semana.

O aumento de peso nestes animais apresenta-se concorde com a literatura, que relata de forma unânime o aumento de volume e peso quando do tratamento com bisfosfonatos⁶⁹.

Em trabalhos com uso prolongado (um, três a sete anos) com bisfosfonatos (pamidronato, etidronato ou olpadronato) ocorre, na grande maioria dos casos, melhora expressiva das dores ósseas, da incidência de novas fraturas, do grau de atividade física, da densidade óssea e dos marcadores de remodelação. O benefício mostrou-se mais acentuado em crianças (esqueleto em crescimento - alta remodelação) com nítida melhora da estatura final (em pacientes sem epífises fechadas) e no grau de atividade física dos pacientes. Observou-se inclusive um *catch-up growth*. Como o esqueleto das crianças (em alta remodelação) é particularmente sensível a fatores que interferem adversamente com o metabolismo ósseo, um eventual efeito deletério da administração de bisfosfonatos por longos períodos a estas crianças seria prontamente identificado; entretanto, a literatura demonstra segurança no uso dessas drogas^{18,84}.

Alguns trabalhos em humanos^{22,152} confirmaram segurança da utilização do alendronato por período prolongado demonstrando-se semelhante ao placebo e sem detectar maior frequência de efeitos adversos, exceto por suave dor abdominal, transitória e suave, facilmente resolvida com medicação.

A segurança do uso prolongada de bisfosfonatos precisa ser detalhadamente confirmada antes da utilização em humanos, com a finalidade de incorporação aos dentes como agentes protetores de reabsorções radiculares.

Entretanto, é comprovado que o alendronato não é citotóxico⁶⁸ como outros bisfosfonatos, o clodronato, por exemplo.

O alendronato é geralmente bem tolerado, quando tomado conforme recomendado, a curto e longo prazo, com as reações adversas mais comumente relatadas associadas ao trato gastrointestinal superior⁶⁹. Pela resistência à hidrólise e à degradação enzimática^{1,14,35,47,56,65,96}, os bisfosfonatos não são metabolizados pelo fígado no organismo, diminuindo o potencial tóxico dessas drogas⁸⁷.

Nota-se pouca preocupação na literatura com toxicidade ou efeitos adversos do uso prolongado do alendronato já que se realizou até a sua utilização profilaticamente por um período de três anos, com benefícios confirmados de prevenção de perda óssea sem maiores problemas. Deve-se considerar que esta pesquisa foi realizada pelo Merck Research Labs, que apesar da credibilidade internacional conferida à Merck Sharp and Dohme, trata-se de um laboratório com seus interesses comerciais⁶⁹.

São realmente promissoras e encorajadoras as perspectivas de utilização dos bisfosfonatos que em pouco mais de 40 anos de pesquisas demonstraram benefícios inestimáveis da sua utilização, em doenças ósseas, processos tumorais e em breve no de transporte ósseo de outros fármacos já existentes, aprimorando, a qualidade de diversas terapêuticas e melhorando a qualidade de vida dos pacientes em tratamentos esporádicos ou contínuos^{21, 22, 40, 104, 154}.

Os bisfosfonatos são atualmente largamente utilizados para fins industriais e comerciais, além da sua aplicação terapêutica. Relatou-se osteomalácia pelo uso de outros bisfosfonatos como o ácido etidrônico, nenhum problema desse tipo foi encontrado pela utilização do alendronato em ensaios clínicos durante dois a três anos⁶⁹. Portanto, uso do alendronato restringe a aplicação e extrapolação dos resultados apenas a este tipo de bisfosfonatos, visto que uma das características

deste grupo de drogas, a sua independência e perfil definido de efeitos, aplicações e manifestações colaterais.

6.3.4 Perspectivas terapêuticas clínicas odontológicas

Considerando a ausência de efeitos colaterais como foi observada nos animais, a não ser o aumento da massa corporal, é possível propor, tal como acontece com o flúor, a ingestão de bisfosfonatos durante a fase de vida da odontogênese, pois isto pode ser um fator protetor da raiz frente a reabsorções dentárias. As reabsorções dentárias estão presentes entre 6 a 10% das pessoas na população ocidental que nunca se submeteu a qualquer tratamento ortodôntico. A principal causa de reabsorção dentária no mundo ocidental está representada pela movimentação ortodôntica.

As implicações clínicas previsíveis desta maior resistência dos dentes à reabsorção radicular incluem movimentos dentários mais seguros, menor perda dentária por traumatismos dentários, melhora do prognóstico de reimplantes e transplantes dentários e ampliação das possibilidades de reimplantes intencionais e terapêuticos, entre outras.

Na odontogênese, a formação das raízes da dentadura permanente, inclusive dos terceiros molares inicia-se aos três anos e meio com o a rizogênese dos incisivos centrais e primeiros molares e termina aos 22 anos¹¹⁴.

A formação radicular do primeiro pré-molar termina aos 13 anos e meio e a do segundo pré-molar aos os 15 anos^{110,114}. Os pré-molares são dentes menos susceptíveis a traumatismos pelo seu posicionamento menos exposto e são menos exigidos nas movimentações dentárias induzidas. As reabsorções dentárias induzidas por movimentação ortodôntica, quando presentes, são menos graves que em outros grupos dentários como os incisivos^{110,114}. Grande

parte dos tratamentos ortodônticos inicia-se aos 12 anos quando já se observa na grande maioria dos pacientes a dentadura permanente exceto os segundos molares que irrompem a partir dos 12 anos e meio e dos terceiros molares, em média irrompendo aos 20 anos.

Os traumatismos também acometem principalmente os dentes anteriores, mais expostos quando de quedas ou batidas. Poderia-se considerar então, a administração de bisfosfonatos para a incorporação na estrutura dentária definitiva compreendendo as idades entre três anos e meio aos 12 anos, quando se completa a rizogênese dos caninos¹¹⁴.

A dose de eleição seria também de 10mg/dia ou 1mgP/Kg, já que a literatura não preconiza ajustes na dosagem de alendronato e não observou grandes variações nos resultados quando das entre as dosagens de 5 e 20mg/dia⁶⁹.

Seria desnecessária a administração do bisfosfonato além do período de formação radicular dos dentes permanentes, considerando que os dentes não participam do turnover ósseo, conclui-se que uma vez finalizada a rizogênese a incorporação do bisfosfonato será permanente. A interrupção da terapêutica com o bisfosfonato deve possibilitar a regularização do metabolismo ósseo e das compensações ocorridas durante o período da medicação^{22,152}.

A partir dos resultados obtidos e com confirmação a respeito de efeitos adversos, seria lícito propor uma terapêutica com bisfosfonatos em crianças, iniciando-se aos três anos de idade, evitando interferir na constituição dos dentes temporários e sua esfoliação. Além disso, não existem dados que suportem a segurança da utilização destas drogas durante o período pré-natal.

Não se observou diferença significativa dos fenômenos biológicos quando da movimentação dentária nos animais mais idosos, não osteoporóticos recebendo o alendronato por um período de três meses antes da instalação do

aparelho (Grupo Ensaio 2). Estes dados demonstram que movimentar os dentes de pacientes adultos, com estruturas periodontais saudáveis, sem quadros estabelecidos de osteoporose, mas sob medicação com alendronato sódico é perfeitamente seguro. Estes dados revelam que o alendronato não interfere na qualidade da movimentação dentária, corroborando com o observado por MAZZIERIO⁹³, em 1999.

Os bisfosfonatos ligam-se ao osso preferencialmente nos lugares de alto turnover e sua distribuição no osso não é homogênea⁸⁷, portanto pode-se esperar que nos bisfosfonatos não interfiram na movimentação ortodôntica de pacientes sob a medicação, representados neste estudo pelo Grupo Ensaio 2, pois o turnover ósseo dos maxilares é baixo.

A administração sistêmica de uma droga, como ocorreu e ainda ocorre com o flúor, suscita muita discussão sobre os benefícios e os efeitos colaterais advindos. A relação custo-benefício deve ser muito bem estabelecida e o protocolo deve ser minuciosamente pesquisado em cada detalhe; consideramos estes resultados apenas um ponto de partida importante para algo que possa trazer significantes avanços na prática odontológica.

O objetivo da administração do alendronato encerra-se em permitir a incorporação do bisfosfonato durante a formação radicular e assim protegê-la da reabsorção quando da morte de cementoblastos. Como os dentes permanentes não participam do turnover ósseo e, portanto não sofrem reabsorção fisiológica, não há necessidade de prolongar-se o período de medicação além do término da rizogênese. Assim sendo, os próximos trabalhos devem concentrar-se em testar a movimentação após o término da formação dentária sob a incorporação de bisfosfonatos apenas confirmar os resultados do Grupo Ensaio 2.

A efetividade e largo uso do bifosfanato na prevenção e tratamento de estados osteopênicos e na prevenção da osteoporose induziu-nos a formular a

hipótese de que dentes com moléculas de bisfosfonatos incorporadas em sua estrutura seriam mais resistentes à reabsorção dentária, inclusive durante o tratamento ortodôntico abrindo-se novas perspectivas de uma prática ortodôntica mais segura ao mesmo tempo em que contribuindo para a prevenção e redução da prevalência das reabsorções dentárias de um modo geral. Ao final da análise de nossos resultados podemos afirmar que encontramos dados que podem ser os primeiros sinais para que a hipótese formulada seja extensivamente estudada e se confirme a partir de outros trabalhos.

CONCLUSÕES

7 Conclusões

Em síntese, os resultados deste trabalho a respeito da movimentação dentária induzida, em molares de ratos, submetidos à administração por longo prazo de bisfosfonatos, do tipo alendronato, nos permitem as seguintes constatações:

- a** os níveis de reabsorções radiculares apresentaram-se significativamente reduzidos;
- b** não se observaram influências destes medicamentos no tecido ósseo, nos fenômenos celulares, teciduais ou no ligamento periodontal durante o movimento ortodôntico.

A partir da hipótese formulada, da revisão da literatura realizada e dos resultados obtidos, considerando ainda as limitações inerentes à metodologia, pudemos concluir que:

- 7.1** quando da administração dos bisfosfonatos, do tipo alendronato, desde o início da odontogênese, ou mais especificamente durante a rizogênese, a incorporação deste medicamento à dentina e ao cimento pode aumentar a resistência radicular às reabsorções dentárias associadas a movimentação dentária induzida e, por extensão, às promovidas pelos traumatismos dentários;
- 7.2** a medicação prolongada e supervisionada com bisfosfonatos, do tipo alendronato, não altera a movimentação dentária induzida nos ratos, mesmo quando da sua incorporação no tecido ósseo, pois não modifica as propriedades mecânicas do osso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas *

1. ADACHI, H. et al. Effects of topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on orthodontic tooth movements in rats. **J. Dent. Res.**, v.73, n.8, p.1478-84, 1994.
2. ALAKANGAS, A. et al. Alendronate disturbs vesicular trafficking in osteoclasts. **Calcif. Tiss. Int.**, v.70, n.1, p.40-7, 2002.
3. ALATLI, I.; HELLSING, E.; HAMMARSTRÖM, L. Orthodontically induced root resorption in rat molars after 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate injection. **Acta Odont. Scand.**, v.54, n.2, p.102-8, 1996.
4. ALATLI-KUT, I.; HAMMARSTRÖM, L. Root surface defects in rat molar induced by 1- hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate. **Acta Odont. Scand.**, v.54, n.1, p.59-65, 1996.
5. ALATLI-KUT, I; HULTENBY, K.; HAMMARSTRÖM, L. Disturbances of Cementum Formation induced By Single Injection of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) in rats: light and scanning electron microscopic studies. **Scand. J. Dent. Res.**, v.102, n.5, p.260-8, 1994.
6. ALTUNDAI, H.; GUVENER, O. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 33, p. 286-95, 2004.
7. AMIN, D. et al. Bisphosphonate used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 1657-63, 1992.
8. ASHCRAFT, M.B.; SOUTHARD, K.A.; TOLLEY, E.A. The effect of corticosteroid-induced osteoporosis on orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 102, n. 4, p. 310-9, 1992.
9. BEERTSEN, W.; NIEHOF, A.; EVERTS, V. Effects of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate(HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse. **Amer. J. Anat.**, v.174, n.1, p.83-103, 1985.
10. BENEDIKT apud KEIDEL, W. D.
11. BERGSTROM, J.D. et al. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. **Arch. Biochem. and Biophys.**, v.373, n.1, p.231-41, 2000.
12. BIJVOET, O. L. M. et al. **Bisphosphonate on bones**. Amsterdam., Elsevier Science B.V., 1995.

* Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento “Referências Bibliográficas: exemplos”, emanado pelo Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

13. BINDERMAN, I.; ADUT, M.; YAFFE, A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 8, p. 1236-40, 2000.
14. BONJOUR, J.P.; RIZZOLI, R. Treatment of hipercalcaemia of malignancy with clodronate. **Bone**, v.12, s.1, p.s19-s23, 1991.
15. BOYCE, R.W. et al. The effects of risedronate on canine cancellous bone remodeling: three-dimensional kinetic reconstruction of the remodeling site. **J. Bone Minerv. Res.**, v. 10, p. 211-21, 1995.
16. BRANDSTEN, C. et al. Coronal dentinal nodules induced by single or multiple injections of HEBP in young rats. **Connective Tissue Res.**, v. 32, n. 1-4, p. 275-9, 1995.
17. BRIDGES, T.; KING, G.; MOHAMMED, A. The effect of age on tooth movement and mineral density in the alveolar tissues of the rat. **Amer. J. Orthodont. Dentofac. Orthop.**, v.93, n.3, p.245-50, 1988.
18. BRUMSEN, C.; HAMDY, N.A.; PAPAPOULOS, S.E. Long-term effects of bisphosphonates on the growing skeleton. Studies of young patients with severe osteoporosis. **Medicine (Baltimore)**, v. 76, n. 4, p. 266-83, 1997.
19. BRUNSVOLD, M.A. et al. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. **J. Periodontol.**, v.63, n.10, p.825-30, 1992.
20. CARANO, A. et al. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vivo. **J. Clin. Invest.**, v.85,n.2, p.456-61, 1990.
21. CASTRO, L. F. et al. Bisfosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Quim. Nova**, v.27, n.3, p.456-60, 2004.
22. CHESNUT, C.H. et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. **Am. J. Med.**, v. 99, p. 144-51, 1995.
23. COLLINS, M.K.; SINCLAIR, P.M. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 94, n. 4, p. 278-84, 1988.
24. CONSOLARO, A. Biologia da movimentação dentária: Princípios básicos aplicados à clínica. In: Interlandi, S.: **Ortodontia: bases para a iniciação**. 4.ed. São Paulo, Artes Médicas, 1999. Cap.21, p.437-49.
25. CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas**. Maringá, Dental Press, 2002.
26. CUOGHI, O.A. **Avaliação macro e microscópica dos primeiros momentos da movimentação dentária induzida em macacos da espécie *Cebus Apella***. Bauru, 1997. 138p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
27. DAVIDOVITCH, Z. Tooth movement. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 2, n. 4, p. 411-50, 1991.
28. DELAISSE, J.; EECKHOUT, Y.; VAES, G. Bisphosphonates and bone resorption: Effects on collagenase and lysosomal enzyme excretion. **Life Sciences** v.37, n.24 p.2291-96, 1985.

29. DEVOGELAER, J.P. et al. Oral alendronate induces progressive increases in bone mass of the spine, hip, and total body over 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. **Bone**, v.18, n.2, p.141-50, 1996.
30. DONANGELO, I.; COELHO, S.M.; FARIAS, M.L.F. Osteogenesis imperfecta no adulto e resposta ao alendronato. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, n. 3, p. 309-13, 2001.
31. EISMAN, J.A.; CHRISTIANSEN, C.; McCLUNG, M. Alendronate prevents bone loss at the spine and hip in recently post-menopausal women (abstract). Rahway, New Jersey, USA: Merck Research Labs., Merck Sharp and Dohme, s.d.
32. ENGSTROM, C. Root resorptions during orthodontic tooth movement and bone remodelling dynamics during hypocalcaemia and treatment with bisphosphonate. In: DAVIDOVITCH Z. **The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption**. EBSCO Media, Birmingham, p. 391-397, 1988
33. FARRIS, E.J. Breeding of the rat. In:_____. **The rat in laboratory investigation**. 2.ed. New York, Hafner Publishing, 1963. Cap.1 , p.1-18.
34. FEJERSKOV, O.; JOSEPHSEN, K.; WEILE, V. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on secretory ameloblasts and enamel formation in rat incisor. **J. Biol. Buccale**, v. 18, p. 339-54, 1984
35. FELIX, R.; BETTEX, J.; FLEISCH, H. Effect of diphosphonates on the synthesis of prostaglandins in cultured calvaria cells. **Calc. Tissue Int.**, v.33, n.5, p.549-52, 1981.
36. FLANAGAN, A.M.; CHAMBERS, T.J. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. **Calc. Tissue Int.**, v.49, n.6, p.407-15, 1991.
37. FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **J. Clin. Invest.**, v.97, n.12, p.2692-6, 1996.
38. FLEISCH, H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. **Recents. Result. Cancer Res.**, v.116, p.1-28, 1989.
39. FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 1, p. 80-100, 1998.
40. FLEISCH, H. Bisphosphonates: Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. **Drugs**, v.42, n.6, p.919-44, 1991.
41. FLEISCH, H. et al. Influence of pyrophosphate on the transformation of amorphous to crystalline calcium phosphate. **Calc. Tiss. Res.**, v. 2, p. 49-59, 1968.
42. FLEISCH, H. et al. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo. **Calc. Tiss. Res.**, v.2, 1968. Supplement.
43. FLEISCH, H.; RUSSEL, R.G.G.; BISAZ, S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. **Am. J. Physiol.**, v. 203, n. 4, p. 671-75, 1962.
44. FLEISCH, H.; RUSSELL, R.G.G.; FRANCIS, M.D. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. **Science**, v. 165, p. 1262-64, 1969.

45. FLEISCH, H.; RUSSELL, R.G.G.; STRAUMANN, F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. **Nature**, v. 212, n. 5063, p. 901-3, 1966.
46. FOUDA, N. et al. Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. **J. Biol. Buccale**, v.19, n.1, p.106-15, 1991.
47. FOUDA, N.; CARACATSANIS, M; HAMMARSTRÖM, L. Developmental disturbances of the rat molar induced by two diphosphonates. **Adv. Dent. Res.**, v.3, n.2, p.234-40, 1989.
48. FOUDA, N.; KUT, I.A.; HAMMARSTRÖM, L. Effects of phosphonophormic acid and 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on distribution of tetracycline in the developing rat molar. **Scand. J. Dent. Res.**, v.100, n.5, p.257-65, 1992.
49. FRANCISCHONE, T.R.C.G. **Reabsorção dentária: determinação de sua frequência em pacientes com endocrinopatias**. Bauru, 2002. 122p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
50. FURQUIM, L.Z. **Perfil endocrinológico de pacientes ortodônticos com e sem reabsorções dentárias: correlação com a morfologia radicular e da crista óssea alveolar**. Bauru, 2002. 125p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2002.
51. GIAVARESI, G. et al. Comparison of calcitonin, alendronate and fluorophosphate effects on ovariectomized rat bone. **Biomed. Pharmacother**, v. 55, p. 397-403, 2001.
52. GOTCHER, J.E.; JEE, W.S. The progress of the periodontal syndrome in the rice cat. II - The effects of a diphosphonate on the periodontium. **J. Periodontal. Res.**, v.16, n.4, p.441-55, 1981.
53. GREENBERG, M.S. Intravenous bisphosphonates and osteonecrosis / Editorial/ **Oral Sug. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.98, n.3, p.259-60, 2004.
54. GRIER, R.L. IV; WISE, G.E. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. **J. Dent. Res.**, v. 77, n. 1, p. 8-15, 1998.
55. GUGGENHEIM, B. Effects of disphosphonate on total growth, terminal pH and total acid production of 4 strains of oral streptococci. **Helv. Odont. Acta**, v. 14, p. 45-47, 1970.
56. GUY, J. A. et al. Continuous alendronate treatment throughout growth, maturation, and aging in the rat results in increases in bone mass and mechanical properties. **Calcif. Tissue Int.**, v.53, n.4, p. 283-8, 1993.
57. HARDT, A.B. Bisphosphonate effects on alveolar bone during rat molar drifting. **J. Dent. Res.**, v.67, n.11, p.1430-3, 1988.
58. HAYASHI, S. et al. Commitent and differentiation of stem cells to the osteoclast lineage. **Biochem. Cell Biol.**, v. 76, n. 6, p. 911-22, 1998.
59. HELLER, I.J.; NANDA, R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. **Amer. J. Orthodont.**, v.75, n.3, p.239-58, 1979.
60. HORIE, D. et al. Clodronate stimulates bone formation as well as inhibits bone resorption and increases bone mineral density in rats fed a low-calcium diet. **J. Med. Dent. Sci.**, v. 50, p. 121-32, 2003.

61. HOUSTON, W.J.B. A new design of rat mouth prop. **J. Dent. Res.**, v.43, n.3, p.458, 1964.
62. HUGHES, D.E. et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **J. Bone Miner. Res.**, v.10, n.10, p.1478-87, 1995.
63. HUGHES, D.E. et al. Inhibition of Osteoclasts-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. **J. Clin. Invest.**, v. 83, n.6, p.1930-5, 1989.
64. HYVÖNEN, P.M.; HANHIJÄRVI, H. The effect of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) on fluoride kinetics during a 30-day treatment in the rat. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v. 85, n. 6, p. 429-33, 1989.
65. HYVÖNEN, P.M.; HANHIJÄRVI, H.; AHOSILTA, K. The effect of clodronate (dichloromethylene diphosphonate) on the mineral concentration of dental enamel and bone of the miniature swine. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.59, n.2, p.129-34, 1986.
66. IGARASHI, K. et al. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v.106, n.3, p.279-89, 1994.
67. IGARASHI, K. et al. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 9, p. 1644-1649, 1996.
68. ITO, M. et al. Comparison of cytotoxic effects of bisphosphonates *in vitro* and *in vivo*. **Calcif. Tissue Int.**, v. 63, p. 143-47, 1998.
69. JEAL, W.; BARRADEL, L. B.; MCTAVISH, D. **Alendronato**: uma revisão de suas propriedades farmacológicas e eficácia terapêutica na osteoporose pós-menopáusia. s.l , Aché, s.d.
70. JERRARD, H.G.; McNEILL, D.B. **Dictionary of scientific units**. 6.ed., London, Ed. Chapman & Hill, 1992.
71. KAYNAK, D. et al. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 790-96, 2000.
72. KAYNAK, D. et al. A histopathological investigation on the effect of systemic administration of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the rat mandible. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 1348-54, 2003.
73. KEIDEL, W.D. **Fisiologia**. 2.ed., Barcelona, Salvat, 1971.
74. KIM, K J. et al. A novel bisphosphonate inhibits inflammatory bone resorption in rat osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. **J. Orthop. Res.**, v.20, n.3 , p.499-505, 2002.
75. KIM, T.W et al. An ultrastructural study of the effects of bisphosphonate administration on osteoclastic bone resorption during relapse of experimentally moved rat molars. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v.115, n.6, p.645-53, 1999.
76. KYOMEN, S.; TANNE, K. Influences of aging changes in proliferative rate of PDL cell during experimental tooth movement in rats. **Angle Orthod.**, v.67, n.1, p.67-72, 1997.

77. LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-74, 1977.
78. LANZA, F. et al. The upper GI safety and tolerability of oral alendronate at a dose of 70 milligrams once weekly: a placebo-controlled endoscopy study. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 97, p. 58-64, 2002.
79. LARSSON, A. The short-term effects of high doses of ethylene-1-hydroxy-1,1-diphosphonate upon early dentin formation. **Calc. Tiss. Res.**, v. 16, p. 109-27, 1974.
80. LEE, K. et al. Effects of bisphosphonate on the remodeling of rat sagittal suture after rapid expansion. **Angle Orthod.**, v. 71, n. 4, p. 265-73, 2001.
81. LEIKER, B.J. et al. The effects of exogenous prostaglandins on orthodontic tooth movement in rats. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v.108, n.4, p.380-8, 1995.
82. LEKIC, P. et al. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. **Anat. Rec.**, v. 247, p. 329-40, 1997.
83. LEONARD, E.P.; REESE, W.V.; MANDEL, E.J. Comparison of the effects of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate and dichloromethylene diphosphonate upon periodontal bone resorption in rice rats (*Orizomys palustris*). **Archs Oral Biol.**, v.24, n.9, p.707-8, 1979.
84. LEPOLA, V.T. et al. Long-term effects of clodronate on growing rat bone. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 191-6, 1996.
85. LEVIN, L. et al. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. **Dent. Traumatol.**, v. 17, p. 120-26, 2001.
86. LIEWEHR, F.R. et al. Effect of bisphosphonate and gallium on dentin resorption *in vitro*. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 11, p.20-6, 1995.
87. LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 75-85, 1996.
88. LLAVANERAS, A. et al. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. **J. Periodontol.**, v. 72, p. 1069-77, 2001.
89. MACAPANPAN, L. C. et al. Early tissue changes following tooth movement in rats. **Angle Orthodont.**, v.24, n.2, p.79-95, 1954.
90. MAHESHWARI, U.R. et al. Effect of dichloromethylene diphosphonate on fluoride balance in healthy men. **J. Dent. Res.**, v. 62, n. 5, p. 559-61, 1983.
91. MARIANI, J.A.; ROWE, D.J. Diphosphonates: Therapeutic agents to inhibit bone resorption. **Iowa Dent. Jour.**, p. 38-39, 1988.
92. MARWICK, C. Estudo dos bisfosfonatos traz novas visões sobre o remodelamento ósseo e o tratamento das neoplasias esqueléticas. **JAMA Brasil**, v. 2, n. 2, p. 286-89, 1998.
93. MAZZIEIRO, E.T. **Bisfosfonato e movimentação dentária induzida: avaliação microscópica de seus efeitos**. Bauru, 1999. 154p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

94. MENSCHUTKIN, N. Ueber die einwirkung des chlorazetyls auf phosphorige saure. **Ann. Chem. Pharm.**, v. 133, p. 317-20, 1865 apud Rodan, Fleisch
95. MILHAUD, G.; LABAT, M.; MORICARD, Y. (Dichloromethylene)diphosphonate-induced impairment of T-lymphocyte function. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 80, p. 4469-73, 1983.
96. MILLER, S.C.; JEE, W.S.S. The effect of dichloromethylene diphosphonate, a pyrophosphate analog, on bone and bone cell structure in the growing rat. **Anat. Rec.**, v.193, n.3, p.439-62, 1979.
97. MIYAJIMA, K.; NAGAHARA, K.; IIZUKA, T. Orthodontic treatment for a patient after menopause. **Angle Orthod.**, v. 66, n. 3, p. 173-80, 1996.
98. MÜHLEMANN, H.R. et al. Effect of Disphosphonate on Human Supragingival Calculus. **Helv. Odont. Acta** v.14, p.31-33, 1970.
99. MÜHLEMANN, H.R.; AESCHBACHER, M. Inhibition of enamel remineralization by diphosphonate. **Helv. Odont. Acta**, v.14, p. 30, 1970.
100. NORTON, L. A.; BURSTONE, C. J. **The biology of tooth movement**. Boca Raton, CRC Press, 1989.
101. OGAWA, Y. et al. 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) simultaneously induces two distinct types of hypomineralization in the rat incisor dentine. **Calcif. Tissue Int.**, v. 44, p. 46-60, 1989.
102. OLSON, H.M.; HAGEN, A. Inhibition of post-extraction alveolar ridge resorption in rats by dichloromethane diphosphonate. **J. Periodont. Res.**, v.17, n.6, p.669-74, 1982.
103. OPPENHEIM, A. Tissue changes particularly of the bone. **Trans. Europ. Orthodont. Soc.**, v. 8, n. 11, 1911 apud DAVIDOVITCH, Z., p. 412.
104. OSTEOPOROSIS AND BONE PHYSIOLOGY. **Bisphosphonates**. Disponível na Internet. <http://courses.washington.edu/bonephys/opbis.html>. 3 de setembro de 2004.
105. OTT, S.M. Clinical effects of bisphosphonates in involutional osteoporosis. **J. Bone Miner.**, res. 8, Supl. 2: S597-606, 1993.
106. PAPAPOULOS, S.E.; FROLICH, M. Prediction of the outcome of treatment of Paget's Disease of bone with bisphosphonates from short-term changes in the rate of bone resorption. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, n. 11, p. 3993-7, 1996.
107. PARFITT, A.M. et al. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates (theoretical perspective). **J. Bone Miner. Res.**, v. 11, n. 2, p. 150-9, 1996.
108. PEREIRA, A.A.C. **Avaliação microscópica da influência de anticoncepcional e gravidez na movimentação dentária induzida, em especial nos fenômenos da reabsorção dentária**. Bauru, 1995. 141p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
109. PEREIRA, A.A.C. **Influência da ovariectomia na movimentação dentária induzida: avaliação microscópica**. Bauru, 2000. 127p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2000.

110. PINDBORG, J.J. **Pathology of the hard dental tissue**. Copenhagen, Munksgaard, 1970
111. PLATAS, N. et al. Transplacental effects of bisphosphonates on fetal skeletal ossification and mineralization in rats. **Teratology**, v. 60, p. 68-73, 1999.
112. PLOTKIN, L.I. et al. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin (hormones and metabolism). **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 10, p. 1363-74, 1999
113. PORTER, G. The norway rat (*Rattus norvegicus*). In: LANGE-PETTER, W. et al. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 3.ed. London, Livingstone, 1967. Cap.22, p.353-90.
114. PROFFIT, W.R.; FIELDS, H.W. **Contemporary orthodontics**. 3.ed. St. Louis: Mosby, 2000.
115. REDDY, M.S. et al. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. **J. Periodont.**, v.66, n.3, p.211-7, 1995.
116. REGOLATI, B.; HOTZ, P. Effects of Pyrophosphate and Diphosphonate on Fluoride Uptake by Hydroxyapatite. **Helv. Odont. Acta** v.14, p.42-44, 1970.
117. REGOLATI, B.; MÜHLEMANN, H.R. Effects of diphosphonates and fluoride on caries, fluoride content and dissolution of rat molars. **Helv. Odont. Acta** v.14, p.37-42, 1970.
118. REGOLATI, B.; SCHMID, R.; MÜHLEMANN, H.R. The effects of diphosphonate, pyrophosphate and sodium fluoride on drinking habits of Osborne-Mendel rats. **Helv. Odont. Acta**, v. 14, p. 34-36, 1970.
119. REITAN, K.; KVAM, E. Comparative behaviour of human and animal tissue during experimental tooth movement. **Angle Orthodont.**, v.41, n.1, p.1-14, 1971.
120. REITAN, K.; KVAM, E. Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. **Angle Orthod.**, v. 34, n. 4, p. 244-55, 1964.
121. REITSMA, P.H. et al. Differential action of bisphosphonates (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) and disodium dichloromethylidene bisphosphonate (Cl2MBP) on rat macrophage-mediated bone resorption in vitro. **J. Clin. Invest.**, v.70, p.927-33, 1982.
122. ROBINSON, Q.C.; WOODS, M.A.; HARRIS, E.F. External root resorption: an epidemiologic study of causes. **J. Dent. Res.**, v. 70, p. 419, 1991. Special issue. Abstract nº. 1227.
123. ROCHA, M. et al. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 Diabetes Mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 2, p. 204-9, 2001.
124. RODAN, G. A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocr. Rev.**, v.19, n.1, p.80-100, 1998.
125. RODAN, G. A. Mechanisms of action of bisphosphonates. **Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.**, v.38, p.375-88, 1998.
126. RODAN, G.A. Bone mass homeostasis and bisphosphonate action. **Bone**, v. 20, n.1, p. 1-4, 1997.

127. RODAN, G.A.; FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: mechanisms of action (Perspectives). **J. Clin. Investigation**, v. 97, n. 12, p. 2692-96, 1996.
128. ROODMAN, G.D. Cell biology of the osteoclast. **Exp. Hematol.**, v. 27, n. 8, p. 1229-1241, 1999.
129. ROOIJEN, N.V. Extracellular and intracellular action of clodronate in osteolytic bone diseases? A Hypothesis. **Calc. Tissue Int.**, v.52, n.6, p.52-6, 1993.
130. ROSENQUIST, J.B.; BAYLINK, D. Resorption of bone implants. **Int. J. Oral Surg.** v.7, p.7-10, 1978.
131. RUSSEL, R.G.G.; ROGERS, M.J. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. **Bone**, v. 25, n. 1, p. 97-106, 1999.
132. SAHNI, M. et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. **J. Clin. Invest.**, v.91, n.5, p.2004-11, 1993.
133. SAKAI, H. et al. Intermittent inhibition of dentin mineralization of rat incisors under continual infusion of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) using a subcutaneous mini osmotic pump. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 62, n. 2, p. 171-79, 1999.
134. SALES, C.L.F. **Avaliação dos efeitos do glutraldeído sobre os tecidos pulpare e periapicais após pulpotomias em molares de ratos: estudo microscópico.** Bauru, 120f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1989.
135. SANDSTEDT, C. 1901. [*Nagra bidrag til tandregleringens teori*, P. A. Nordstedt & Stoner, Stockholm] apud DAVIDOVITCH, Z. Tooth movement. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 2, n. 4, p. 411-450, 1991.
136. SATO, M. et al. Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **J. Clin. Invest.**, v.88, p.2095-105, 1991.
137. SATO, Y. et al. Bisphosphonate administration alters subcellular localization of vacuolar-type H(+)-ATPase and cathepsin K in osteoclasts during experimental movement of rat molars. **Anat. Rec.**, v. 260, n. 1, p. 72-80, 2000.
138. SCHMIDT, L.J.; ROWE, D.J. The effects of diphosphonates on alveolar bone loss. **Quintessence Int.**, v.18, n.7, p.497-501, 1987.
139. SCHNITZER, T. et al. Therapeutic equivalence of alendronate 70mg once-weekly and alendronate 10mg daily in the treatment of osteoporosis. **Aging Clin. Exp. Res.**, v. 12, p. 1-12, 2000.
140. SCHOUR, I.; MASSLER, M. The teeth. In: FARRIS, E.J.; GRIFFITH J.Q. **The rat in laboratoty investigation**, 2.ed. New York, Hafner Publishing Co., 1963, Cap.6, p.104-65.
141. SIMMELINK, J.W. Ultrastructural effects of diphosphonates on dental enamel. **Adv. Dent. Res.**, v.1, n.2, p.356-65, 1987.
142. SOMMERCORN, L.M. et al. Effect of alendronate on immature human dental root explants. **J. Endodontics**, v. 26, n. 3, p. 133-137, 2000.
143. STORM, T. et al. Changes in bone histomorphometry after long-term treatment with intermittent, cyclic etidronate for postmenopausal osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 8, n. ---, p. 199-208, 1993.

144. STURZENBERGER, O.P.; SWANCAR, J.R.; REITER, G. Reduction of dental calculus in humans through the use of a dentifrice containing a crystal-growth inhibitor. **J. Periodont.**, v. 42, n. 7, p. 416-19, 1971.
145. SUDA, T. et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocr. Rev.**, v. 20, n. 3, p. 345-57, 1999.
146. TAKANO, Y. et al. Demonstration of putative Ca-binding domains in dentin matrix of rat incisors after daily injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP). **Eur. J. Oral Sci.**, v. 106, p. 274-81, 1998. Supplement 1.
147. TANAKA, M. et al. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 95, n. 4, p.495-502, 2003.
148. TANI-ISHII, N. et al. Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by *Porphyromonas gingivalis* infection. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 603-9, 2003.
149. THE CLEVELAND CLINIC. **Multiple myeloma research center**. Disponível na Internet. <http://www.clevelandclinic.org/myeloma/MedicineMainPage.html>. 3 de novembro de 2004.
150. TOKUGAWA, Y. et al. Effects of bisphosphonate on bone reaction after placement of titanium implants in tibiae of ovariectomized rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 18, p. 66-74, 2003.
151. TOMS, S.R.; EBERHARDT, A W. A nonlinear finite element analysis of the periodontal ligament under orthodontic tooth loading. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v.123, n.6, p.657-65, 2003.
152. TUCCI, J. R. et al. Effects of three years of oral alendronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis. **Am. J. Med.**, v.101, n.5, p.488-501, 1996.
153. TYROVOLA, J.B.; SPYROPOULOS, M.N. Effects of drugs and systemic factors on orthodontic treatment. **Quintessence Int.**, v. 32, p. 365-71, 2001.
154. VASCONCELOS, D. V.; DUARTE, M . E.; MAIA, R. C. Efeito anti-tumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva terapêutica. **Rev. Bras. Cancer.**, v. 50, n. 1, p. 45-54, 2004.
155. VASCONCELOS, M.H.F. **Análise morfológica comparativa do periodonto de sustentação submetido a forças biologicamente excessivas, em ratas adultas sem e sob o uso de anticoncepcionais e ratas prenhes**. Bauru, 1996. 148p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
156. VASCONCELOS, M.H.F. et al. A histological study of tooth movement in rats under contraceptive use. In: DAVIDOVITCH Z.; MAH J. **Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants**. Alabama, Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, 1998.
157. VERNA, C.; DALSTRA, M.; MELSEN, B. The rate and the type of orthodontic tooth movement is influenced by bone turnover in a rat model. **Eur. J. Orthod.**, v. 22, p. 343-52, 2000.

158. VERNA, C.; MELSEN, B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. **Orthod. Craniofacial Res.**, v.6, p.155-63, 2003.
159. VERNA, C.; ZAFFE, D.; SICILIANI, G. Histomorphometric study of bone reactions during orthodontic tooth movement in rats. **Bone**, v.24, n.4, p.371-79, 1999.
160. VITTE, C.; FLEISH, H.; GUENTHER, H. L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, v.137, n. 6, p.2324-33, 1996.
161. WALDO, C. M.; ROTHBLATT, J. M. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat: procedure and preliminary observations. **J. Dent. Res.**, v. 33, n.4, p. 481-6, 1954.
162. WARITA, H. et al. Effects of local injection with bisphosphonate (HEBP) on experimental tooth movement. **J. Jpn. Orthodont. Soc.**, v.51, n.4, p.292-301, 1992.
163. WATANABE, J. et al. Cytochemical and ultrastructural examination of apoptotic odontoclast induced by bisphosphonate administration. **Cell Tissue Res.**, v. 301, p. 375-87, 2000.
164. WEILE, V.; JOSEPHSEN, K.; FEJERSKOV, O. Effects of single doses of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate on the mineralizing front of rat incisor enamel: A microradiographic and scanning electron microscopic study. **Arch. Oral Biol.**, v.35, n.11, p.857-67, 1990.
165. WEILE, V.; JOSEPHSEN, K.; FEJERSKOV, O. Scanning electron microscopy of final enamel formation in rat mandibular incisors following single injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate. **Calcif. Tissue Int.**, v. 52, p. 318-24, 1993.
166. WEINREB, M. et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkey. **J. Periodont. Res.**, v.29, n.1, p.35-40, 1994.
167. WESSELINK, P.R.; BEERTSEN, W. The prevalence and distribution of rests of malassez in the mouse molar and their possible role in repair and maintenance of the periodontal ligament. **Arch Oral Biol.**, v.38, n.5, p.399-403, 1993.
168. WESSELINK, P.R.; BEERTSEN, W. Ankylosis of the mouse molar after systemic administration of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP). **J. Clin. Periodontol.**, v.21, n.7, p.465-71, 1994.
169. WESSELINK, P.R.; BEERTSEN, W. Repair processes in the periodontium following dentoalveolar ankylosis: the effect of masticatory function. **J. Clin. Periodont.**, v.21, p.472-78, 1994.
170. WESSELINK, P.R.; BEERTSEN, W. The influence of 1-Hydroxyethylidene-1,1-Bisphosphonate (HEBP) on dental root resorption in the mouse. **Calcif. Tissue Int.**, v. 45, p. 104-10, 1989.
171. WILLIAMS, S. A histomorphometric study of orthodontically induced root resorption. **Eur. J. Orthod.**, v. 6, n.1, p.35-47, 1984.
172. WÖLTGENS, J.H.M.; BERVOETS, J.M.; VRIES, W. Influence of diphosphonates on the pyrophosphatase activity in *Streptococcus mutans*. **J. Periodontal Res.**, v.12, n.6, p.462-6, 1977.

173. WOODS, M.A.; ROBINSON, Q.C.; HARRIS, E.F. The population distribution of cases with root resorption. **J. Dent. Res.**, v. 71, p. 214, 1992. Special issue. Abstract nº. 870.
174. YAFFE, A. et al. Combined local application of tetracycline and bisphosphonate reduces alveolar bone resorption in rats. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 1038-42, 2003.
175. YAFFE, A. et al. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. **J. Periodontol.**, v. 68, p. 884-89, 1997.
176. YAFFE, A. et al. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 10, p.1607-12, 2000.
177. YAFFE, A. et al. The influence of alendronate on bone formation and resorption in a rat ectopic bone development model. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 44-50, 2003.
178. YOKOYA, K.; SASAKI, T.; SHIBASAKI, Y. Distributional changes of osteoclasts and pre-osteoclastic cells in periodontal tissues during experimental tooth movement as revealed by quantitative immunohistochemistry of H⁺-ATPase. **J. Dent. Res.**, v. 76, n. 1, p. 580-87, 1997.

ABSTRACT

Abstract

The influence of bisphosphonates on induced tooth movement and root resorption

Bisphosphonates are a class of drugs acknowledged for their ability to prevent bone resorption. The presented study tested the following hypothesis: Could bisphosphonates prevent root resorption once incorporated into dentin or cementum? 89 Wistar rats (*Rattus norvegicus, albinus*) with and without bisphosphonate medication, alendronate, at a dosage of 1mgP/Kg twice-weekly, were submitted to induced tooth movement for 0, 3, 5 and 7 days. The orthodontic appliance consisted of a coil spring moving the first left molar forward supported by the incisor. The rats were divided into 4 groups and submitted to different protocols of medication. The Control Group received no medication whatsoever; Experimental Group 1 was submitted to alendronate intake since intrauterine life until the end of the experiment; Experimental Group 2 received alendronate during intrauterine life until the 60th day of life. A month after medication interruption the molars were moved prior to rats sacrifice. Experimental Group 3, consisted of a group of adult rats alendronate treated after the third month of life until the seventh, when dental movement took place. Microscopic and statistical analysis revealed that animals submitted to alendronate therapy presented significantly reduced amounts of root resorption. There was no further influence of alendronate on bone structure during induced tooth movement. These results allow us to conclude that the use of bisphosphonates, alendronate, to be more specific, may increase the resistance to root resorption during induced tooth movement or even due to traumatism.

ANEXOS

Quadros utilizados para o registro dos escores da análise
microscópica

Forças Moderadas			Escores de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀	X																					0			
	E♀	X																					0			
	F♀	X																					0			
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	M			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀	X																					0			
	E♀	X																					0			
	F♀	X																					0			
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂	X																					0		
		B♂	X																					0		
		C♂	X																					0		
		D♂	X																					0		
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀	X																					0		
		B♀	X																					0		
		C♀	X																					0		
		D♀	X																					0		
		E♀	X																					0		
		F♀	X																					0		
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂	X																					0		
		B♂	X																					0		
		C♂	X																					0		
		D♂	X																					0		
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀	X																					0		
		B♀	X																					0		
		C♀	X																					0		
		D♀	X																					0		
		E♀	X																					0		
		F♀	X																					0		

QUADRO 1 – Registro dos escores da análise microscópica do Grupo **Controle Negativo (CA)**, 4♂ e 6♀ **sem movimentação** dentária induzida.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X																				1			
	B♀		X	X																			2			
	C♀		X	X																			2			
	D♀		X	X																			2			
	E♀		X	X																			2			
	F♀		X	X																			2			
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀				X																		3			
	C♀			X																			2			
	D♀			X	X																		3			
	E♀		X	X																			2			
	F♀			X	X																		3			

Forças Intensas																										
Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀					X			X														7			
	B♀					X			X														7			
	C♀					X			X														7			
	D♀						X		X														7			
	E♀				X				X														7			
	F♀					X					X												10			
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	M			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X																				1			
	B♀	X																					0			
	C♀		X																				1			
	D♀		X																				1			
	E♀		X	X																			2			
	F♀		X	X																			2			

QUADRO 2 - Registro dos escores da análise microscópica do Grupo Controle Positivo (CB), 6♀ com movimentação dentária induzida durante 3 dias.

Forças Moderadas			Escores de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂		X	X																			2			
	B♂		X	X																			2			
	C♂		X	X																			2			
	D♂		X	X																			2			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X	X																			2			
	B♀		X	X																			2			
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂		X	X																			2			
	B♂				X																		3			
	C♂		X	X																			2			
	D♂				X				X						X								13			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X																				1			
	B♀			X	X																		3			
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂					X				X							X						15		
		B♂							X	X						X								13		
		C♂							X		X							X						15		
		D♂					X						X											10		
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀				X				X										X				17		
		B♀						X		X						X								13		
		C♀																								
		D♀																								
		E♀																								
		F♀																								
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂		X	X																			2		
		B♂		X																				1		
		C♂		X																				1		
		D♂		X	X																			2		
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀				X				X														7		
		B♀		X	X																			2		
		C♀																								
		D♀																								
		E♀																								
		F♀																								

QUADRO 3 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Controle Positivo (CB)**, 4♂ e 2♀ com movimentação dentária induzida durante **5 dias**.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X																				1			
	B♀			X																			2			
	C♀		X																				1			
	D♀			X																			2			
	E♀		X	X																			2			
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X																				1			
	B♀		X	X											X								13			
	C♀				X				X						X								13			
	D♀		X	X																			2			
	E♀		X	X																			2			
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀					X			X									X					16		
		B♀				X				X										X				17		
	C♀					X			X						X								13			
	D♀				X				X											X			18			
	E♀						X		X										X				17			
	F♀																									
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
F♂																										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
A♀			X																				1			
B♀			X	X																			2			
C♀	X																					0				
D♀		X	X																			2				
E♀		X	X																			2				
F♀																										

QUADRO 4 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Controle Positivo (CB)**, 5♀ com movimentação dentária induzida durante **7 dias**.

			Escores de Fenômenos Teciduais e Celulares																									
			Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
Forças Moderadas			Terço cervical	A♂	X																				0			
				B♂	X																						0	
				C♂	X																							0
				D♂	X																							0
				E♂	X																							0
				F♂	X																							0
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
			Terço apical	A♀	X																							0
				B♀	X																							0
				C♀	X																							0
				D♀																								
				E♀																								
				F♀																								
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
Forças Intensas			Terço cervical	A♂	X																				0			
				B♂	X																						0	
				C♂		X																						1
				D♂	X																							0
				E♂	X																							0
				F♂	X																							0
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
			Terço apical	A♀	X																							0
				B♀	X																							0
				C♀	X																							0
				D♀																								
				E♀																								
				F♀																								
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
				A♂	X																							0
				B♂	X																							0
				C♂	X																							0
				D♂	X																							0
				E♂	X																							0
				F♂	X																							0
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
A♀	X																							0				
B♀	X																							0				
C♀	X																							0				
D♀																												
E♀																												
F♀																												

QUADRO 5 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Experimental A**, 6♂ e 3♀ sem movimentação dentária induzida.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂		X	X																			2			
	B♂		X	X																			2			
	C♂		X																				1			
	D♂		X	X																			2			
	E♂		X																				1			
	F♂		X	X																			2			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X	X																			2			
	B♀		X	X																			2			
	C♀		X																				1			
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂			X	X																		3			
	D♂	X																					0			
	E♂	X																					0			
	F♂	X																					0			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂					X			X														7		
		B♂						X		X														7		
		C♂					X																	4		
		D♂						X		X														7		
		E♂						X		X														7		
		F♂				X				X														7		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀					X																	4			
	B♀						X		X														7			
	C♀					X																	4			
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂	X		X																			2			
	F♂	X																					0			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									

QUADRO 6 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Experimental B**, 6♂ e 3♀ com movimentação dentária induzida durante **3 dias**.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂		X																				1			
	B♂		X	X																			2			
	C♂		X																				1			
	D♂	X																					0			
	E♂		X	X																			2			
	F♂		X																				1			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X	X																			2			
	B♀																									
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂			X																			2			
	C♂	X																					0			
	D♂		X																				1			
	E♂	X																					0			
	F♂			X																			2			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀																									
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂				X				X														7		
		B♂				X				X														7		
		C♂					X			X														7		
		D♂				X																		3		
		E♂				X				X														7		
		F♂				X				X														7		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀					X			X														7			
	B♀																									
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂			X																			2			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂	X																					0			
	F♂	X																					0			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀																									
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									

QUADRO 7 - Registro dos escores da análise microscópica do Grupo Experimental B, 6♂ e 1♀ com movimentação dentária induzida durante 5 dias.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂		X	X																			2			
	C♂		X																				1			
	D♂																									
	E♂																									
	F♂		X	X																			2			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X																				1			
	B♀		X	X																			2			
	C♀		X																				1			
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂			X																			2			
	C♂	X																					0			
	D♂																									
	E♂																									
	F♂		X	X																			2			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀				X				X														7			
	B♀	X																					0			
	C♀				X				X														7			
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂				X				X														7		
		C♂					X			X														7		
		D♂																								
		E♂																								
		F♂					X			X							X							14		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀					X			X														7		
		B♀					X			X														7		
	C♀					X			X														7			
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂	X																					0		
		C♂	X																					0		
		D♂																								
		E♂																								
		F♂	X																					0		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀	X																					0		
		B♀	X																					0		
C♀		X																					0			
D♀																										
E♀																										
F♀																										

QUADRO 8 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Experimental B**, 3♂ e 3♀ com movimentação dentária induzida durante **7 dias**.

Forças Moderadas			Escores de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂		X																				1			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂	X																					0		
		B♂	X																					0		
		C♂	X																					0		
		D♂	X																					0		
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀	X																					0		
		B♀	X																					0		
		C♀																								
		D♀																								
		E♀																								
		F♀																								
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂	X																					0		
		B♂	X																					0		
		C♂	X																					0		
		D♂	X																					0		
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀	X																					0		
		B♀	X																					0		
		C♀																								
		D♀																								
		E♀																								
		F♀																								

QUADRO 9 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Ensaio 1A**, 4♂ e 2♀ sem movimentação dentária induzida.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X	X																			2			
	B♀		X	X																			2			
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀				X																		3			
	B♀	X																					0			
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀				X					X													8		
		B♀				X																		3		
		C♀																								
		D♀																								
		E♀																								
		F♀																								
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
A♀	X																					0				
B♀	X																					0				
C♀																										
D♀																										
E♀																										
F♀																										

QUADRO 10 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Ensaio 1B**, 2♀ com movimentação dentária induzida durante **3 dias**.

			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																									
Forças Moderadas			Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
				A♂		X																						1
				B♂		X	X																					2
				C♂		X	X																					2
				D♂		X	X																					2
				E♂																								
				F♂																								
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
			A♀																									
			B♀																									
			C♀																									
			D♀																									
			E♀																									
			F♀																									
Forças Intensas	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T				
		A♂	X																						0			
		B♂	X																						0			
		C♂	X																						0			
		D♂				X	X																		3			
		E♂																										
		F♂																										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T					
	A♀																											
	B♀																											
	C♀																											
	D♀																											
	E♀																											
	F♀																											
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T				
		A♂				X				X															7			
		B♂				X				X															7			
		C♂		X	X																				2			
		D♂					X			X															7			
		E♂																										
		F♂																										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T					
	A♀																											
	B♀																											
	C♀																											
	D♀																											
	E♀																											
	F♀																											
Forças Intensas	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T				
		A♂	X																						0			
		B♂	X																						0			
		C♂	X																						0			
		D♂	X																						0			
		E♂																										
		F♂																										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T					
	A♀																											
	B♀																											
	C♀																											
	D♀																											
	E♀																											
	F♀																											

QUADRO 11 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Ensaio 1B**, 4♂ com movimentação dentária induzida durante **5 dias**.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X																				1			
	B♀		X																				1			
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
F♂																										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
A♀		X																					0			
B♀		X																					0			
C♀																										
D♀																										
E♀																										
F♀																										
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
		F♂																								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀					X			X														7		
		B♀				X				X							X							14		
		C♀																								
		D♀																								
	E♀																									
	F♀																									
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
F♂																										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
A♀	X																					0				
B♀	X																					0				
C♀																										
D♀																										
E♀																										
F♀																										

QUADRO 12 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Ensaio 1B**, 2♀ com movimentação dentária induzida durante **7 dias**.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂		X																				1			
	B♂	X																					0			
	C♂		X																				1			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀	X																					0			
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀	X																					0			
	E♀																									
	F♀																									
Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀	X																					0			
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂	X																					0			
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀	X																					0			
	D♀	X																					0			
	E♀																									
	F♀																									

QUADRO 13 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Ensaio 2A**, 4♂ e 4♀ **sem movimentação** dentária induzida.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀		X	X																			2			
	B♀		X	X																			2			
	C♀		X	X																			2			
	D♀		X	X																			2			
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂																									
	B♂																									
	C♂																									
	D♂																									
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀	X																					0			
	B♀	X																					0			
	C♀		X																				1			
	D♀	X																					0			
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂																								
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
		F♂																								
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀					X			X														7		
		B♀					X			X														7		
		C♀					X			X														7		
		D♀					X			X														7		
		E♀																								
		F♀																								

QUADRO 14 - Registro dos escores da análise microscópica do Grupo Ensaio 2B, 4♀ com movimentação dentária induzida durante 3 dias.

Forças Moderadas			Escores de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂		X	X																			2			
	B♂		X	X																			2			
	C♂																									
	D♂		X	X																			2			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀																									
	B♀																									
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂				X				X														7			
	B♂		X	X																			2			
	C♂																									
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀																									
	B♀																									
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂					X			X														7		
		B♂					X			X														7		
		C♂																								
		D♂					X			X														7		
		E♂																								
		F♂																								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀																									
	B♀																									
	C♀																									
	D♀																									
	E♀																									
	F♀																									
Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♂	X																					0			
	B♂	X																					0			
	C♂																									
	D♂	X																					0			
	E♂																									
	F♂																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T			
	A♀																									
	B♀																									
C♀																										
D♀																										
E♀																										
F♀																										

QUADRO 15 - Registro dos escores da análise microscópica do **Grupo Ensaio 2B**, 3♂ com movimentação dentária induzida durante **5 dias**.

Forças Moderadas			Escore de Fenômenos Teciduais e Celulares																							
Forças Moderadas	Terço cervical	Espécimes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂		X																					1	
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
		F♂																								
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀		X	X																				2	
		B♀		X	X																				2	
		C♀																								
		D♀																								
		E♀																								
		F♀																								
Forças Intensas	Terço cervical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♂	X																						0	
		B♂																								
		C♂																								
		D♂																								
		E♂																								
		F♂																								
	Terço apical		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	T		
		A♀	X																						0	
		B♀	X																						0	
		C♀																								
		D♀																								
		E♀																								
		F♀																								

QUADRO 16 - Registro dos escores da análise microscópica do Grupo Ensaio 2B, 1♂ e 2♀ com movimentação dentária induzida durante 7 dias.

Tabelas referentes às informações intermediárias das análises estatísticas, para a região de forças intensas

Grupo	Mediana	Soma de postos	Posto médio	N. de valores
Experimental	7.00000000	81.0000000	9.00000000	9
Ensaio 1	5.50000000	21.0000000	10.5000000	2
Ensaio 2	7.00000000	48.0000000	12.0000000	4
Controle	7.00000000	81.0000000	13.5000000	6

Probabilidade = 0.362277

Tabela 1 – Resultados estatísticos do teste não paramétrico de Kruskal Wallis e de Quiquadrado com três graus de liberdade, para a região de **forças intensas**, quando da movimentação dentária durante **3 dias**.

Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação
Experimental X Ensaio 1	5000000	12.7969588	Não signific.
Experimental X Ensaio 2	-3.0000000	9.83710051	Não signific.
Experimental X Controle	-4.5000000	8.62770789	Não signific.
Ensaio 1 X Ensaio 2	-1.5000000	14.1767707	Não signific.
Ensaio 1 X Controle	-3.0000000	13.3659875	Não signific.
Ensaio 2 X Controle	-1.5000000	10.5667409	Não signific.

Tabela 2 – Resultados estatísticos do teste de Dunn para comparações individuais ao nível de significância de **0.05**, para a região de **forças intensas**, quando da movimentação dentária durante **3 dias**.

Grupo	Mediana	Soma de postos	Posto médio	N. de valores
Experimental	7.00000000	53.0000000	7.57142857	7
Ensaio 1	7.00000000	26.5000000	6.62500000	4
Ensaio 2	7.00000000	25.5000000	8.50000000	3
Controle	14.0000000	105.000000	17.5000000	6

Probabilidade = 0.001409

Tabela 3 – Resultados estatísticos do teste não paramétrico de Kruskal Wallis e de Quiquadrado com três graus de liberdade, para a região de **forças intensas**, quando da movimentação dentária durante **5 dias**.

Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação
Experimental X Ensaio 1	0.94642857	8.87700943	Não signific.
Experimental X Ensaio 2	-0.9285714	9.77326573	Não signific.
Experimental X Controle	-9.9285714	7.87945873	Significante
Ensaio 1 X Ensaio 2	-1.8750000	10.8170229	Não signific.
Ensaio 1 X Controle	-10.875000	9.14205297	Significante
Ensaio 2 X Controle	-9.0000000	10.0146172	Não signific.

Tabela 4 – Resultados estatísticos do teste de Dunn para comparações individuais ao nível de significância de **0.10**, para a região de **forças intensas**, quando da movimentação dentária durante **5 dias**.

Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação
Experimental X Ensaio 1	0.94642857	9.78290120	Não signific.
Experimental X Ensaio 2	-0.9285714	10.7706197	Não signific.
Experimental X Controle	-9.9285714	8.68355124	Significante
Ensaio 1 X Ensaio 2	-1.8750000	11.9208915	Não signific.
Ensaio 1 X Controle	-10.875000	10.0749922	Significante
Ensaio 2 X Controle	-9.0000000	11.0366010	Não signific.

Tabela 5 – Resultados estatísticos do teste de Dunn para comparações individuais ao nível de significância de **0.05**, para a região de **forças intensas**, quando da movimentação dentária durante **5 dias**.

Grupo	Mediana	Soma de postos	Posto médio	N. de valores
Experimental	7.00000000	34.0000000	5.66666667	6
Ensaio 1	10.5000000	16.0000000	8.00000000	2
Ensaio 2	7.00000000	18.5000000	6.16666667	3
Controle	17.0000000	67.5000000	13.5000000	5
Probabilidade = 0.022167				

Tabela 6 – Resultados estatísticos do teste não paramétrico de Kruskal Wallis e de Quiquadrado com três graus de liberdade, para a região de **forças intensas**, quando da movimentação dentária durante **7 dias**.

Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação
Experimental X Ensaio 1	-2.3333333	10.2556813	Não signific.
Experimental X Ensaio 2	-0.5000000	8.88168057	Não signific.
Experimental X Controle	-7.8333333	7.60581684	Significante
Ensaio 1 X Ensaio 2	1.83333333	11.4662003	Não signific.
Ensaio 1 X Controle	-5.5000000	10.5089461	Não signific.
Ensaio 2 X Controle	-7.3333333	9.17296024	Não signific.

Tabela 7 – Resultados estatísticos do teste de Dunn para comparações individuais ao nível de significância de **0.05**, para a região de **forças intensas**, quando da movimentação dentária durante **7 dias**.

Grupo	Mediana	Soma de postos	Posto médio	N. de valores
Experimental	7.00000000	358.000000	19.8888888	18
Ensaio 1	7.00000000	173.000000	21.6250000	8
Ensaio 2	7.00000000	236.000000	23.6000000	10
Controle	13.0000000	664.000000	39.0588235	17

Probabilidade = 0.000164

Tabela 8 – Resultados estatísticos do teste não paramétrico de Kruskal Wallis e de Quiquadrado com três graus de liberdade, para a região de **forças intensas**, quando da comparação dos **quatro grupos** entre si, independentemente do dia de observação da movimentação dentária induzida.

Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação
Experimental X Ensaio 1	-1.7361111	15.7095936	Não signific.
Experimental X Ensaio 2	-3.7111111	14.5815028	Não signific.
Experimental X Controle	-19.169934	12.5035355	Significante
Ensaio 1 X Ensaio 2	-1.9750000	17.5368175	Não signific.
Ensaio 1 X Controle	-17.433823	15.8511243	Significante
Ensaio 2 X Controle	-15.458823	14.7338737	Significante

Tabela 9 – Resultados estatísticos do teste de Dunn para comparações individuais ao nível de significância de **0.10**, para a região de **forças intensas**, quando da comparação dos **quatro grupos** entre si, independentemente do dia de observação da movimentação dentária induzida.

Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação
Experimental X Ensaio 1	-1.7361111	17.3127452	Não signific.
Experimental X Ensaio 2	-3.7111111	16.0695336	Não signific.
Experimental X Controle	-19.169934	13.7795114	Significante
Ensaio 1 X Ensaio 2	-1.9750000	19.3264358	Não signific.
Ensaio 1 X Controle	-17.433823	17.4687190	Não signific.
Ensaio 2 X Controle	-15.458823	16.2374539	Não signific.

Tabela 10– Resultados estatísticos do teste de Dunn para comparações individuais ao nível de significância de **0.05**, para a região de **forças intensas**, quando da comparação dos **quatro grupos** entre si, independentemente do dia de observação da movimentação dentária induzida.