**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

EDSON VIRGILIO ZEN FILHO

**Análise molecular e microscópica do reparo ósseo de alvéolos dentários
após exodontia em um modelo de osteonecrose dos maxilares induzida pelo
ácido zoledrônico em ratos *Wistar***

**BAURU
2014**

EDSON VIRGILIO ZEN FILHO

**Análise molecular e microscópica do reparo ósseo de alvéolos dentários
após exodontia em um modelo de osteonecrose dos maxilares induzida pelo
ácido zoledrônico em ratos *Wistar***

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Versão corrigida

**BAURU
2014**

Z43a

Zen Filho, Edson Virgílio

Análise molecular e microscópica do reparo ósseo de alvéolos dentários após exodontia em um modelo de osteonecrose dos maxilares induzida pelo ácido zoledrônico em ratos *Wistar* / Edson Virgílio Zen Filho. – Bauru, 2014.

103 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 019/2011
Data: 22 de Agosto de 2011

DEDICATÓRIA

A **Deus** por ter me ajudado a chegar até aqui.

À minha **família** pelo apoio e paciência nos momentos difíceis.

À minha esposa **Michelly** por sua dedicação, amor e compreensão em todos os momentos dessa jornada.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos** e a todos que contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me dado a vida e por ter me ajudado em todos os momentos que precisei, sem Ele não teria chegado até aqui.

Agradeço aos meus pais, **Francine e Edson**, pelo suporte dado durante toda a minha trajetória não medindo esforços em me ajudar para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. E também por me aturarem até nos momentos de estresse e mau humor, e compreenderem quando me ausentei. Sem vocês hoje eu não seria nada, obrigado!

Às minhas irmãs **Carla e Flávia**, que mesmo longe sei que sempre estiveram torcendo por mim e sempre que precisei me ajudaram sem pensar Eu sei que posso contar sempre que precisar.

À minha esposa **Michelly** que desde 2008 tem feito minha vida mais feliz e mais fácil. Desde 2008 tem me aturado nas fases mais difíceis da vida. Graças a você consegui terminar mais esta etapa na minha vida, já que você literalmente me ajudou a terminar o projeto. Agradeço pela companhia e companheirismo em todos os finais de semana, noites e feriados, indo na faculdade para conseguir terminar a tempo. E também, apesar da correria, conseguia resolver minha vida quando eu estava longe. Você é uma pessoa muito especial que eu agradeço todos os dias por ter encontrado. Você consegue fazer com que todos os dias sejam felizes e que os problemas não atrapalhem nossas vidas. Espero poder te fazer feliz pelo resto de nossas vidas, e prometo que vou começar a te dar menos trabalho. Te amo muito e pra sempre vou te amar.

A **Faculdade de Odontologia de Bauru** que me acolheu durante toda minha formação me dando subsídios para que hoje eu pudesse estar aqui.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos** que acreditou em mim e com muita dedicação e paciência me ajudou em tudo que precisei, com o senhor aprendi muito e só tenho a agradecer a oportunidade que tive de compartilhar esses anos com o senhores, obrigado!

Aos professores da Estomatologia: **Profa. Dra. Ana Lúcia Capellozza, Profa. Dra. Izabel Rubira, Prof. Dr. Damante, Prof. Dr. Chinelatto**, meu muito obrigado por fazerem parte da minha formação, por me ensinarem não só conhecimentos científicos, mas de vida também, com certeza levarei cada um de vocês no coração.

Aos professores da Cirurgia Oral: **Prof. Dr. Eduardo Sant'ana, Prof. Dr. Eduardo Sanches, Prof. Dr. Paulo Perri, Prof. Dr. Osny e Prof. Dr. Renato Yaedú**, meu muito obrigado pelos anos de ensinamento na graduação, estágio e mestrado, sem vocês como base minha jornada na cirurgia teria sido mais difícil. Obrigado por toda a ajuda.

Ao Departamento de Histologia e aos professores: **Prof. Dr. Gustavo Garlet, Prof. Dr. Gérson, Prof. Dr. Rumio e Profa. Dra. Carolina** que me acolheram com muito carinho me dando todo suporte e apoio necessário para que realizasse a pesquisa. Sem vocês a conclusão desse trabalho não teria sido possível, obrigado!

Ao **Departamento de Farmacologia** e aos professores **Dr. Flávio** e em especial ao **Prof. Dr. Carlos**, que sem hesitar me disponibilizaram todo o material e equipamento que precisei e sempre me ajudaram no que foi possível, obrigado!

Aos professores de **Anatomia: Prof. Dr. Antonio (Tom) e Prof. Dr. Jesus** que me orientaram quando tive dúvidas e sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao **Departamento de Bioquímica** e em especial aos **professores Dr. Rodrigo e Dra. Marília Buzalaf**, que foram solícitos e nos cederam o que foi preciso para que esse trabalho fosse realizado, meu muito obrigado!

Aos **funcionários do Biotério, Erasmo e Luís**, por toda sua ajuda e dedicação com o cuidado com nossos ratos, sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Aos **funcionários da Estomatologia: Andréa, Roberto, Alexandre, Luciana, Marília e Fernanda** meu muito obrigado por todos esses anos de dedicação aos alunos, sem vocês nós estaríamos perdidos. Obrigado!

As **funcionárias da Histologia: Patrícia, Danielle, Teresa e Tânia** que me acolheram e me ajudaram muito! Obrigado pelos bons momentos no laboratório (bolos e comidas), pela dedicação e pela ajuda.

Aos **funcionários da Farmacologia, Thiago e Viviane** que muito me ajudaram, em especial ao Thiago que sempre esteve disposto a me ensinar, sem você os experimentos não teriam saído!

As **funcionárias da Bioquímica, Aline e Thelma**, pela disposição em ajudar.

Aos meus amigos do Mestrado: **José Endrigo, Daniel, Vitor Hugo, Danilo, Laura, Maíra, Carla, Maria Fernanda, Ingrid, Annie, Victor Tieghi, Andréia, Leandro**; do Doutorado: **Otávio, Bruna, Marcelo (Bona), Lyzete, Thaís Imada, Thaís Feitosa, Luciana, Alexandre**, meu muito obrigado por todos esses anos de companheirismo, risadas, discussões, aprendizado, enfim por todos bons momentos passados juntos, com certeza com vocês esses anos se tornaram mais leves, espero levar a amizade de vocês para a vida, meu muito obrigado!

Em especial meu muito obrigado ao meu querido amigo **Gustavo Zanna**, amigo de longa data já, companheiro de cirurgia, obrigado por toda ajuda nesses últimos meses, pela amizade desde os tempos de residência em Maringá, pelas boas risadas e bons momentos passados juntos, com você aqui em Bauru o mestrado se tornou mais leve, obrigado mais uma vez por tudo e espero um dia poder retribuir.

Meu muito obrigado também ao meu amigo **Carlos Eduardo Repeke** que sem ele essa pesquisa não teria chegado ao fim, obrigado por toda sua ajuda, sua disposição em sempre me ajudar com tudo, pela competência e dedicação em tudo que faz, obrigado!

Aos meus amigos e companheiros da época do estágio e que se fazem presentes na minha vida até hoje, **Camila Lopes, Gabriel Bernini, Elen Tolentino e Manuela Rodriguez**, meu muito obrigado por todos os momentos vividos juntos, pela amizade e por todo suporte dado sempre que precisei.

A **CAPES** pelo auxílio recebido com a bolsa de Mestrado, obrigado.

À **FAPESP** pelo apoio á pesquisa e auxilio pecuniário sem o qual esse trabalho não teria sido realizado.

RESUMO

O reparo ósseo de alvéolos após exodontia dos molares superiores em um modelo animal em ratos Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*) de osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos foi avaliado através de análise microscópica e molecular. Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar) machos, com 12 semanas de vida e peso aproximado de 300 gramas, que foram divididos em 4 grupos. Cada grupo era composto por 12 animais, sendo 2 grupos experimentais AZ e AZ-Cirúrgico (AZ-C), que foram submetidos a administração de ácido zoledrônico, 0,6 mg/kg a cada 28 dias com um total de 5 doses e 2 grupos controles CO e CO-Cirúrgico (CO-C) com administração de cloreto de sódio 0,9% no mesmo volume e frequência do ácido zoledrônico. Todas as soluções foram administradas por via intraperitoneal. O grupo AZ-C e o grupo CO-C foram submetidos a exodontia do primeiro, segundo e terceiro molares superiores 45 dias após a primeira aplicação das soluções. Todos os animais foram eutanasiados após 150 dias do início do experimento (105 dias após as exodontias). As maxilas dos animais foram avaliadas macroscopicamente para presença de lesões espontâneas e com uma sonda clínica número 5 as regiões das exodontias dos molares foram avaliadas para presença ou ausência de solução continua do epitélio. Após feita a avaliação macroscópica as regiões das exodontias dos molares superior esquerdo e do lado contralateral de cada animal foram submetidas a análises qualitativa e quantitativa para presença de sequestros ósseos, restos radiculares, área de osteonecrose, área de espaço trabecular, área de reação periosteal, através de estudos por microscopia óptica pela coloração Hematoxilina e Eosina. Análise quantitativa da expressão do RNAm de proteínas envolvidas no processo de reparo ósseo RANK, RANKL, OPG e VEGF, pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*RealTimePCR*) também foi realizada. A avaliação macroscópica mostrou que 91,66% dos animais do grupo AZ-C e 41,66% do grupo CO-C apresentaram solução de continuidade do epitélio, sendo estatisticamente significante maior no grupo em terapia com ácido zoledrônico pelo teste exato de Fischer ($p<0,05$). Todos animais do grupo AZ-C e nenhum do grupo CO-C apresentaram sequestros ósseos e todos os animais apresentaram presença de restos radiculares na análise microscópica. A área de osteonecrose foi maior nos animais do grupo AZ-C do que no grupo CO-C ($p<0,005$), não havendo diferença estatística entre as áreas de espaço trabecular, reação periosteal e osso total. Na análise molecular de RANK, RANKL, OPG e VEGF não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos CO, AZ, CO-C e AZ-C, mesmo quando comparadas áreas de exodontia com áreas com dentes. Estes resultados levam a conclusão que o modelo animal utilizado no presente estudo é um modelo seguro, que o ácido zoledrônico interferiu no reparo ósseo dos alvéolos, causando um atraso na remodelação óssea da região e uma maior incidência de osteonecrose e sequestros ósseos. O ácido zoledrônico não afetou a expressão de RANK, RANKL, OPG e VEGF 105 dias após as exodontias.

Palavras-chave: Osteonecrose. Bifosfonatos. Remodelação óssea. Mandíbula.

ABSTRACT

Molecular and microscopic analysis of bone repair of dental sockets after tooth extraction in a model of osteonecrosis of the jaws induced by zoledronic acid in rats

The alveolar bone repair following extraction of maxillary molars in an animal model of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws in Wistar rats (*Rattus norvegicus*, *Albinus*) was assessed through microscopic and molecular analysis. A total of 48 rats (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, Wistar rats) with 12 weeks old and weighing approximately 300 grams were used, they were divided into 4 groups. Each group consisted of 12 animals, with 2 experimental groups AZ and AZ-Cirúrgico (AZ-C), who underwent the administration of zoledronic acid, 0.6 mg / kg every 28 days with a total of 5 doses. And 2 control groups CO and CO-Cirúrgico (CO-C) with administration of sodium chloride at 0.9% in the same volume and frequency of zoledronic acid. All solutions were administered intraperitoneally. The group AZ-C and CO-C underwent to extraction of the first, second and third molars 45 days after the first application of the solutions. All animals were sacrificed after 150 days from the beginning of the experiment (105 days after extractions). The maxilla of the animals were assessed macroscopically for the presence of spontaneous lesions, and with a clinical probe number five the regions of the molar extractions were evaluated for the presence or absence of loss of continuity of the oral epithelium. After macroscopic evaluation, the upper left molar and contralateral side of the extraction regions of each animal were submitted to qualitative and quantitative analyzes for the presence of bone sequestrum, root fragments, osteonecrosis area, trabecular space area, area of periosteal reaction, through optical microscopic studies by hematoxylin and eosin staining. And quantitative analysis of mRNA expression of proteins involved in bone repair (RANK, RANKL, OPG and VEGF), by the method of RealTimePCR were carried out. Macroscopic evaluation showed that 91.66% of the AZ -C group and 41.66% of the CO-C group presented a loss of continuity of the epithelium, which was statistically significant higher in the zoledronic acid group according to the Fisher test ($p < 0.05$). All animals in group AZ-C and none in CO-C group showed bone sequestrum and all animals in both groups had root fragments in microscopic analysis. The area of osteonecrosis was higher in the animals of AZ-C group than in CO-C ($p < 0.005$), with no statistical difference between the areas of trabecular space, periosteal reaction and total bone. In the molecular analysis of RANK, RANKL, OPG e VEGF there was no statistically significant difference between the CO, AZ, CO-C e AZ-C groups, even when extraction regions were compared to non extractions areas. These results lead to the conclusion that the animal model described used in this study is a reliable model and zoledronic acid interferes with alveolar bone repair causing a delay in bone remodeling and a higher incidence of osteonecrosis and bone sequestrum. Zoledronic acid did not affect the expression of RANK, RANKL, OPG and VEGF 105 days after dental extractions.

Keywords: Osteonecrosis. Bisphosphonate. Bone remodeling. Jaws.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Formula química do pirofosfato e modelo de formula dos bisfosfonatos mostrando as cadeias R1 e R2 ligadas ao átomo de carbono (C) central.....	22
Figura 1.2 -	Formulações dos BFs não nitrogenados e N-BFs estudados e disponíveis atualmente	23
Figura 3.1 -	Distribuição dos animais por grupo e por experimento realizado.....	42
Figura 3.2 -	Esquema de aplicações, procedimento cirúrgico e eutanásia em função do tempo	43
Figura 3.3 -	Anestesia dos animais. Medicamentos utilizados na anestesia geral e forma de aplicação	44
Figura 3.4 -	A: Posicionamento do animal para exodontia dos molares superiores, B: Maxila mostrando a região das exodontias não havendo necessidade de sutura. C: molares superiores extraídos com raízes intactas	44
Figura 3.5 -	A: avaliação macroscópica da solução de continuidade (SOC) do epitélio da mucosa oral na região das exodontias dos molares com a sonda clínica numero 5. B: área de solução de continuidade (SOC) da mucosa oral com exposição óssea (EO) na região das exodontias ...	45
Figura 3.6 -	A, B e C: Coleta da maxila com disco diamantado seccionando a maxila na mesial do 1º molar e nos pilares zigomático-maxilar direito e esquerdo. D e E: linhas de osteotomia na mesial do 1º molar e nos pilares zigomático-maxilar direito e esquerdo. Também foi realizada a osteotomia na distal do 3º molar	46
Figura 3.7 -	Maxila coletada com sutura com seda 4.0 na região anterior para fazer a inclusão.....	47
Figura 3.8 -	Esquema de divisão das maxilas para realização dos experimentos por <i>RealTimePCR</i>	47

Figura 3.9 -	Distribuição de denominação dos grupos para o estudo de <i>RealTimePCR</i>	47
Figura 3.10 -	Cortes histológicos mostrando a realização da análise microscópica quantitativa através do ROI e a demarcação nas Figuras B e C das áreas a serem medidas. Em cor amarela está delimitada a área de reação periosteal, preto no menor aumento está demarcado o tecido ósseo e azul as áreas de espaço trabecular. Figura C: mostra a demarcação em maior aumento das áreas de osteonecrose e sequestro ósseo.....	50
Figura 3.11 -	Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa	53
Figura 4.1 -	Gráfico mostrando a incidência de presença/ausência de solução de continuidade da mucosa oral entre os grupos CO-C e AZ-C nas regiões das exodontias dos molares superiores.....	59
Figura 4.2 -	Maxilas coletadas de ratos mostrando o alvéolo reparado (AR) do rato do grupo CO-C (A) sem solução de continuidade e a solução de continuidade da mucosa oral do rato do grupo AZ-C (B) com área de exposição óssea (EO) nas regiões das exodontias dos molares	60
Figura 4.3 -	Imagens dos cortes histológicos da região dos alvéolos de áreas de exodontias de 1º molar de ratos do grupo CO-C mostrando a remodelação óssea com reabsorção das cristas alveolares e dos septos interradiculares com perda óssea em altura do rebordo alveolar. Também pode ser observado restos radiculares (RR) nas Figuras A, C e D , tecido ósseo (TO) no interior dos alvéolos e áreas de infiltrado inflamatório (IF), principalmente circundando as regiões dos restos radiculares (RR). Na Figura D pode ser visto restos radiculares (RR) com solução de continuidade (SOC) do epitélio da cavidade oral. Todas as figuras mostram a cortitcal óssea vestibular (*) dos rebordos alveolares com reação periosteal (RP). H.E., 4x	62

-
-
- Figura 4.4 -** Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial (**A**) e central (**B**) da região da exodontia do **1º molar** do mesmo animal do grupo **AZ-C** mostrando cobertura do alvéolo pelo epitélio mucosa oral, presença de resto radicular (**RR**), remodelação das cristas óssea com menor perda de altura do rebordo alveolar comparado a do grupo CO-C. O interior do alvéolo apresenta formação de tecido ósseo (**TO**), e na **Figura B** pode ser observada um maior infiltrado inflamatório entre o epitélio oral e o alvéolo, próximo a região do resto radicular (**RR**). A cortical óssea vestibular (*) nestes cortes está mais difícil de ser diferenciada, também havendo a formação de reação periosteal (**RP**). H.E., 4x **62**
- Figura 4.5 -** Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial (**A**), central (**B**) e distal (**C**) da região da exodontia do **1º molar** do mesmo animal do grupo **AZ-C** mostrando um reparo ósseo do alvéolo não homogêneo, com presença de áreas de osteonecrose (**ON**), sequestros ósseos (**SO**), restos radiculares (**RR**) com infiltrado inflamatório (**IF**) permeando o alvéolo e circundando os restos radiculares. **Figura C** mostra solução de continuidade (**SOC**) do epitélio oral com sequestro ósseo (**SO**) abaixo desta região. **Figura D** mostra restos radiculares (**RR**) com solução de continuidade (**SOC**) do epitélio oral sobre esses e presença de sequestro ósseo (**SO**) formado pelo septo interradicular (**SR**). Todas as figuras mostram a cortical óssea (*) com reação periosteal (**RP**) de aparente menor intensidade quando comparado ao grupo CO-C. HE., 4x **63**
- Figura 4.6 -** Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial (**A**) e distal (**B**) das regiões da exodontia do **2º molar** dos ratos do grupo **CO-C** mostrando alvéolos cobertos por epitélio da mucosa oral, apresentam remodelação do alvéolo com reabsorção das cristas alveolares e dos septos interradiculares com perda de altura óssea do rebordo alveolar. **Figura A:** mostra cortical óssea vestibular (*) com reação periosteal (**RP**) e resto radicular (**RR**) na região próximo ao epitélio oral circundado por infiltrado inflamatório. **Figura B:** mostra reparo ósseo do alvéolo com perda óssea em altura do rebordo alveolar e discreta reação periosteal (**RP**) na cortical óssea (*) vestibular. H.E., 4x **63**

Figura 4.7 - Imagens dos cortes histológicos das regiões da exodontia do **2º molar** de ratos do grupo **AZ-C**. **Figura A:** mostra epitélio da mucosa oral integro e recobrindo todo o alvéolo que apresenta reparo com tecido ósseo (TO) no seu interior e restos radiculares (RR) com discreto infiltrado inflamatório (IF) ao redor. Pode ser observado a manutenção da altura do rebordo alveolar e cortical óssea (*) não apresentando reação periosteal (RP). **Figura B:** mostra resto radicular (RR) com infiltrado inflamatório ao redor com solução de continuidade (SOC) do epitélio oral sobre estes. No interior o alvéolo pode ser visto reparo da região com pouca formação de tecido ósseo (TO), com formação de áreas de osteonecrose (ON) e de sequestro ósseo (SO). **Figura C e D:** mostram uma deficiência no reparo alveolar com áreas de osteonecrose (ON), sequestro ósseo (SO) e infiltrado inflamatório (IF), havendo a presença de solução de continuidade (SOC) no epitélio da mucosa oral nas regiões. Cortical óssea (*) vestibular com discreta reação periosteal (RP). H.E., 4x.

64

Figura 4.8 - Imagens dos cortes histológicos das regiões dos alvéolos da exodontia do **3º molar** de ratos do grupo **CO-C (A e B) e AZ-C (C e D)**. **Figura A:** mostra epitélio da mucosa oral integro e recobrindo todo o alvéolo que apresenta reparo com tecido ósseo (TO) com perda de altura do rebordo alveolar, com cortical óssea vestibular (*) apresentando reação periosteal (RP). **Figura B:** alvéolo com reparo ósseo alterado com presença de resto radicular (RR) circundado por infiltrado inflamatório e presença de solução de continuidade (SOC) do epitélio da mucosa oral. Cortical óssea vestibular (*) não apresentando reação periosteal (RP). **Figura C:** apresenta alvéolo com reparo por tecido ósseo (TO) com menor perda da altura do rebordo alveolar em comparação com grupo CO-C. Apresenta cortical óssea vestibular (*) sem reação periosteal (RP). **Figura D:** região com reparo ósseo alveolar alterado, apresentando restos radiculares (RR) circundados por infiltrado inflamatório (IF). Também apresenta áreas de sequestro ósseo (SO) e osteonecrose (ON). Cortical óssea vestibular (*) reação periosteal (RP) discreta. H.E., 4x

65

Figura 4.9 -	Gráficos mostrando as áreas de osteonecrose (A) , espaço trabecular (B) , reação periosteal (C) e osso total (D) das regiões dos 1º, 2º, 3º molares e área total (soma das áreas do 1º, 2º, 3º molares). Os resultados apresentados representam as médias ± DP por grupo e área de cada dente. (*) indica o nível 3.0×10^6 na escala dos gráficos osso total, para que possa ser feita a comparação com os gráficos das outras variáveis estudadas	68
Figura 4.10 -	Expressão de marcadores ósseos e vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras dos maxilares dos animais dos grupos CO lado esquerdo e direito, AZ lado esquerdo e direito, CO-C tanto do lado esquerdo sem exodontia (CO-C dente) quanto do lado direito, das exodontias (CO-C exo), e do grupo AZ-C tanto do lado esquerdo sem exodontia (AZ-C dente) quanto do lado direito, das exodontias (AZ-C exo), foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de OPG, RANK, RANKL e VEGF foram analisados através de <i>RealTimePCR</i> . Os resultados apresentados representam os valores médios ± DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da β -actina obtidos de 6 animais de cada grupo	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Lista de BFs disponíveis com a estrutura das cadeias R1 e R2 e potencias relativas em comparação ao etidronato.....	24
Tabela 4.1 -	Distribuição da presença/ausência de solução de continuidade da mucosa oral no lado das exodontias nos grupos CO-C e AZ-C ao exame macroscópico	60
Tabela 4.2 -	Frequência da presença/ausência de sequestro ósseo e restos radiculares na região dos alvéolos nas áreas das exodontias dos molares superiores nos grupos CO-C e AZ-C	66
Tabela 4.3 -	Média, DP e mediana das áreas em μm^2 de osteonecrose nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$	67
Tabela 4.4 -	Média, DP e mediana das áreas em μm^2 do espaço trabecular nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$	67
Tabela 4.5 -	Média, DP e mediana das áreas em μm^2 da reação periosteal nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$	67
Tabela 4.6 -	Média, DP e mediana das áreas em μm^2 do osso total nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$	68
Tabela 4.7 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de OPG nos vários grupos	69

Tabela 4.8 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de OPG nos vários grupos	69
Tabela 4.9 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Tukey para OPG.....	69
Tabela 4.10 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Tukey para OPG	70
Tabela 4.11 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANK nos vários grupos	70
Tabela 4.12 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANK nos vários grupos	70
Tabela 4.13 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Tukey para RANK	70
Tabela 4.14 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Tukey para RANK	71
Tabela 4.15 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANKL nos vários grupos	71
Tabela 4.16 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANKL nos vários grupos	71
Tabela 4.17 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Dunn para RANKL	71
Tabela 4.18 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Dunn para RANKL	72
Tabela 4.19 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de VEGF nos vários grupos	72
Tabela 4.20 -	Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de VEGF nos vários grupos	72
Tabela 4.21 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Tukey para VEGF EGF.....	72
Tabela 4.22 -	Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Tukey para VEGF	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	<i>Registered sign</i>
µg	Micrograma
µl	Microlitro
AAOM	Academia Americana de Medicina Oral (American Academy de Oral Medicine)
AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons)
ANOVA	teste de Análise de variância
ANT	Adenina Nucleotídeo Translocase
Apaf-1	Fator de ativação de apoptose-1
AppCp	Análogos não hidrolisáveis metilenizados do ATP
AR	Alvéolo Reparado
ASBMR	Sociedade Americana para Pesquisa Óssea e Mineral (American Society of Bone and Mineral Research)
ATP	Adenosina Trifosfato
AZ	Ácido Zoledrônico
AZ-C	Grupo Ácido Zoledrônico Cirúrgico
BFs	Bisfosfonatos
BMP	Proteínas Morfogenéticas Ósseas (Bone morphogenetic proteins)
C	Carbono
CO	Grupo Controle
CO-C	Grupo Controle Cirúrgico
CT	Ciclo Limiar (<i>cicle threshold</i>)
DP	Desvio Padrão
E.V.	Via Endovenosa
EO	Exposição Óssea
FDA	Agência Americana de Regulação de Alimentos e Drogas (Food and Drug Administration)
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FPP	Farnesil Difosfato Sintetase

GGPP	Geranylgeranyl difosfato
H.E.	Hematoxilina de Harris e eosina de Lison
HAP	Hidroxiapatita
IF	Infiltrado Inflamatório
IPP	Isopentenil difosfato
KS	Kolmogorov-Smirnov
KW	Kruskal-Wallis
M-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos
N-BFs	Bisfosfonatos nitrogenados
O	Oxigênio
OBs	Osteoblastos
OCs	Osteoclastos
OMAB	Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de BFs
ON	Osteonecrose
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PIs	Pirofostatos Inorgânicos
R1	Cadeia Lateral R1
R2	Cadeia Lateral R2
RANK	Receptor ativador do NF- κ B (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>)
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF- κ B (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
RAS	Rat Sarcoma Virus
RHO	Ras homolog gene Family, member A
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	Region of Interest
RP	Reação periosteal
RR	Resto radicular
S-BFs	Bisfosfonatos simples ou não nitrogenados
SO	Sequestro ósseo
SOC	Solução de Continuidade
SR	Septo Inter-radicular
TNT	Tecido não Tecido
TO	Tecido Ósseo

USP	Universidade de São Paulo
V.O.	Via Oral
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (Vascular endothelial growth fator)
VN	Feixe Vasculo-Nervoso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	19
2	PROPOSIÇÃO.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	ANIMAIS	41
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
3.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	43
3.4	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	45
3.5	COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	46
3.6	PREPARO PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA	48
3.6.1	Análise das lâminas	49
3.7	PREPARO PARA ANÁLISE MOLECULAR.....	50
3.7.1	Extração do RNA (<i>RNeasy mini kit 250</i>).....	50
3.7.2	Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total.....	52
3.7.3	Transcrição reversa do RNA em Cdna.....	52
3.7.4	Reações em cadeia da polimerase em tempo real (<i>RealTimePCR</i>).....	53
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4	RESULTADOS	57
4.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	59
4.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA.....	60
4.2.1	Imagens dos alvéolos dos 1º molares.....	62
4.2.2	Imagens dos alvéolos dos 2º molares.....	63
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA	65
4.4	ANÁLISE MOLECULAR	69
4.4.1	Variável Osteoprotegerina (OPG).....	69
4.4.2	Variável receptor ativador do NF-κB (RANK)	70
4.4.3	Variável ligante do receptor ativador do NF-κB (RANKL)	71
4.4.4	Variável fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	72
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO	101

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os bisfosfonatos (BFs), antigamente chamados de difosfonatos, são um grupo de substâncias sintéticas primeiramente sintetizadas na Alemanha em 1865 (MENSCHUTKIN, 1865), sendo inicialmente utilizados nas indústrias de fertilizantes, óleo e têxtil como inibidor de corrosão e para impedir a formação de cristalizações na água, pois inibem a precipitação de carbonato de cálcio (RUSSELL; ROGERS, 1999; FLEISCH, 2000; BARTL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

Apesar de os BFs existirem desde 1865, somente na década de 60 que seu uso foi voltado para o campo da medicina com as primeiras publicações de Fleisch e colaboradores. Inicialmente publicados como resumos em 1968 e posteriormente como 2 artigos completos sobre etidronato e clodronato em 1969 (FLEISCH et al., 1968; FLEISCH; RUSSELL; FRANCIS, 1969; FRANCIS; RUSSELL; FLEISCH, 1969; RUSSELL, 2011).

O início foi dado após os estudos de Fleisch e Neuman (1961) que mostraram que os pirofosfatos inorgânicos (PIs), que são substâncias encontradas na urina e no plasma sanguíneo, inibiam a formação e dissolução de fosfato de cálcio *in vitro* (FLEISCH; NEUMAN, 1961; FLEISCH; BISAZ, 1962a, 1962b, 1964; RUSSELL; ROGERS, 1999; FLEISCH, 2002). Também demonstraram que os PIs inibiam calcificações ectópicas *in vivo*, porém não tinham influência sobre a mineralização e reabsorção ósseas, por serem degradados pelas fosfatases locais (FLEISCH; MAERKI; RUSSELL, 1966; FLEISCH; RUSSELL; STRAUMANN, 1966; SCHENK et al., 1973; FLEISCH, 1981). Estes estudos mostraram que os PIs são reguladores endógenos da mineralização óssea (RUSSELL; ROGERS, 1999; WIDLER et al., 2002).

O fato de os PIs não possuírem ação sobre a reabsorção óssea e de serem rapidamente hidrolisados quando administrados por via oral (V.O.), impedindo o seu uso por via oral, fez com que os estudos fossem voltados para substâncias análogas aos PIs, e que apresentassem características semelhantes, mas que não fossem rapidamente hidrolisados (FLEISCH, 1981; FLEISCH, 2000; FLEISCH, 2002; BARTL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

Fleisch em 1966, quando foi convidado pelo Dr. Marion Dave Francis a ministrar uma palestra no laboratório Procter e Gamble Co. em Cincinnati, se interessou pelo trabalho do Dr. Marion D. Francis com análogos dos PIs, chamados na época difosfonatos, no

desenvolvimento de agentes tópicos para inibição da formação de cálculos dentários (FRANCIS, 1969; FLEISCH, 1981). A partir deste contato entre pesquisadores, Fleisch e colaboradores voltaram seus estudos aos BFs, juntamente com a ajuda do Dr. Marion D. Francis (FLEISCH et al., 1968; FLEISCH, 1981).

Os BFs são análogos sintéticos dos PIs que possuem duas ligações P-C ligadas pelo mesmo carbono (P-C-P), ao invés das ligações P-O-P dos PIs (FLEISCH; RUSSELL; FRANCIS, 1969; FLEISCH, 2000; FLEISCH, 2002; BARTL et al., 2007). Esta mudança de ligação do átomo de O para átomo de C confere aos BFs uma estabilidade ao calor e a maioria dos reagentes químicos, assim como resistência a hidrólise enzimática (Figura 1.1) (FLEISCH, 2000; FLEISCH, 2002; BARTL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

Fonte: Adaptado de Nancollas et al. (2006) e Roelofs et al. (2008).

Figura 1.1 - Formula química do pirofosfato e modelo de formula dos bisfosfonatos mostrando as cadeias R1 e R2 ligadas ao átomo de carbono (C) central.

Os BFs também possuem 2 cadeias laterais R1 e R2 ligadas ao átomo de C central que permitem mudanças que alteram as características biológicas, químicas e toxicológicas destes medicamentos (Figura 1.2) (ROGERS et al., 2011).

Fonte: Adaptado de Rogers (2003).

Figura 1.2 - Formulações dos BFs não nitrogenados e N-BFs estudados e disponíveis atualmente.

A cadeia R1 na maioria dos BFs disponíveis para uso em humanos é formada por um grupo hidroxila (OH) que confere maior afinidade e ligação mais forte aos íons cálcio, através de uma ligação tridente (RUSSELL; ROGERS, 1999; BARTL et al., 2007; EBETINO et al., 2011).

Os BFs podem ser divididos em BFs não nitrogenados ou simples (S-BFs), e BFs nitrogenados (N-BFs) de acordo com a composição da cadeia R2 (BASSETT et al., 1969; EBETINO et al., 2011; RUSSELL, 2011). Os S-BFs foram os primeiros desenvolvidos, sendo os primeiros estudos realizados pelo grupo de Fleisch na década de 60 sobre os efeitos físico-químicos destes sobre o metabolismo do cálcio (FLEISCH; RUSSELL; FRANCIS, 1969; FRANCIS; RUSSELL; FLEISCH, 1969; RUSSELL et al., 1970; MÜHLBAUER et al., 1971).

Os N-BFs são mais recentes, sendo o pamidronato o primeiro N-BFs disponível para uso. Este foi produzido por Gador e Henkel em 1971 e fora inicialmente utilizado como aditivo em detergentes industriais (WIDLER et al., 2002; FISCHER; GERE, 2006).

Os N-BFs apresentam maior potência na inibição da reabsorção devido a presença do átomo de N em sua composição. Porém a estrutura R2 pode apresentar muitas variações entre

os N-BFs, fazendo com que cada droga possua um mecanismo de ação e potência específicos (Tabela 1.1) (BARTL et al., 2007; EBETINO et al., 2011; RUSSELL, 2011).

Tabela 1.1 - Lista de BFs disponíveis com a estrutura das cadeias R1 e R2 e potências relativas em comparação ao etidronato.

Substância	Nome comercial	Via administração	Patente Básica	Cadeia R1	Cadeia R2	Potência relativa
Etidronato	<i>Didronel</i> [®]	V.O.	1966	-OH	-CH ₃	1 X
Clodronato	<i>Ostac</i> [®]	V.O. / E.V.	1963	-CL	-CL	10 X
Pamidronato	<i>Aredia</i> [®] <i>Pamidrom</i> [®]	E.V.	1971	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	100 X
Alendronato	<i>Fosamax</i> [®] <i>Alendil</i> [®]	V.O.	1982	-OH	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	1.000 X
Risedronato	<i>Actonel</i> [®] <i>Osteotrat</i> [®]	V.O.	1984	-OH	CH ₂ -3-piridina	5.000 X
Ibandronato	<i>Bondronat</i> [®] <i>Bonviva</i> [®]	V.O. / E.V.	1986	-OH	CH ₂ -CH ₂ -N(CH ₃)-(pentyl)	10.000 X
Ácido Zoledrônico	<i>Zometa</i> [®] <i>Aclasta</i> [®]	E.V.	1986	-OH	CH ₂ -imidazole	20.000 X

Fonte: Adaptado de Fischer e Gere (2006); Bartl et al. (2007).

Apesar dos estudos dos BFs terem sido iniciados em 1966 e publicados em 1969, o primeiro trabalho mostrando o uso dos BFs em humano foi publicado no Lancet 1969, relatando o tratamento de miosite ossificante progressiva com etidronato em uma criança (BASSETT et al., 1969; RUSSELL, 2011).

Nos anos que se seguiram mais estudos demonstraram os mecanismos de ação dos BFs, com os pesquisadores percebendo que quanto maior a cadeia lateral R2 com o átomo de N, maior seria a potência das drogas (RUSSELL et al., 2006; RUSSELL et al., 2007). Desta forma novas formulações de BFs como alendronato, risedronato, entre outras, foram desenvolvidas na tentativa de aumentar a potência destes, diminuindo os possíveis efeitos colaterais.

Atualmente o BFs considerado de maior potência é o ácido zoledrônico (AZ), que fora desenvolvido e patenteado em 1986 pela Novartis. Este é um BFs de terceira geração composto por um anel heterocíclico imidazólico na cadeia R2 (CHEER; NOBLE, 2001; GREEN, 2005). Os primeiros estudos com AZ foram realizados na década de 90, com Evans e Braidman (1994) com estudo *in vitro*, e Green, Muller e Jaeggi (1994) mostraram o efeito

do AZ sobre a reabsorção óssea *in vivo* e *in vitro* (GREEN; MULLER; JAEGGI, 1994; IBRAHIM et al., 2003).

No final da década de 90 foram realizados os primeiros estudos clínicos para avaliar a eficácia do AZ no tratamento de distúrbios osteolíticos do tecido ósseo (ARDEN-CORDONE et al., 1997; BODY et al., 1999). O AZ foi liberado pela agência americana de regulação de drogas e alimentos (FDA) somente em 2001 para o tratamento da hipercalemia devido a lesões malignas, e em 2002 para o tratamento de mieloma múltiplo e metástases ósseas de tumores malignos (SCHWETZ, 2001; IBRAHIM et al., 2003; FISCHER; GERE, 2006).

Os BFs já estudados e os disponíveis atualmente no mercado podem ter via de administração oral (etidronato, clodronato, alendronato, risedronato, ibandronato) ou endovenosa (clodronato, ibandronato, pamidronato, ácido zoledrônico) (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). Quando administrados por (V.O.) os BFs apresentam uma baixa taxa de absorção, que varia de 0,5% a 10% da dose administrada sendo absorvida para corrente sanguínea (LIN, 1996; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; MILLER, 2011). Os N-BFs apresentam uma taxa absorção de 3-7% como no caso do etidronato, maior quando comparada com 0,7% do Alendronato e 0,62% do Risedronato, sendo estas taxas dose-dependentes, havendo uma maior absorção quando administradas doses mais altas. (LIN, 1996; ROELOFS et al., 2008; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; MILLER, 2011).

A absorção dos BFs ocorre nas áreas de maior superfície no início do intestino, principalmente por difusão passiva, pela via paracelular, apresentando diferenças entre espécies e entre as formulações (LIN, 1996; BARTL et al., 2007). Esta absorção é dose-dependente, com altas doses apresentando uma maior taxa de absorção, e é diminuída quando ingeridos com alimentos, principalmente leite e derivados do leite, mas também ocorre com outros tipos de bebidas (LIN, 1996; BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008; ROELOFS et al., 2008).

A baixa biodisponibilidade dos BFs se deve, principalmente, a sua alta carga negativa e baixa lipofilia, que altera seu transporte pela membrana para dentro das células (LIN, 1996; BARTL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). Uma vez na corrente sanguínea os BFs, tanto administrados por V.O. quanto por via endovenosa (E.V.) se ligam às proteínas plasmáticas, porém 30% a 70% da dose absorvida para corrente sanguínea são rapidamente distribuídos para os tecidos ósseos e o restante sendo excretado inalterado pelos rins, com menos de 1% sendo eliminado com a bile (LIN, 1996;

ROELOFS et al., 2008; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). A ligação com as proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, é o determinante da meia-vida dos BFs, sendo eliminados aproximadamente de 0,5 a 2 horas após uma administração E.V. em humanos (LIN, 1996; ROELOFS et al., 2008).

Os BFs apresentam grande afinidade pelos cristais de hidroxiapatita (HAP), principalmente de regiões de alta remodelação óssea. Esta alta afinidade por íons cálcio faz com que os BFs sejam rapidamente removidos da corrente sanguínea tendo como alvo a (HAP) da superfície mineral dos ossos em regiões de remodelação óssea ativa (ROGERS, 2003). Durante o período que os BFs permanecem ligados e dentro do tecido ósseo estes não causam efeitos anti-reabsortivos na região, pois não têm contato com células (KIMMEL, 2007).

Os BFs são liberados da ligação com HAP quando ocorre a reabsorção do tecido ósseo pelos OCs, sendo esta considerada a meia-vida no tecido ósseo dos BFs (LIN, 1996; RUSSELL; ROGERS, 1999; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; ROGERS et al., 2011). Esta meia-vida óssea é dependente da intensidade da remodelação óssea, que pode ser alterada pelos próprios BFs, fazendo com que os BFs tenham influência sobre sua eliminação do tecido ósseo (ROELOFS KA et al., 2008). Há relatos de permanência dos BFs no tecido ósseo por períodos que chegam a 10 anos (KIMMEL, 2007).

Quando o tecido ósseo é reabsorvido e ocorre a liberação dos BFs, estes podem ligar-se novamente aos cristais de HAP, serem redistribuídos a outros sítios ósseos ou excretados na urina (LIN, 1996; KIMMEL, 2007; ROELOFS et al., 2008).

Os primeiros estudos com BFs realizados na década de 60 mostraram que, como os PIs, os BFs apresentam uma grande afinidade pelo mineral ósseo, e inibem a calcificação óssea e a dissolução de cristais de hidroxiapatita através de um efeito físico-químico (FLEISCH; RUSSELL; FRANCIS, 1969; FRANCIS, 1969; FRANCIS; RUSSELL; FLEISCH, 1969; RUSSELL; ROGERS, 1999; RUSSELL et al., 2007). Esta ligação com os cristais de HAP é feita pelos 2 grupos fosfatos e pela cadeia R1, sendo aumentada quando esta é formada por um radical hidroxila (-OH), pois faz com que haja uma ligação tridente aos íons cálcio (RUSSELL; ROGERS, 1999).

BFs em altas doses podem impedir a mineralização normal de tecidos como osso, cartilagem, dentina e esmalte (BOONEKAMP et al., 1986). Com a inibição da mineralização há maior susceptibilidade a fraturas e a sua cicatrização se torna alterada. Já a inibição da

reabsorção óssea ocorre com doses até 1000 vezes menores do que a necessárias para causar a inibição da mineralização (RUSSELL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

O principal mecanismo de ação dos BFs sobre o metabolismo ósseo é a inibição da reabsorção óssea através de alterações nos osteoclastos (OCs), bem documentado em estudos *in vitro* e *in vivo* (FRITH et al., 2001; HALASY-NAGY; RODAN; RESZKA, 2001; DUNFORD, 2010).

Durante a reabsorção do tecido ósseo os OCs acidificam as lacunas de reabsorção abaixo das células pela secreção de prótons que ajuda na digestão da matriz de proteínas (FLEISCH, 1998; RUSSELL et al., 1999). Acredita-se que isto facilite a liberação dos BFs ligados a superfície mineral óssea devido a protonação dos grupos fosfato resultando em uma diminuição na habilidade de quelar os íons cálcio, podendo aumentar a concentração de BFs em solução nas lacunas de reabsorção (ROELOFS et al., 2008; EBETINO et al., 2011).

A absorção dos BFs carregados negativamente ocorre via endocitose em fase fluida seguida de acidificação de vesículas intracelulares e liberação dos BFs no citosol, o que pode contribuir para a seleção dos BFs por OCs (RUSSELL et al., 2007).

Somente em 1988 com estudo realizado por Klein, Martin e Satre, que utilizou os BFs mais simples, metileno BFs (medronato), para medir o pH em amebas *Dictyostelium* slime mould amoeba, conseguiu-se um melhor entendimento de como os BFs atuam sobre os OCs (KLEIN; MARTIN; SATRE, 1988; ROGERS et al., 2011). Klein, Martin e Satre (1988) observaram que o medronato era metabolizado em análogos não hidrolisáveis metilenizados do ATP.

Posteriormente estudos de Rogers et al. (1992) entre outros autores, demonstraram que outros BFs não nitrogenados eram metabolizados em análogos metilenizados do ATP em amebas *Dictyostelium* (ROGERS et al., 1992; ROGERS et al., 1994). Estes estudos também mostraram que o acúmulo destes metabolitos do tipo AppCp, causa uma citotoxicidade e inibição da proliferação da amebas *Dictyostelium* (PELORGEAS; MARTIN; SATRE, 1992).

Nos anos subsequentes estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os BFs simples são metabolizados dentro dos OCs em análogos não hidrolisáveis metilenizados do ATP (tipo AppCp) que são tóxicos e induzem a apoptose dos OCs inibindo a reabsorção óssea (FRITH et al., 1997; FRITH et al., 2001; ROELOFS et al., 2008). Acredita-se que estes análogos do ATP induzem toxicidade pela inibição da atividade de enzimas intracelulares ATP-dependentes como a (Transportador de nucleotídeos de Adenina) adenina nucleotídeo

translocase (ANT) mitocondrial que está envolvida no controle da apoptose pelo poro de transição de permeabilidade na membrana mitocondrial (FRITH et al., 2001; COXON; THOMPSON; ROGERS, 2006).

É sugerido que a inibição da ANT pelo AppCC12p possa causar a hiperpolarização da camada interna da membrana mitocondrial e estimular a abertura dos poros de transição de permeabilidade levando a destruição do potencial mitocondrial da membrana, a liberação de fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1) e de citocromo C causando a ativação de caspases pro-apoptóticas (COXON; THOMPSON; ROGERS, 2006; ROELOFS et al., 2008).

Como os N-BFs nitrogenados não sofrem hidrolisação, outras hipóteses foram estudadas para o efeito inibitório destes na reabsorção óssea.

Estudos de Amin et al. (1992, 1996) para estudar a inibidores da esqualeno sintetase levaram a descoberta que BFs nitrogenados inibem a via do mevalonato através da inibição da enzima farnesil difosfato sintetase (FPP) (AMIN et al., 1992, 1996). Alguns BFs nitrogenados, como o caso do AZ, também inibem outras enzimas da via do mevalonato, incluindo a esqualeno sintetase, geranilgeranil difosfato (GGPP) sintetase, com uma menor potência que a inibição sobre a FPP (GUO et al, 2007; ROELOFS et al., 2008).

A via do mevalonato além de ser responsável pela produção de colesterol é também responsável pela formação de lipídios isoprenoides com IPP (isopentenil difosfato), FPP (farnesil difosfato sintetase) e GGPP (geranilgeranil difosfato) sendo as duas últimas substratos para isoprenilação de proteínas (NANCOLLAS et al., 2006; DUNFORD, 2010).

Isoprenilação envolve a transferência de um grupo lipídico farnesil ou geranilgeranil em uma cisteína residual em um característico carboxi-terminal motifs, formando proteínas farnesiladas e geranilgeranilsiladas (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). A maioria das proteínas isopreniladas identificadas até hoje são Guanosina-trifosfatases (GTPases) (maioria geranilgeranilsiladas) que são importantes proteínas sinalizadoras que regulam uma variedade de processos celulares importantes para o funcionamento dos OCs incluindo, morfologia celular, sinalização de integrinas, bordas em escova, trafico de endossomos e apoptose (WIDLER et al., 2002; GREEN, 2004; RUSSELL, 2006, 2007).

AS GTPases se ligam a membrana celular com a ajuda da cadeias laterais Farnesil- e Geranilgeranil e enviam sinais específicos que regulam várias funções celulares. No entanto como não há formação dessas cadeias lipídicas as GTPases não são capazes de transferir os sinais para a membrana celular (RUSSELL et al., 1999; FLEISCH, 2002; RUSSELL, 2006).

Consequentemente as células se tornam inativas e perdem as propriedades específicas de membrana e, eventualmente, induzem apoptose (BARTL et al., 2007).

Devido ao mecanismo de ação dos BFs sobre o metabolismo ósseo os BFs são considerados as drogas de escolha no tratamento das doenças do tecido ósseo causadas por distúrbios no metabolismo dos OCs, como doença de Paget, hipercalcemia por lesões malignas e mieloma múltiplo (RUGGIERO, 2011). Os BFs tiveram um grande impacto no tratamento paliativo destas doenças, diminuindo as dores ósseas, complicações no tecido ósseo e diminuição das fraturas patológicas (RUGGIERO, 2011). Nos últimos anos tem se estudado e conseguido bons resultados no tratamento da osteoporose com os BFs.

Os recentes avanços nos estudos do tratamento destas doenças e o desenvolvimento de drogas mais potentes, tem feito aumentar o uso dos BFs no mundo. A prescrição de bisfosfonatos para o tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo teve um aumento significativo nos últimos anos, principalmente após o AZ ser aprovado para o tratamento de mieloma múltiplo e metástases ósseas em 2002 (ADVISORY TASK FORCE ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS, 2007). Este aumento trouxe consequências, como o aparecimento de uma complicação nunca antes descrita, a osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bisfosfonatos (OMAB) (MARX, 2003).

Esta complicação foi primeiramente descrita em 2003 por Marx, que relatou o aparecimento de áreas de exposição de tecido ósseo dolorido na cavidade oral que não cicatrizavam e não respondiam aos tratamentos convencionais em 36 pacientes que faziam uso de pamidronato ou AZ (MARX, 2003). Em seguida, Ruggiero et al. (2004) relatou o aparecimento de lesões semelhantes as encontradas por Marx (2003) em 63 pacientes em terapia com BFs.

Como não havia na época uma definição precisa para estas lesões, a Academia Americana de Medicina Oral (AAOM) publicou em 2005 um artigo posicionando-se sobre estas complicações, sendo inicialmente denominadas osteonecrose associada aos BFs (MIGLIORATI et al., 2005). Sendo este artigo seguido por outros artigos se posicionando sobre estas lesões publicados pela Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) e Sociedade Americana para Pesquisa Óssea e Mineral (ASBMR) publicados em 2007 (MIGLIORATI et al., 2005; ADVISORY TASK FORCE ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS, 2007).

Estas lesões foram denominadas pela AAOMS como osteonecrose dos maxilares associada ao uso dos BFs (OMAB) e foi definida como uma exposição óssea que persiste por mais de 8 semanas na cavidade oral em pacientes sob tratamento com bisfosfonatos e que não foram submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço.

Neste trabalho a AAOMS também define estágios para a classificação e correto diagnóstico destas lesões, assim como estratégias de tratamento em cada tipo de lesão. Estas definições foram posteriormente atualizadas em 2009 em um novo artigo de posicionamento da AAOMS, com a adição do estágio 0 a classificação (ADVISORY TASK FORCE ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS, 2007; RUGGIERO et al., 2009).

A OMAB pode ser classificada da seguinte forma segundo a AAOMS:

Pacientes em risco: pacientes em terapia com BFs, mas que não apresentam sinais e/ou sintomas aparentes de OMAB.

Estágio 0 – Não apresenta sinais clínicos de OMAB, porém apresenta sintomas relacionados.

Estágio 1 – Área de exposição óssea, mas sem sintomatologia e/ou sinais de infecção.

Estágio 2 – Área de exposição óssea com infecção apresentando dor com ou sem drenagem de secreção purulenta.

Estágio 3 – Área de exposição óssea com dor, infecção e um dos seguintes achados, fraturas patológicas, comunicação buco-sinusal ou osteomielite estendo para a base da mandíbula ou soalho do seio maxilar.

Está também se caracteriza por não responder positivamente aos tratamentos convencionais, como debridamento cirúrgico, oxigenação hiperbárica e antibioticoterapia, ocorrendo, em muitos casos, um aumento da região acometida frente ao tratamento cirúrgico, afetando, demasiadamente, a qualidade de vida dos indivíduos (RUGGIERO; FANTASIA; CARLSON, 2006).

A ocorrência deste tipo de complicação é mais frequente em pacientes que fazem uso de BFs por E.V., geralmente o pamidronato e AZ, para o tratamento de mieloma múltiplo e metástases ósseas de câncer de mama e próstata (FILLEUL; CROMPOT; SAUSSEZ, 2010).

A mandíbula é mais comumente afetada, porém a maxila é acometida isoladamente em aproximadamente 27% dos casos (MARX et al., 2005; FILLEUL; CROMPOT; SAUSSEZ, 2010). Apesar da maioria dos trabalhos relatarem as exodontias como um importante fator desencadeante, Marx mostrou 25% de ocorrência espontânea destas lesões (MARX et al., 2005).

Uma das hipóteses descritas para este fenômeno é o fato de o osso alveolar sofrer uma remodelação óssea mais intensa que em outros ossos do corpo, e como os bisfosfonatos apresentam uma maior afinidade por regiões com alta remodelação óssea, estes seriam depositados mais intensamente nos maxilares (ALLEN; BURR, 2009). Porém em um estudo publicado por Wen et al. (2011), foi demonstrado através da administração de pamidronato com marcadores fluorescentes que a deposição desta droga nos maxilares era semelhante à de ossos longos, como tíbia, fêmur, e menor que nas costelas e vertebrae de ratos.

Passados alguns anos dos primeiros relatos deste tipo de complicação, pouco se sabe sobre a patofisiologia da OMAB. A maioria dos trabalhos publicados sobre o assunto são relatos de casos, estudos retrospectivos ou consensus sobre o manejo destes tipos de lesões baseados em opiniões de especialistas (ALLEN; BURR, 2009).

Uma característica muito descrita na literatura sobre o mecanismo de ação dos BFs é seu efeito sobre a via do mevalonato, inibindo a farnesilpirofosfato sintetase, que leva a uma diminuição da formação de lipídios isoprenoides. Com a diminuição destes lipídios ocorre uma diminuição de proteínas GTPases como RAS, RHO, RAC e RAB, que são proteínas responsáveis por várias funções dos OCs (FLEISCH, 1998, 2002; KIMMEL, 2007). A queda na ativação destas proteínas causa uma série de mudanças intracelulares nos OCs como, indução da apoptose, rompimento do citoesqueleto, perda das bordas crenadas, entre outras (KIMMEL, 2007). Mas o completo mecanismo pelo qual os BFs causam uma grande diminuição da remodelação óssea, assim como a patofisiologia da OMAB continuam sem resposta (OTTO et al., 2011).

Alguns autores relatam que estes medicamentos também podem atuar em outras células como osteoblastos (OBs) e osteócitos (OTCs), causando uma diminuição do número destas células e na formação óssea, em áreas de remodelação óssea, quando administrados em altas doses (NAIDU et al., 2008; ORRISS et al., 2009). Acredita-se que esta ação pode ocorrer de forma direta pela toxicidade da droga sobre osteoblastos, ou de forma indireta pela não liberação de fatores indutores da diferenciação e ativação de OBs, como BMPs, pelo fato de os OCs não quebrarem os cristais de HAP (POZZI et al., 2009). Estes efeitos fazem com

que não haja uma renovação celular da região, havendo a permanência de um tecido ósseo com matriz óssea envelhecida e com uma diminuição e inativação das células ósseas (KIMMEL, 2007).

Kimachi et al. (2011) relatou uma ação dos bisfosfonatos sobre a expressão de proteínas como RANK induzida por TNF- α e RANKL que são importantes para indução da migração e diferenciação das células pré-osteoclásticas em regiões em reparo ósseo. Aghaloo, Felsenfeld e Tetradis (2010) descreveram lesões semelhantes à osteonecrose dos maxilares em paciente em tratamento com Denosumab, que é um anticorpo monoclonal anti-RANKL, que causa inibição da reabsorção óssea por competir com RANKL pela ligação com RANK. A identificação de uma ação dos BFs sobre a via de diferenciação e ativação dos OCs, como descrito por Kimachi et al. (2011), juntamente com os relatos de lesões semelhantes a osteonecrose dos maxilares em pacientes sob terapia com Denosumab, leva a crer que os efeitos dos BFs vão além da inibição da via do mevalonato.

O sistema RANK/RANKL/OPG foi uma grande descoberta para a compreensão do metabolismo ósseo. RANKL é uma citocina da superfamília do TNF produzido por células da OBs e linfócitos T e se liga ao RANK que está presente nas células dendríticas, OCs e células precursoras de OCs, levando a um aumento na ativação e na diferenciação das células precursoras em OCs (ARRON, 2000; VIEIRA, 2013). A OPG que é uma glicoproteína solúvel transmembrana tipo I receptor tipo “decoy” produzida pelos OBs e age como um receptor competitivo ligando-se ao RANKL e impedindo a interação entre RANK e RANKL, e desta inibindo a diferenciação e ativação dos osteoclastos (ARRON, 2000; VIEIRA, 2013).

Outro efeito causado pelos BFs que vem sendo estudado como possível etiopatogenia para a OMAB é seu efeito anti-angiogênico (HAMMA-KOURBALI et al., 2003; CETINKAYA et al., 2008). Trabalhos prévios com BFs já mostraram este efeito sobre a vascularização e recentemente tem se estudado este efeito como possível desencadeante da OMAB, principalmente sobre a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é um importante fator pro-angiogênico que estimula a angiogênese direta e indiretamente (WOOD et al., 2002). Pode ser produzido por células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T, sendo aumentado em regiões de hipóxia e de reparo ósseo (CARDOSO, 2009; MAAHS et al., 2011).

Porém, os trabalhos com BFs, em sua maioria, estudaram exclusivamente a ação destas drogas sobre as células e metabolismo ósseo, havendo poucos estudos correlacionando os efeitos destas com o desencadeamento da osteonecrose dos maxilares

O fato de estas lesões aparecerem principalmente nos maxilares, faz com que haja a necessidade de mais estudos para desvendar as diferenças de ação destas drogas na cavidade oral e em outros tecidos ósseos, na tentativa de descobrir o real mecanismo de desenvolvimento destas lesões.

O desenvolvimento de um modelo animal se faz necessário para que se possa estudar esta correlação entre BFs e o aparecimento destas lesões. Os modelos animais são difíceis de serem desenvolvidos devido à característica dos bisfosfonatos se acumularem nos tecidos ósseos conforme o tempo de uso e dosagem, sendo um fator importante no aparecimento destas lesões o uso prolongado destas medicações.

Alguns estudos conseguiram mimetizar as características clínicas da osteonecrose dos maxilares em alguns modelos animais, porém pouco foi estudado sobre os mecanismos e patofisiologia da formação destas lesões no âmbito celular e molecular (ALLEN; BURR, 2008; SENEL et al., 2010; HOKUGO et al., 2010).

Estudos realizados em cachorros com alendronato por V.O. e A.Z. por via E.V., não observaram clinicamente o aparecimento de lesões tipo osteonecrose nos maxilares, mas conseguiram demonstrar microscopicamente um tecido ósseo desvitalizado (ALLEN; BURR, 2008). Mas estudos em cachorros têm um alto custo, são difíceis de serem realizados e demandam uma grande quantidade de material, além das limitações de opinião pública atualmente no país.

Senel et al. (2010) em estudo realizado em ratos conseguiram demonstrar o aparecimento de lesões do tipo osteonecrose de forma espontânea com o uso de ácido zoledrônico em altas doses. Hokugo et al. (2010) descreveram o aparecimento na microscopia óptica em 14% dos ratos submetidos à cirurgia de extração dentária, que estavam sob administração de A.Z. por via E.V. por um período de 10 semanas. Estes estudos possuem grandes vantagens para a avaliação dos efeitos dos bisfosfonatos no aparecimento da osteonecrose dos maxilares, pois se consegue estudar os mecanismos envolvidos no aparecimento da osteonecrose dos maxilares em animais de fácil manipulação e em espaços de tempo bem inferiores a 1 ano, tempo comumente necessário para o aparecimento destas lesões em humanos (MARX et al., 2005). Também é possível a realização de extrações que é considerado uns dos grandes fatores desencadeantes destas lesões de osteonecrose.

Diante do exposto, acreditamos na necessidade de estudos que avaliem o efeito dos bisfosfonatos administrados por via parenteral, como ácido zoledrônico, sobre o processo de

reparo ósseo, em modelos animais que tenham comprovadamente desenvolvido lesões do tipo osteonecrose.

A análise microscópica das células e análise molecular das proteínas envolvidas no processo de remodelação óssea podem trazer novos achados nos mecanismos de ação e patofisiologia da osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bisfosfonatos.

O modelo animal que foi utilizado no presente trabalho segue o descrito por Maahs et al. (2011), pois este foi o modelo em ratos *Wistar* que conseguiu melhor mimetizar lesões tipo osteonecrose dos maxilares, relatando uma prevalência de 80% de osteonecrose na região de alvéolos dentários pós-exodontias, sob administração intraperitoneal de ácido zoledrônico, em exames de microscopia óptica.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo validar o modelo experimental em ratos *Wistar* descrito por Maahs et al. (2011) e avaliar, neste modelo experimental, as alterações causadas pelo ácido zoledrônico (Zometa[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) sobre o processo de reparo ósseo dos alvéolos após exodontia dos molares superiores do lado direito de ratos *Wistar* em terapia com ácido zoledrônico e ratos controle através dos seguintes métodos:

- análise qualitativa e quantitativa do processo de reparo ósseo através de microscopia convencional pela coloração de hematoxilina de Harris e eosina de Lison (H.E.);
- análise quantitativa da expressão do RNAm de citocinas envolvidas no processo de reparo ósseo RANK, RANKL, OPG e VEGF, pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*RealTimePCR*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP) protocolado sob processo número 019/2011 (Anexo A).

3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com 12 semanas de vida e peso aproximado de 300 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP). Somente foram utilizados ratos machos para evitar a influência de variações hormonais sobre o processo de reparo ósseo. Estes foram acondicionados em caixas de polipropileno forradas com maravalha estéril, em número de 5 animais por caixa. A alimentação dos animais foi feita com ração sólida (Ração Ativada Produtor – Anderson & Clayton S.A.) e água *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas após o procedimento cirúrgico, quando a alimentação foi triturada. Os animais foram mantidos a uma temperatura ambiente média de 22°C e iluminação artificial variando entre 5-60 Lux. O fotoperíodo foi de 12 horas claro e 12 horas escuro, sendo considerado o período de luz das 6 às 18 horas. O local também apresentava sistema de exaustão de aproximadamente 15 trocas de ar por hora e umidade relativa de 45% a 75%.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após 2 semanas de aclimatização os ratos foram numerados, pesados e separados em 4 grupos de modo aleatório:

- **Controle (CO):** animais receberam cloreto de sódio 0,9% no mesmo volume que outras medicações e NÃO foram submetidos às exodontias;
- **Ácido zoledrônico (AZ):** animais receberam ácido zoledrônico (Zometa[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) 0,6 mg/kg e NÃO foram submetidos às exodontias;

- **Controle cirúrgico (CO-C):** animais receberam cloreto de sódio 0,9% no mesmo volume que outras medicações e foram submetidos a exodontia dos molares superiores direitos;
- **Ácido zoledrônico cirúrgico (AZ-C):** animais receberam ácido zoledrônico (Zometa[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) 0,6 mg/kg e foram submetidos a exodontia dos molares superiores direitos.

Cada grupo era constituído de 12 ratos e a administração das soluções (cloreto de sódio 0,9% e ácido zoledrônico) foi realizada por via intraperitoneal há cada 28 dias com um total de 5 doses, sendo a administração da primeira dose feita no primeiro dia do experimento. A cada 28 dias os animais foram pesados novamente para novo cálculo das dosagens das soluções.

A seguir estão descritos a distribuição dos grupos, o número de animais por grupo e a distribuição dos animais por tipo de experimento (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Distribuição dos animais por grupo e por experimento realizado.

Para a injeção das soluções no abdômen dos animais, foi feita a contenção desses colocando-se a mão sobre o dorso e a caixa torácica, e a cabeça sendo segurada com o polegar e o indicador. Os abdomens foram divididos em 4 quadrantes, com uma linha média e uma linha perpendicular à linha média passando pelo umbigo do rato, sendo as injeções realizadas no quadrante inferior esquerdo evitando a perfuração de órgãos vitais (KRINKE, 2000). Os animais foram manipulados de tal modo que a cabeça ficasse em posição inferior ao abdômen e a agulha foi inserida na pele em um ângulo de 20-45°, sendo utilizada uma seringa de 1 ml com uma 13 x 0,45 mm (KRINKE, 2000; MAAHS et al., 2011).

As dosagens e intervalo de administração das soluções estavam de acordo com o trabalho de Maahs et al. (2011) que relatou a presença de osteonecrose ao exame microscópico em 80% dos ratos que receberam ácido zoledrônico (Zometa[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) por via intraperitoneal e 0% nos ratos do grupo controle. Como foi

realizada a análise molecular por *RealTimePCR* juntamente com a análise histológica, optamos por utilizar 12 ratos em cada grupo. Desta forma tivemos um número de ratos suficiente, 6 de cada grupo para cada análise, para que possa haver uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental.

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Passados 45 dias do início do experimento os animais dos grupos CO-C e AZ-C foram submetidos à exodontia do primeiro, segundo e terceiro molares superiores do lado direito (Figura 3.2).

No pré-operatório todos os animais foram inspecionados quanto ao estado da pele, presença de secreção nas narinas e características das fezes, para ser certificado que os mesmos estavam com boa saúde. Caso apresentassem algum destes sintomas os procedimentos seriam abortados e os animais retirados da pesquisa.

Figura 3.2 - Esquema de aplicações, procedimento cirúrgico e eutanásia em função do tempo.

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos a anestesia geral com uma combinação de cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands[®], 25 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands[®], 10 mg/kg) em 0,5 ml de solução por via intramuscular com uma agulha 13 x 0,45 mm (Figura 3.3) (KRINKE, 2000; CARDOSO, 2009). Depois de confirmada a ausência de reflexos, os animais foram colocados em uma bancada forrada com tecido não tecido (TNT).

Figura 3.3 - Anestesia dos animais. Medicações utilizadas na anestesia geral e forma de aplicação.

Foi realizada a antisepsia intraoral com solução de gluconato de clorexidina 0,12% e um campo cirúrgico descartável estéril confeccionado com TNT foi colocado sobre os animais. Após o preparo inicial do animal foi realizada a exodontia dos molares superiores direitos empregando-se movimento de alavanca com espátula 3s (SSWhite, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) adaptada para luxação (Figura 3.4).

Figura 3.4 - **A:** Posicionamento do animal para exodontia dos molares superiores, **B:** Maxila mostrando a região das exodontias não havendo necessidade de sutura. **C:** molares superiores extraídos com raízes intactas.

Concluídos os procedimentos cirúrgicos os alvéolos foram irrigados com soro fisiológico 0,9%, não havendo necessidade de serem suturados. Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam como analgésico pós-operatório cetoprofeno (Profenid[®], Sanofi-aventis, São Paulo, SP, Brasil) durante 3 dias, na dosagem de 0,03 ml por 100 gramas de massa corpórea por via intramuscular.

3.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Previamente ao procedimento cirúrgico, após terem sido anestesiados, foi realizada a oroscopia por um avaliador cego ao experimento, que avaliou a presença ou ausência de lesões na cavidade oral.

No momento da eutanásia dos animais foi realizada uma nova avaliação macroscópica da cavidade oral para presença ou ausência de lesões e também para presença ou ausência de solução de continuidade da mucosa oral na região das extrações dentárias, essa última com o auxílio de uma sonda clínica número 5 (Figura 3.5) (MAAHS et al., 2011).

Figura 3.5 - A: avaliação macroscópica da solução de continuidade (SOC) do epitélio da mucosa oral na região das exodontias dos molares com a sonda clínica numero 5. **B:** área de solução de continuidade (SOC) da mucosa oral com exposição óssea (EO) na região das exodontias.

3.5 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A eutanásia de todos os animais foi realizada 150 dias após o início do tratamento (105 dias após exodontias), sob sedação, por injeção intramuscular de dose excessiva de anestésico. Foi realizada nova avaliação macroscópica da cavidade oral e as maxilas foram seccionadas na distal do terceiro molar e mesial de primeiro molar e desarticuladas do restante da cabeça (Figura 3.6).

Figura 3.6 - A, B e C: Coleta da maxila com disco diamantado seccionando a maxila na mesial do 1º molar e nos pilares zigomático-maxilar direito e esquerdo. **D e E:** linhas de osteotomia na mesial do 1º molar e nos pilares zigomático-maxilar direito e esquerdo. Também foi realizada a osteotomia na distal do 3º molar.

Para a análise microscópica as maxilas foram analisadas como uma única amostra, não sendo seccionadas na rafe palatina. Neste momento foram feitos pontos de sutura com fio de seda 4.0 (Shalon[®], Shalon Fios Cirúrgicos LTDA – São Luís dos Montes Claros, GO, Brasil) na região anterior da maxila para que facilitar a diferenciação entre região anterior da posterior no processo de inclusão em parafina e depois de incluídas (Figura 3.7).

Figura 3.7 - Maxila coletada com sutura com seda 4.0 na região anterior para fazer a inclusão.

As maxilas escolhidas para a análise molecular por *RealTimePCR* foram seccionadas na rafe palatina e todo o tecido mole dissecado e removido. As hemi-maxilas foram avaliadas de forma independente, sendo caracterizadas como 2 amostras por animal, CO esquerdo e direito, AZ esquerdo e direito, assim como, CO-C exo ou AZ-C exo (maxilas do lado direito região das exodontias dos grupos CO-C e AZ-C) e CO-C dente ou AZ-C dente (maxila lado esquerdo região sem exodontias dos grupos CO-C e AZ-C) (Figuras 3.8 e 3.9).

Figura 3.8 - Esquema de divisão das maxilas para realização dos experimentos por *RealTimePCR*.

Figura 3.9 - Distribuição de denominação dos grupos para o estudo de *RealTimePCR*.

Nas análises microscópica quantitativa e molecular os lados esquerdo e direito dos grupos CO-C e AZ-C foram denominados de acordo com a região estudada, sendo o lado direito das exodontias CO-C exo e AZ-C exo, e o lado esquerdo com os dentes CO-C dente e AZ-C dente, sendo analisados separadamente como grupos diferentes.

3.6 PREPARO PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA

As maxilas de 6 ratos de cada grupo foram fixadas em formalina tamponada 10%. No dia seguinte, antes de dar início a desmineralização, foram obtidas imagens radiográficas com filmes radiográficos oclusais. Em cada filme foram radiografadas as maxilas de vários animais juntos, sendo adequadamente identificadas.

Um aparelho Yoshida da clínica de radiologia da FOB-USP foi utilizado para realização das imagens radiográficas, com um tempo de exposição de 0,17 segundos, distância foco-filme de 40 cm, em uma mesa forrada com jornal e com um mapa indicando a posição correta do filme.

Realizadas as radiografias iniciais as peças foram desmineralizadas em solução aquosa de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III, Merck®, Alemanha; e 0,44% de Hidróxido de sódio LabSynth®, Diadema, Brasil, diluídos em água destilada) a temperatura ambiente, por um período aproximado de 50 dias com trocas semanais da solução. Passado o período de desmineralização as peças foram novamente radiografadas sendo constatada a desmineralização destas. As peças foram, então, lavadas e desidratadas com álcool 70° e álcool absoluto (LabSynth®, Diadema, Brasil) e diafanizadas em xilol (LabSynth®, Diadema, Brasil) infiltradas e incluídas em blocos de parafina + resina (Histosec, Merck®, Alemanha).

Os blocos com as maxilas incluídas foram submetidos a cortes transversais semisseriados de 4 µm de espessura que contemplava os alvéolos pós-exodontia dos molares superiores direitos e da região de molares superiores contralaterais preservados. Os cortes foram realizados com o auxílio de um micrótomo Jung RM 2045 (Leica®).

Para cada maxila foram confeccionadas 1 lâmina por dente/região do alvéolo, havendo no total 3 lâminas por maxila que continham 4 a 6 cortes por lâmina. Todas as lâminas foram coradas com H.E. Como os primeiro molares apresentavam um tamanho

mesio-distal médio de 2,8 mm, os segundos molares 1,8 mm e os terceiros molares 1,2 mm, os cortes foram realizados com intervalos de 400 μm , 300 μm e 200 μm , respectivamente. Desta forma as regiões mesiais, centrais e distais de cada dente foram abrangidas na análise microscópica. Os molares contra-laterais as regiões das exodontias foram utilizados como guias para os cortes.

O modo de preparo das peças e confecção das lâminas para avaliação microscópica segue os protocolos descritos por trabalhos prévios realizados pelo departamento de Estomatologia em conjunto com a Disciplina de Histologia do departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP (CARDOSO, 2009; POLETI, 2009).

3.6.1 Análise das lâminas

As imagens histológicas das regiões tanto dos alvéolos das áreas das exodontias dos molares quanto do lado contralateral da maxila foram capturadas utilizando o sistema análise digital composto pelo microscópio óptico Axioskop 2 (Carl Zeiss Light Microscope, GmbH, Gottingen, Alemanha) acoplado a uma câmera AxioCam HRc (Carl Zeiss Microimaging, GmbH, Gottingen, Alemanha) e analisadas com o auxílio do *software* AxioVision Rel. 4.8 Ink (Carl Zeiss Microimaging, GmbH, Gottingen, Alemanha) utilizando a objetiva de 40x e 100x de aumento.

Para a captura das imagens foi delimitada uma área específica que foi padronizada utilizando as medidas feitas no lado contralateral da maxila, sendo feita uma média do tamanho do alvéolo com dente da região do primeiro, segundo e terceiro molares. Foram utilizadas como referências para as medições o feixe vasculo-nervoso palatino, 500 μm acima da região mais apical das raízes e as porções mais lateral e cervical do rebordo ósseo alveolar, com isso definimos um ROI (region of interest) de 3800 μm de largura por 2500 μm de altura.

As imagens digitalizadas foram gravadas em formato TIFF, sendo realizada uma análise qualitativa descritiva e também uma análise quantitativa das variáveis: osteonecrose, espaços trabeculares, reação periosteal, osso total e presença de restos radiculares no sítio das exodontias com o auxílio do *software* Axio Vision Rel 4.8 Ink (Carl Zeiss).

As análises quantitativas das variáveis osteonecrose, espaços trabeculares, reação periosteal, osso total foram realizadas através da ferramenta *outline* a qual permitiu a

delimitação da área de cada uma das variáveis avaliadas expressando o resultado em μm^2 . A variável restos radiculares sequestro ósseo foram avaliadas quanto a sua presença ou ausência nos cortes estudados.

Figura 3.10 – (A, B e C) Cortes histológicos mostrando a realização da análise microscópica quantitativa através do ROI e a demarcação nas **Figuras B e C** das áreas a serem medidas. Em cor amarela está delimitada a área de reação periosteal, preto no menor aumento está demarcado o tecido ósseo e azul as áreas de espaço trabecular. **Figura C**: mostra a demarcação em maior aumento das áreas de osteonecrose e sequestro ósseo.

3.7 PREPARO PARA ANÁLISE MOLECULAR

As reações de cadeia de polimerase em tempo real foram realizadas conforme os protocolos descritos em trabalhos prévios realizados pelo Departamento de Estomatologia da FOB-USP em conjunto com o Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Histologia da FOB-USP. Estas reações já possuem protocolos concretizados nestes departamentos (CARDOSO, 2009; POLETI, 2009).

3.7.1 Extração do RNA (*RNeasy mini kit 250*)

Depois de realizada a eutanásia dos animais do estudo, as hemi-maxilas direita e esquerda de 6 animais de cada grupo foram limpas, removido todo tecido mole e armazenadas em tubos de microcentrífuga contendo 1 ml *RNAlater Stabilization Reagent* (Qiagen®, Alemanha) seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Estes foram agitados durante 30 segundos e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos, sendo congelados a -80°C no Centro Integrado em Pesquisas da FOB-USP (CIP).

Para a extração do RNA as hemi-maxilas foram trituradas em moinho criogênico 6770 *Freezer/Mill* (SPEX SamplePrep[®], Metuchen, NJ), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Qiagen[®], Alemanha), sendo o material triturado colocado de volta nos frascos de microcentrífuga com *RNAlater Stabilization Reagent* (Qiagen[®], Alemanha). Para a extração do RNA, 20-30 mg do material triturado das amostras foram logo colocados em tubos de microcentrífuga de 2 ml e misturados com 600 µl da solução de lise, preparada com 10 µl β-mercaptoetanol para cada 1 ml de solução de *Buffer* RLT (fornecido no RNeasy mini kit 250, Qiagen[®], Alemanha). Os tubos foram agitados em “vortex” por 30 segundos e centrifugados a 15.000 rpm por 3 min a temperatura ambiente.

A camada superior (sobrenadante) foi removida em alíquotas de 600 µl, que foram colocados em novos tubos de 2 ml. Nesses tubos foram adicionados 1 volume (600 µl) de etanol a 70% feito com água com DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase), sendo a solução misturada por pipetagem e não centrifugada.

A solução formada foi adicionada a coluna *RNeasy mini spin* (fornecida no RNeasy mini kit 250, Qiagen[®], Alemanha), que contém a membrana sílica-gel, em alíquotas de 700 µl, sendo centrifugadas por 15 segundos a 14000 rpm em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e o passo repetido até que a solução do tubo de microcentrífuga de 2 ml acabe.

Em seguida foi adicionado a coluna 700 µl de solução de lavagem *Buffer* RW1 (fornecido no RNeasy mini kit 250, Qiagen[®], Alemanha) e esta foi submetida a nova centrifugação a 14000 rpm em temperatura ambiente por 15 segundos, sendo o filtrado descartado. Foram então adicionados 500 µl de outro tampão de lavagem *Buffer* RPE (fornecido no RNeasy mini kit 250, Qiagen[®], Alemanha), sendo a coluna novamente centrifugada a 14000 rpm em temperatura ambiente por 15 segundos. Após descartado o filtrado foram adicionados mais 500 µl tampão de lavagem *Buffer* RPE (fornecido no RNeasy mini kit 250, Qiagen[®], Alemanha) e a coluna centrifugada a 14000 rpm em temperatura ambiente por 2 minutos.

Terminadas as lavagens a coluna foi colocada em novo tubo para microcentrífuga de 2 ml e foi submetida a centrifugação a 15000 rpm em temperatura ambiente por 1 minuto.

A coluna foi então colocada em um tubo para microcentrífuga de 1,5 ml sendo adicionados 30 µl de água *RNase-free* (fornecido no RNeasy mini kit 250, Qiagen[®], Alemanha) diretamente sobre a membrana sílica-gel, sendo aguardados 3 minutos para que a membrana fosse umidificada, sendo então centrifugadas a 14000 rpm em temperatura

ambiente por 1 minuto. Os tubos de microcentrifuga de 1,5 ml com o RNA extraído foram armazenados congelados a -80°C no Centro Integrado em Pesquisas da FOB-USP (CIP).

3.7.2 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido, igual a 0,25) e leitura da absorbância de 2 µl da amostra em um espectrofotômetro *Nanodrop*[®] *ND-1000* (Thermo Scientific[®], USA) no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}) e 280 nm (A_{280}). A fórmula para calcular a concentração de RNA total foi a seguinte: (RNA) = $A_{260} \times 40 \times$ fator de diluição conhecido, sendo o resultado expresso em µg/mL. A relação A_{260}/A_{280} foi calculada, sendo considerada aceitável entre 1,9 e 2,1, indicando ausência de DNA nas amostras.

3.7.3 Transcrição reversa do RNA em cDNA

O RNA extraído das amostras foram submetidas a transcrição reversa em cDNA com o kit *Quantitect Reverse Transcription*[®] (Qiagen[®], Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de RNA total utilizado de cada amostra foi calculado com base o volume máximo recomendado pelo fabricante (12 µl) multiplicado pela concentração de RNA da amostra, sendo estabelecido como quantidade mínima 240 ng de RNA total. Inicialmente para evitar a possibilidade de contaminação das amostras estas foram incubadas com 2 µl de *gDNA wipeout* (fornecido no kit *Quantitect Reverse Transcription*[®], Qiagen[®], Alemanha), fazendo um volume total de 14 µl, durante 2 minutos a 42°C e sendo colocado imediatamente no gelo após os 2 minutos.

Em seguida foi adicionado, ao RNA tratado com *gDNA wipeout* (fornecido no kit *Quantitect Reverse Transcription*[®], Qiagen[®], Alemanha), uma mistura preparada com 1 µL iniciadores (*primers*) randômicos e oligo dT dissolvidos em água (RT Primer Mix), 1 µL da enzima transcriptase reversa (*Quantscrip Reverse Transcriptase*) e 4 µL do tampão *Quantscript RT* (fornecidos no kit *Quantitect Reverse Transcription*[®], Qiagen[®], Alemanha), totalizando um volume total de 20 µL. Após realizada a mistura, esta foi incubada à 42°C por 30 minutos, seguido de outra incubação à 95°C por 3 minutos. As placas confeccionadas com

as amostras foram armazenadas a -20°C no Laboratório do Departamento de Farmacologia da FOB-USP. Todo experimento foi realizado de acordo com o recomendado pelo fabricante (Qiagen[®], Alemanha).

3.7.4 Reações em cadeia da polimerase em tempo real (*RealTimePCR*)

A quantificação da expressão de RNAm de fatores integrantes do reparo ósseo alveolar RANK, RANKL, OPG e VEGF foi realizada através de reações de PCR em tempo real (*RealTimePCR*) em um aparelho *ViiATM 7* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), sendo utilizado o sistema *TaqMan[®]* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Para a quantificação da expressão gênica dos alvos foram utilizados iniciadores (*primers*) *TaqMan[®]* fabricados pela empresa (Applied Biosystems, Foster City, EUA) para cada uma das reações de amplificação conforme Figura 3.11.

Os iniciadores (*primers*) foram misturados ao DNA complementar sintetizado a partir do RNAm juntamente com reagentes *TaqMan[®] Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), como determinado pelo fabricante. As amostras foram, então, submetidas à reação de amplificação que compreende 2 minutos 50°C , 10 minutos a 95°C , 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C .

Esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (*ViiA 7 Software* versão 1.1) por meio de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles.

Alvos (Primers)	Número de Catálogo (Applied Biosystems, Foster City, EUA)
<i>β-actina</i>	RN00667869_M1
<i>RANK</i>	RN01426423_M1
<i>RANKL</i>	RN00589289_M1
<i>OPG</i> (<i>TNFRsf11b</i>) <i>TNF receptor membro 11b</i>	RN00563499_M1
<i>VEGF</i>	RN01511601_M1

Figura 3.11 - Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa.

Para todas as reações de *RealTimePCR*, foram utilizados 13 µl do reagente *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 5 µl da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 6 µl de água MiliQ tratada com DEPC, e 1 µl da solução contendo o par de iniciadores (concentração final igual a 0,2 uM). Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados. E todas as amostras foram submetidas a reações para detecção de RNAm para β -actina, que é um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação.

Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação atinge um dado limiar durante a fase de amplificação exponencial da PCR que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado em relação ao nível de expressão de um gene constitutivo. A especificidade das reações será confirmada pela curva de dissociação (Tm).

As reações de *RealTimePCR* foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, da disciplina de Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP (equipamentos financiados pela FAPESP, processos 2006/00534-1, 2008/03047-0 e 2009/53848-1), sob co-orientação do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação dos resultados da análise molecular para OPG, RANK, RANKL e VEGF foi realizada a média dos resultados do lado direito e esquerdo de um mesmo animal dos grupos CO e AZ. Já nos grupos CO-C e AZ-C o lado direito, onde houve exodontia dos molares, ficou denominado CO-C exo no grupo CO-C e AZ-C exo no grupo AZ-C. O lado esquerdo que mantinha os molares ficou denominado CO-C dente no grupo CO-C e AZ-C dente no grupo AZ-C. No estudo molecular teremos 6 regiões (grupos) distintos a serem estudados, CO, AZ, CO-C dente, AZ-C dente, CO-C exo e AZ-C exo, apesar de 2 grupos serem somente o lado diferente do mesmo rato. A denominação CO-C exo e AZ-C exo também foi utilizada na análise microscópica com o intuito de facilitar a compreensão da qual região está sendo avaliada.

Os resultados da avaliação macroscópica da presença e ausência de solução de continuidade, assim como a análise microscópica da presença e ausência de osteonecrose e de

restos radiculares, nas regiões dos alvéolos dentários após exodontia dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C, foram submetidos ao teste do exato de Fischer.

Os resultados encontrados na análise microscópica quantitativa das variáveis osteonecrose, espaço trabecular, reação periosteal e osso total, e molecular das variáveis OPG, RANK, RANKL e VEGF foram inicialmente submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS). No caso da análise microscópica entre os grupos CO-C exo e AZ-C exo, caso as variáveis apresentassem uma distribuição normal foi aplicado o teste “t” de Student não pareado e o teste de Mann-Whitney quando a distribuição não fosse normal.

Na análise molecular caso as variáveis apresentassem uma distribuição normal foi aplicado o teste de Análise de variância (ANOVA) a um critério seguido do pós-teste de Tukey. No caso das variáveis que não apresentaram uma distribuição normal foi aplicado o teste Kruskal-Wallis (KW) seguido do pós-teste de Dunn. Quando da comparação entre 2 grupos na análise molecular caso as variáveis apresentassem uma distribuição normal foi aplicado o teste “t” de Student não pareado e o teste de Mann-Whitney quando a distribuição não fosse normal, e entre os grupos CO-C dente e CO-C exo, e entre os grupos AZ-C dente e AZ-C exo foi utilizado o teste “t” de Student pareado.

Os testes foram executados pelo software GraphPad InStat e GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego, CA), adotando o nível de significância de 5% ($p < 0,005$) para todos os estudos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação clínica da boca dos animais do estudo, nos dias de aplicações das medicações, no dia das exodontias e no dia da eutanásia não mostrou a presença de lesões espontâneas em nenhum dos grupos estudados. Já a avaliação das regiões de exodontias dos molares superiores no dia da eutanásia mostrou uma maior incidência de solução de continuidade da mucosa oral nos animais do grupo AZ-C (91,66%) em comparação com o grupo CO-C (41,66%, Figuras 4.1, 4.2). Por meio do teste exato de Fischer, ao nível de significância de 5%, foi observado que a diferença da presença/ausência de solução de continuidade foi estatisticamente significativa ($p=0,0272$, Tabela 4.1). As áreas de solução de continuidade clinicamente apresentavam dimensões menores no grupo CO-C, sendo mais pontuais, aparentando estar nas regiões de restos radiculares. Diferente das encontradas no grupo AZ-C que apresentavam maiores dimensões com áreas maiores de exposição do tecido osso do rebordo alveolar maxilar das regiões das exodontias dos molares (Figura 4.2).

Figura 4.1 - Gráfico mostrando a incidência de presença/ausência de solução de continuidade da mucosa oral entre os grupos CO-C e AZ-C nas regiões das exodontias dos molares superiores.

Figura 4.2 - Maxilas coletadas de ratos mostrando o alvéolo reparado (AR) do rato do grupo CO-C (A) sem solução de continuidade e a solução de continuidade da mucosa oral do rato do grupo AZ-C (B) com área de exposição óssea (EO) nas regiões das exodontias dos molares.

Tabela 4.1 - Distribuição da presença/ausência de solução de continuidade da mucosa oral no lado das exodontias nos grupos CO-C e AZ-C ao exame macroscópico.

	Solução de continuidade			
	Presente		Ausente	
	n	%	n	%
CO-C exo	5	41,66	7	58,34
AZ-C exo	11	91,66	1	8,34

Teste exato de Fischer: $p=0,0272$

4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA

A avaliação microscópica foi iniciada com uma análise qualitativa das lâminas com finalidade de conhecer a morfologia dos alvéolos dentários dos animais estudados e analisar as estruturas presentes nas regiões das exodontias dos molares superiores.

A análise qualitativa das maxilas dos animais nas regiões dos dentes não mostrou alterações dignas de nota entre os grupos estudados CO, AZ, CO-C e AZ-C. Na região das exodontias dos molares superiores no grupo CO-C a maioria dos animais apresentava reparo ósseo com formação de tecido ósseo maduro. Todos os animais do grupo CO-C quanto do grupo AZ-C avaliadas apresentavam restos radiculares em pelo menos uma região estudada, que quando presentes, possuíam um infiltrado inflamatório (IF) geralmente circundando os restos radiculares (RR). Quando as regiões das exodontias apresentavam solução de continuidade (SOC) do epitélio da mucosa oral no grupo CO-C estas, em grande parte, eram

pontuais e estavam relacionadas com a presença dos restos radiculares (RR). Já no grupo AZ-C as soluções de continuidade (SOC) eram extensas e estavam relacionadas com a presença de restos radiculares ou com sequestros ósseos (SO), que foram frequentes neste grupo. Estas características estão relacionadas com os achados na avaliação macroscópica, que observou presença de solução de continuidade maiores no grupo AZ-C.

Os alvéolos das regiões das exodontias do grupo CO-C, em sua maioria, apresentaram remodelação das cristas ósseas e dos septos interradiculares (SR), com a perda óssea em altura do rebordo alveolar. Já no grupo AZ-C pode ser observada uma diminuição da perda da altura do rebordo alveolar, principalmente devido a uma diminuição da reabsorção das cristas alveolares e dos septos interradiculares (SR). Em alguns casos houve a formação de sequestro ósseo das regiões de septos interradiculares (SR) e das cristas ósseas alveolares.

Áreas de osteonecrose e de sequestro ósseo foram encontradas com mais frequência no grupo AZ-C em comparação com o grupo CO-C, sendo, também, maiores em extensão no grupo AZ-C.

Nas regiões dos alvéolos das exodontias dos molares foi observada a formação de uma reação periosteal (RP) na cortical óssea vestibular (*) nos animais do grupo CO-C e AZ-C. Na análise qualitativa as reações periosteais aparentavam ser de maior intensidade no grupo CO-C em comparação com as do grupo AZ-C, sendo que em muitas regiões do grupo AZ-C esta não estava presente.

Foram escolhidas e fotografadas algumas áreas das regiões dos 1º, 2º e 3º molares que fossem representativas das características encontradas na análise qualitativa (Figura 4.3). As estruturas representadas foram identificadas como: solução de continuidade (**SOC**), tecido ósseo (**TO**), osteonecrose (**ON**), sequestro ósseo (**SO**), infiltrado inflamatório (**IF**), cortical óssea vestibular (*), reação periosteal (**RP**), resto radicular (**RR**) e feixe vasculo-nervoso palatino (**VN**).

4.2.1 Imagens dos alvéolos dos 1º molares

Figura 4.3 - Imagens dos cortes histológicos da região dos alvéolos de áreas de exodontias de 1º molar de ratos do grupo CO-C mostrando a remodelação óssea com reabsorção das cristas alveolares e dos septos interradiculares com perda óssea em altura do rebordo alveolar. Também pode ser observado restos radiculares (RR) nas Figuras A, C e D, tecido ósseo (TO) no interior dos alvéolos e áreas de infiltrado inflamatório (IF), principalmente circundando as regiões dos restos radiculares (RR). Na Figura D pode ser visto restos radiculares (RR) com solução de continuidade (SOC) do epitélio da cavidade oral. Todas as figuras mostram a cortical óssea vestibular (*) dos rebordos alveolares com reação periosteal (RP). H.E., 40x.

Figura 4.4 - Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial (A) e central (B) da região da exodontia do 1º molar do mesmo animal do grupo AZ-C mostrando cobertura do alvéolo pelo epitélio mucosa oral, presença de resto radicular (RR), remodelação das cristas óssea com menor perda de altura do rebordo alveolar comparado a do grupo CO-C. O interior do alvéolo apresenta formação de tecido ósseo (TO), e na Figura B pode ser observada um maior infiltrado inflamatório entre o epitélio oral e o alvéolo, próximo a região do resto radicular (RR). A cortical óssea vestibular (*) nestes cortes está mais difícil de ser diferenciada, também havendo a formação de reação periosteal (RP). H.E., 40x.

Figura 4.5 - Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial (A), central (B) e distal (C) da região da exodontia do 1º molar do mesmo animal do grupo AZ-C mostrando um reparo ósseo do alvéolo não homogêneo, com presença de áreas de osteonecrose (ON), sequestros ósseos (SO), restos radiculares (RR) com infiltrado inflamatório (IF) permeando o alvéolo e circundando os restos radiculares. **Figura C** mostra solução de continuidade (SOC) do epitélio oral com sequestro ósseo (SO) abaixo desta região. **Figura D** mostra restos radiculares (RR) com solução de continuidade (SOC) do epitélio oral sobre esses e presença de sequestro ósseo (SO) formado pelo septo interradicular (SR). Todas as figuras mostram a cortical óssea (*) com reação periosteal (RP) de aparente menor intensidade quando comparado ao grupo CO-C. HE., 40x.

4.2.2 Imagens dos alvéolos dos 2º molares

Figura 4.6 - Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial (A) e distal (B) das regiões da exodontia do 2º molar dos ratos do grupo CO-C mostrando alvéolos cobertos por epitélio da mucosa oral, apresentam remodelação do alvéolo com reabsorção das cristas alveolares e dos septos interradiculares com perda de altura óssea do rebordo alveolar. **Figura A:** mostra cortical óssea vestibular (*) com reação periosteal (RP) e resto radicular (RR) na região próxima ao epitélio oral circundado por infiltrado inflamatório. **Figura B:** mostra reparo ósseo do alvéolo com perda óssea em altura do rebordo alveolar e discreta reação periosteal (RP) na cortical óssea (*) vestibular. H.E., 40x.

Figura 4.7 - Imagens dos cortes histológicos das regiões da exodontia do 2º molar de ratos do grupo AZ-C. **Figura A:** mostra epitélio da mucosa oral íntegro e recobrindo todo o alvéolo que apresenta reparo com tecido ósseo (TO) no seu interior e restos radiculares (RR) com discreto infiltrado inflamatório (IF) ao redor. Pode ser observado a manutenção da altura do rebordo alveolar e cortical óssea (*) não apresentando reação periosteal (RP). **Figura B:** mostra resto radicular (RR) com infiltrado inflamatório ao redor com solução de continuidade (SOC) do epitélio oral sobre estes. No interior o alvéolo pode ser visto reparo da região com pouca formação de tecido ósseo (TO), com formação de áreas de osteonecrose (ON) e de sequestro ósseo (SO). **Figura C e D:** mostram uma deficiência no reparo alveolar com áreas de osteonecrose (ON), sequestro ósseo (SO) e infiltrado inflamatório (IF), havendo a presença de solução de continuidade (SOC) no epitélio da mucosa oral nas regiões. Cortical óssea (*) vestibular com discreta reação periosteal (RP). H.E., 40x.

Figura 4.8 - Imagens dos cortes histológicos das regiões dos alvéolos da exodontia do 3º molar de ratos do grupo CO-C (A e B) e AZ-C (C e D). **Figura A:** mostra epitélio da mucosa oral íntegro e recobrindo todo o alvéolo que apresenta reparo com tecido ósseo (TO) com perda de altura do rebordo alveolar, com cortical óssea vestibular (*) apresentando reação periosteal (RP). **Figura B:** alvéolo com reparo ósseo alterado com presença de resto radicular (RR) circundado por infiltrado inflamatório e presença de solução de continuidade (SOC) do epitélio da mucosa oral. Cortical óssea vestibular (*) não apresentando reação periosteal (RP). **Figura C:** apresenta alvéolo com reparo por tecido ósseo (TO) com menor perda da altura do rebordo alveolar em comparação com grupo CO-C. Apresenta cortical óssea vestibular (*) sem reação periosteal (RP). **Figura D:** região com reparo ósseo alterado, apresentando restos radiculares (RR) circundados por infiltrado inflamatório (IF). Também apresenta áreas de sequestro ósseo (SO) e osteonecrose (ON). Cortical óssea vestibular (*) reação periosteal (RP) discreta. H.E., 40x.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA

Na análise microscópica das áreas dos alvéolos onde foram realizadas as exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C, denominadas CO-C exo e AZ-C exo, foi realizada avaliação quanto à frequência (presença/ausência) de sequestro ósseo e restos radiculares. Foram consideradas áreas de sequestro ósseo áreas de tecido ósseo que apresentaram lacunas de osteócito vazias e que não tivessem ligação com o tecido ósseo vital adjacente. Todos os animais tanto do grupo CO-C (100%) quanto do grupo AZ-C (100%) apresentavam restos radiculares nos alvéolos dentários pós-exodontia. Os sequestros ósseos estavam presentes em todos os animais do grupo AZ-C (100%) e em nenhum animal do grupo CO-C (0%) nas regiões das exodontias dos molares superiores (Tabela 4.2). O teste exato de

Fischer, ao nível de significância de 5% demonstrou diferença estatística, com o grupo AZ-C associado a presença de sequestros ósseos ($p=0,0022$).

Tabela 4.2 - Frequência da presença/ausência de sequestro ósseo e restos radiculares na região dos alvéolos nas áreas das exodontias dos molares superiores nos grupos CO-C e AZ-C.

GRUPO	Sequestro Ósseo *				Resto Radicular			
	Presente		Ausente		Presente		Ausente	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CO-C exo	0	0	6*	100	6	100	0	0
AZ-C exo	6*	100	0	0	6	100	0	0

(*) Teste exato de Fischer: $p=0,0022$.

As regiões dos alvéolos dentários das exodontias dos molares superiores nos grupos CO-C e AZ-C, regiões denominadas CO-C exo e AZ-C exo, foram analisadas quantitativamente para área de osteonecrose, área do espaço de osso trabecular, área da reação periosteal e área de osso total dos alvéolos. Foram consideradas áreas de osteonecrose regiões do tecido ósseo no alvéolo que apresentassem as lacunas de osteócitos vazias como descrito por Hokugo et al. (2010). As áreas dessas 4 variáveis foram quantificadas em 3 cortes escolhidos por dente que abrangiam região mesial, central e distal de cada dente, sendo feita a média dos resultados que foi utilizada para a análise estatística. Os resultados da média, desvio padrão (DP) e mediana estão apresentados nas Tabelas 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 e Figura 4.9. Os dados foram analisados estatisticamente para cada variável estudada entre os grupos, sendo comparados os resultados tanto das regiões separadas de cada dente quanto da área total. Inicialmente submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, sendo aplicado o teste “t” de student não pareado quando as amostras apresentavam distribuição normal e o teste de Mann-Whitney quando a distribuição das amostras não foi normal. Em todos os testes estatísticos foi adotado o nível de significância de 5% ($p<0,005$).

Tabela 4.3 - Média, DP e mediana das áreas em μm^2 de **osteonecrose** nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$.

OSTEONECROSE							
	CO-C exo			AZ-C exo			p
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
1º Molar	29.912	30.966	16.423	591.278	510.310	370.082	0,0227*
2º Molar	41.538	99.263	1.130	329.251	220.056	301.911	0,02[#]
3º Molar	3.442	3.913	1.522	76.599	71.860	61.272	0,0542 [#]
Total (1º+2º+3º)	74.891	130.367	23.472	997.129	528.968	1.065.602,54	0,0043[#]

DP = Desvio padrão; (*) = Teste “t” não pareado; (#) = Teste de Mann-Whitney.

Tabela 4.4 - Média, DP e mediana das áreas em μm^2 do **espaço trabecular** nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$.

ESPAÇO TRABECULAR							
	CO-C exo			AZ-C exo			p
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
1º Molar	357.747	105.486	377.998	358.107	91.223	389.967	0,9951*
2º Molar	307.888	175.638	251.258	326.689	124.751	295.129	0,8182 [#]
3º Molar	135.241	39.948	127.944	214.626	69.430	213.128	0,0356*
Total (1º+2º+3º)	800.876	172.732	805.135	899.421	210.173	890.817	0,3958*

DP = Desvio padrão; (*) = Teste “t” não pareado; (#) = Teste de Mann-Whitney.

Tabela 4.5 - Média, DP e mediana das áreas em μm^2 da **reação periosteal** nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$.

REAÇÃO PERIOSTEAL							
	CO-C exo			AZ-C exo			p
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
1º Molar	962.373	462.730	1.099.852,5	824.093	203.061	799.966	0,5178*
2º Molar	692.670	391.764	790.108	477.856	279.818	496.726	0,3*
3º Molar	245.226	122.981	220.002	299.075	193.034	290.827	0,5772*
Total (1º+2º+3º)	1.900.270,04	942.775	2.101.381,66	1.601.023,45	623.847	1.532.900,72	0,5313*

DP = Desvio padrão; (*) = Teste “t” não pareado.

Tabela 4.6 - Média, DP e mediana das áreas em μm^2 do **osso total** nas lâminas coradas por H.E. dos alvéolos das regiões das exodontias dos molares superiores dos grupos CO-C e AZ-C. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$.

OSSO TOTAL							
	CO-C exo			AZ-C exo			p
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
1º Molar	5.050.054,5	886.786	5.290.447	10.751.833,17	9.008.780,82	6.336.749	0,1797 [#]
2º Molar	3.417.270,83	695.768	3.389.270	4.237.309,67	937.997	4.090.310,5	0,1162*
3º Molar	2.166.191,5	316.648	2.118.962	3.460.826,33	525.255	3.453.611,5	0,0004*
Total (1º+2º+3º)	10.633.516,24	1.717.130,28	11.100.442,22	18.449.968,8	9.642.178,46	14.706.026,57	0,0791*

DP = Desvio padrão; (*) = Teste “t” não pareado; (#) = Teste de Mann-Whitney.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR

A expressão quantitativa do RNAm da OPG, RANK, RANKL, VEGF foi realizada através de reações de *RealTimePCR*, utilizando-se o sistema *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um aparelho *ViiA*[™] 7 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão do RNAm de OPG, RANK, RANKL e VEGF na comparação entre todos os grupos estudados. Nas tabelas abaixo são mostradas as médias, desvio padrão (DP) e mediana de cada grupo, assim como, os resultados das análises estatísticas realizadas nas comparações entre os grupos.

4.4.1 Variável Osteoprotegerina (OPG)

Tabela 4.7 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de OPG nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO	35,59	2,099	35,83	AZ	35,90	2,228	35,82	p=0,8311*
CO-C dente	35,31	1,745	35,52	CO-C exo	35,67	2,012	36,60	p=0,7584 [#]
AZ	35,90	2,228	35,82	CO	35,59	2,099	35,83	p=0,8311*
AZ-C dente	32,84	3,903	33,74	AZ-C exo	35,34	3,072	36,69	p=0,2473 [#]
Dif. grupos	F=1,463 p=0,2600				F=0,04527 p=0,9868			

F = ANOVA; DP = Desvio Padrão; * = Teste “t” de Student não pareado; # = Teste “t” Student pareado.

Tabela 4.8 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de OPG nos vários grupos.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO-C dente	35,31	1,745	35,52	AZ-C exo	35,34	3,072	36,69	p=0,9855*
AZ-C dente	32,84	3,903	33,74	CO-C exo	35,67	2,012	36,60	p=0,1538*
Dif. grupos	p=0,1931*				p=0,8313*			

* = Teste “t” de Student não pareado.

Tabela 4.9 - Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Tukey para OPG.

Grupos	Diferença das médias	q	p<0,05
CO vs AZ	-0,3055	0,2595	Não
CO vs CO-C dente	0,2787	0,2647	Não
CO vs AZ-C dente	2,756	2,496	Não
AZ vs CO-C dente	0,5841	0,4962	Não
AZ vs AZ-C dente	3,062	2,503	Não
CO-C dente vs AZ-C dente	2,478	2,244	Não

Tabela 4.10 - Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Tukey para OPG.

Grupos	Diferença das médias	q	p<0,05
CO vs AZ	-0,3055	0,2780	Não
CO vs CO-C exo	-0,07598	0,07731	Não
CO vs AZ-C exo	0,2518	0,2562	Não
AZ vs CO-C exo	0,2295	0,2089	Não
AZ vs AZ-C exo	0,5573	0,5072	Não
CO-C exo vs AZ-C exo	0,3278	0,3335	Não

4.4.2 Variável receptor ativador do NF- κ B (RANK)

Tabela 4.11 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANK nos vários grupos.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO	35,65	1,238	36,46	AZ	35,77	2,041	36,08	p=0,9186*
CO-C dente	35,52	1,487	34,93	CO-C exo	35,71	1,869	35,45	p=0,8595 [#]
AZ	35,77	2,041	36,08	CO	35,65	1,238	36,46	p=0,9186*
AZ-C dente	32,22	4,520	30,04	AZ-C exo	35,58	3,969	35,91	p=0,4563 [#]
Dif. grupos	F=1,838 p=0,19				F=0,004774 p=0,9995			

F = ANOVA; DP = Desvio Padrão; * = Teste “t” de student não pareado; # = Teste “t” student pareado.

Tabela 4.12 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANK nos vários grupos.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO-C dente	35,52	1,487	34,93	AZ-C exo	35,58	3,969	35,91	p=0,9742*
AZ-C dente	32,22	4,520	30,04	CO-C exo	35,71	1,869	35,45	p=0,1647*
Dif. grupos	p=0,168*				p=0,9471*			

* = Teste “t” de student não pareado.

Tabela 4.13 - Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Tukey para RANK.

Grupos	Diferença das médias	q	p<0,05
CO vs AZ	-0,1160	0,1066	Não
CO vs CO-C dente	0,1376	0,1342	Não
CO vs AZ-C dente	3,433	2,899	Não
AZ vs CO-C dente	0,2535	0,2331	Não
AZ vs AZ-C dente	3,549	2,866	Não
CO-C dente vs AZ-C dente	3,295	2,783	Não

Tabela 4.14 - Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Tukey para RANK.

Grupos	Diferença das médias	q	p<0,05
CO vs AZ	-0,1160	0,09682	Não
CO vs CO-C exo	-0,06016	0,05328	Não
CO vs AZ-C exo	0,07427	0,06577	Não
AZ vs CO-C exo	0,05579	0,04658	Não
AZ vs AZ-C exo	0,1902	0,1588	Não
CO-C exo vs AZ-C exo	0,1344	0,1190	Não

4.4.3 Variável ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANKL)

Tabela 4.15 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANKL nos vários grupos.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO	36,37	0,6164	36,70	AZ	35,52	1,683	35,53	p=0,7922*
CO-C dente	35,89	1,114	35,69	CO-C exo	35,83	1,872	35,73	p=0,9551 [#]
AZ	35,52	1,683	35,53	CO	36,37	0,6164	36,70	p=0,7922*
AZ-C dente	34,26	4,160	35,46	AZ-C exo	34,61	3,184	35,36	p=0,8438 ⁺
Dif. grupos	KW= 0,8814 p=0,8299				KW= 1,483 p= 0,6862			

KW = Kruskal-Wallis; DP = Desvio Padrão; * = Teste Mann-Whitney; [#] = Teste “t” student pareado; + = Wilcoxon.

Tabela 4.16 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANKL nos vários grupos.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO-C dente	35,89	1,114	35,69	AZ-C exo	34,61	3,184	35,36	p=0,7922 [#]
AZ-C dente	34,26	4,160	35,46	CO-C exo	35,83	1,872	35,73	p=0,4588*
Dif. grupos	p=0,4209*				p=0,7922 [#]			

* = Teste “t” de student não pareado; [#] = Teste Mann-Whitney.

Tabela 4.17 - Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Dunn para RANKL.

Grupos	Diferença das médias	p<0,05
CO vs AZ	2,100	Não
CO vs CO-C dente	2,700	Não
CO vs AZ-C dente	3,333	Não
AZ vs CO-C dente	0,6000	Não
AZ vs AZ-C dente	1,233	Não
CO-C dente vs AZ-C dente	0,6333	Não

Tabela 4.18 - Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Dunn para RANKL.

Grupos	Diferença das médias	p<0,05
CO vs AZ	2,467	Não
CO vs CO-C exo	1,667	Não
CO vs AZ-C exo	4,500	Não
AZ vs CO-C exo	-0,8000	Não
AZ vs AZ-C exo	2,033	Não
CO-C exo vs AZ-C exo	2,833	Não

4.4.4 Variável fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Tabela 4.19 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de VEGF nos vários grupos.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO	33,46	2,447	34,18	AZ	33,59	2,081	34,01	p=0,925*
CO-C dente	34,64	3,081	35,47	CO-C exo	34,95	1,629	34,85	p=0,8478 [#]
AZ	33,59	2,081	34,01	CO	33,46	2,447	34,18	p=0,925*
AZ-C dente	32,05	4,356	32,72	AZ-C exo	33,06	3,670	33,38	p=0,4717 [#]
Dif. grupos	F=0,7001 p=0,5630				F=0,6126 p=0,6147			

F = ANOVA; DP = Desvio Padrão; * = Teste “t” de student não pareado; # = Teste “t” student pareado.

Tabela 4.20 - Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de VEGF nos vários grupos.

	Média	DP	Mediana		Média	DP	Mediana	Dif. grupos
CO-C dente	34,64	3,081	35,47	AZ-C exo	33,06	3,670	33,38	p=0,4367*
AZ-C dente	32,05	4,356	32,72	CO-C exo	34,95	1,629	34,85	p=0,1583*
Dif. grupos	p=0,2617*				p=0,276*			

* = Teste “t” de student não pareado.

Tabela 4.21 - Diferença entre os grupos CO, CO-C dente, AZ e AZ-C dente pelo pós-teste de Tukey para VEGF.

Grupos	Diferença das médias	q	p<0,05
CO vs AZ	-0,1266	0,09961	Não
CO vs CO-C dente	-1,186	0,9331	Não
CO vs AZ-C dente	1,405	1,105	Não
AZ vs CO-C dente	-1,060	0,8335	Não
AZ vs AZ-C dente	1,531	1,205	Não
CO-C dente vs AZ-C dente	2,591	2,038	Não

Tabela 4.22 - Diferença entre os grupos CO, CO-C exo, AZ e AZ-C exo pelo pós-teste de Tukey para VEGF.

Grupos	Diferença das médias	q	p<0,05
CO vs AZ	-0,1266	0,1206	Não
CO vs CO-C exo	-1,490	1,420	Não
CO vs AZ-C exo	0,3987	0,3799	Não
AZ vs CO-C exo	-1,363	1,299	Não
AZ vs AZ-C exo	0,5254	0,5006	Não
CO-C exo vs AZ-C exo	1,889	1,800	Não

Figura 4.10 - Expressão de marcadores ósseos e vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras dos maxilares dos animais dos grupos CO lado esquerdo e direito, AZ lado esquerdo e direito, CO-C tanto do lado esquerdo sem exodontia (CO-C dente) quanto do lado direito, das exodontias (CO-C exo), e do grupo AZ-C tanto do lado esquerdo sem exodontia (AZ-C dente) quanto do lado direito, das exodontias (AZ-C exo), foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de OPG, RANK, RANKL e VEGF foram analisados através de *RealTimePCR*. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da β -actina obtidos de 6 animais de cada grupo.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A OMAB é uma complicação grave que pode acometer pacientes em terapia com BFs. No presente estudo avaliamos através das análises macroscópica, microscópica e molecular o reparo ósseo alveolar após exodontia dos molares superiores em um modelo de osteonecrose dos maxilares induzido pela terapia com AZ em ratos Wistar. Este modelo foi descrito por Maahs et al. (2011) e relata o desenvolvimento de lesões clínicas e histológicas em 100% e 80% dos animais, respectivamente.

Em nosso estudo tivemos a presença das lesões clínicas na região das exodontias, caracterizadas como solução de continuidade da mucosa alveolar, em 91,66% dos animais do grupo em terapia com AZ, que apesar de um pouco abaixo dos 100% encontrados por Maahs et al. (2011), mostra que o modelo descrito foi efetivo no desenvolvimento de lesões do tipo OMAB.

No grupo controle (CO-C) foi observado soluções de continuidade em 41,66% dos animais contrastando com os 10% encontrados por Maahs et al. (2011). Esta variação pode ser explicada devido a experiência dos pesquisadores do presente estudo para extração, que pode ter acarretado em um maior trauma e maior número de fraturas radiculares durante as extrações.

Na avaliação macroscópica pode ser observado que as lesões de solução de continuidade da mucosa oral nos animais controle (CO-C), eram em sua maioria pontuais e quando comparadas com os achados histológicos, estavam relacionadas, em grande parte, com áreas de presença de restos radiculares. Já as áreas de solução de continuidade no grupo em terapia (AZ-C) apresentavam áreas maiores de solução de continuidade com grande áreas de exposição do tecido ósseo. Quando comparadas com os achados histológicos estavam relacionadas mais com áreas de osteonecrose e/ou sequestro ósseo. Esta são características não descritas por Maahs et al. (2011), porém é descrito por outros trabalhos que avaliaram os efeitos dos BFs sobre o reparo ósseo de alvéolos dentários em ratos (BIASOTTO et al., 2010; HOKUGO et al., 2010).

Como constatado por Maahs et al. (2011) em nosso estudo também não foram observadas formação de lesões espontâneas na boca em nenhum dos grupos estudados, mostrando que as extrações dentárias são fatores importantes no desenvolvimento das lesões de OMAB.

Estudos prévios mostraram que o reparo ósseo dos alvéolos de ratos apresenta período de proliferação celular e formação óssea com total cobertura dos alvéolos com epitélio da mucosa oral em até 30 dias após as extrações com completo preenchimento por osso lamelar após 60 dias (PIETROKOVSKI, 1967; PIETROKOVSKI; MASSLER, 1967; DE CARVALHO; OKAMOTO; DE CARVALHO, 1982; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1985). Como em nosso estudo a eutanásia dos animais foi realizada 105 dias após as extrações dos molares superiores seria esperado um completo reparo dos alvéolos com formação de tecido ósseo maduro e recobertos por epitélio da mucosa oral.

Na análise qualitativa dos cortes histológicos pudemos observar que nos animais do grupo CO-C ocorreu o reparo ósseo normal com reabsorção das cristas ósseas e septos inter-radulares, com perda de altura do alvéolo dentário e formação de tecido ósseo maduro no interior do alvéolo, sendo este na grande parte dos animais recoberto por epitélio da mucosa oral. Em alguns animais quando havia a presença de restos radiculares estes não causaram grandes alterações no reparo dos alvéolos, havendo na maioria dos casos um discreto infiltrado inflamatório ao redor dos restos radiculares. Em poucos casos nos animais dos grupos CO-C pode ser observada uma alteração importante do reparo ósseo com infiltrado inflamatório intensos e atraso no reparo ósseo.

Já no grupo AZ-C a maioria dos animais apresentou atraso no reparo ósseo dos alvéolos, com formação de áreas de osteonecrose e sequestro ósseo. Em grande parte das lâminas analisadas tanto os sequestros ósseos quanto os restos radiculares estavam circunscritos por um infiltrado inflamatório mais intenso, quando comparado com os animais do grupo CO-C. Os alvéolos dos animais do grupo AZ-C apresentavam perda menor em altura e volume da área total em comparação com o ocorrido no grupo CO-C, com uma diminuição da reabsorção das cristas alveolares e dos septos inter-radulares, com a formação de sequestros ósseos em grande parte nestas regiões. Este achado também foi encontrado por Hokugo et al. (2010), que relata sequestro ósseo com características preservadas da estrutura alveolar, indicando que não houve reabsorção óssea das cristas alveolares 4 semanas após a extração dos molares superiores em ratos em terapia com AZ (HOKUGO et al., 2010). O autor sugere que microfraturas possam ter ocorrido durante as extrações, causando a formação de sequestro ósseo.

Acreditamos que durante as exodontias possa ocorrer microfraturas nas regiões dos septos inter-radulares e cristas alveolares, que não sofrem uma reabsorção e remodelação, e também não sofrem reparo e consolidação, pois a função dos OCs e remodelação estão

comprometidas pela a ação do AZ, fazendo com que ocorra a morte dos osteócitos e consequente necrose do tecido ósseo com formação de sequestros ósseos das regiões de cristas alveolares e septos inter-radiculares.

Na análise microscópica das áreas dos alvéolos em reparo observamos a presença de restos radiculares em todos os animais (100%), tanto do grupo CO-C quanto do grupo em terapia com AZ-C, havendo discreta diferença relacionada com o achado por Maahs et al. (2011) que relatou a presença de restos radiculares em 60% dos animais em terapia por ácido zoledrônico. Esta diferença pode ser em parte devido ao fato de Maahs et al. (2011) terem avaliados somente 2 áreas das regiões dos alvéolos, enquanto em nosso estudo fizemos a análise histológica das regiões mesial, central e distal das áreas de alvéolos de todos os dentes (1º, 2º e 3º molares extraídos). Desta forma pode ser que as áreas estudadas por Maahs et al. (2011) não apresentassem restos radiculares por algum viés de avaliação, já que no grupo controle acharam restos radiculares em 100% dos animais.

Quanto a presença de áreas de osteonecrose, descrevemos em nosso trabalho como sendo a presença ou ausência de sequestro ósseo e posteriormente quantificamos as áreas de ON. Quanto à presença de osteonecrose ou sequestro ósseo encontramos dados muito semelhantes aos descritos por Maahs et al. (2011), sem necrose nos animais do grupo CO-C e 100% dos animais do grupo AZ-C com presença de sequestro ósseo. Valores muito próximos aos 80% no grupo em terapia com AZ e ausência no grupo CO achados por Maahs et al. (2011). Porém observamos algumas áreas de osteonecrose na análise quantitativa nos animais do grupo CO-C, sendo estatisticamente significantes menores que as áreas do grupo AZ-C.

Nas avaliações histológicas também foram feitas as análises quantitativas para as variáveis osteonecrose, espaço trabecular, reação periosteal e osso total nas regiões dos 1º, 2º, 3º molares, assim como da área total. As variáveis espaço trabecular e reação periosteal não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-C e AZ-C, apesar de poder ser observada maior reação periosteal no grupo CO-C nos cortes avaliados qualitativamente. Isto pode ser devido ao fato de a região do periósteo vestibular do alvéolo não ter apresentado uma grande reabsorção e sim, uma neoformação de tecido, não havendo uma liberação intensa de AZ da HAP quando reabsorvidas pelos OCs, não sendo as células ósseas muito afetadas pelo AZ.

Apesar de ser observado nos cortes avaliados uma maior área de osso total nos alvéolos, assim como os gráficos mostrarem uma tendência de maior área de osso total nos animais do grupo AZ-C, essa foi estatisticamente significativa na região dos 3º molares. Esta

possível tendência se deve à falta de reabsorção e remodelação óssea dos alvéolos, observada na análise qualitativa dos cortes histológicos.

Quanto a variável osteonecrose esta foi estatisticamente maior no grupo AZ-C em comparação ao grupo CO-C, não havendo diferença estatística na região dos 3º molares. Este achado está de acordo com o observado na análise qualitativa e com o encontrado por Maahs et al. (2011) em seu estudo. Mostrando também uma relação entre a maior ocorrência de áreas de exposição óssea com a presença de osteonecrose.

Várias tentativas de desenvolvimento de modelos animais já foram publicadas na literatura, porém cada autor aplica uma posologia da droga, tempo de uso e tempo entre as doses as exodontias e a eutanásia. Como cada trabalho possui tempos diferentes isto dificulta a comparação entre os nossos achados com os de outros autores que desenvolveram modelos animais em ratos *Wistar*. Algumas pesquisas utilizaram doses diárias ou semanais de AZ, durante curtos períodos de tempo com a eutanásia dos animais sendo realizada em um curto período de tempo após a administração do BF. Nestes casos não podemos comparar os resultados obtidos nestes estudos com nossos resultados, pois o período avaliado pode incluir períodos ainda em reparo dos alvéolos comprometendo a avaliação clínica e histológica, ao contrário do encontrado neste estudo que já estava consolidado o reparo ósseo 105 dias após as exodontias.

Muitos estudos associam outras drogas aos BFs com a finalidade de potencializar as chances de formação das lesões de OMAB, não sendo também possível fazer a comparação com o presente estudo. Porém a maioria dos trabalhos em animais descreve características semelhantes de áreas de exposição óssea e uma maior formação de osteonecrose nos animais em terapia com BFs (SONIS et al., 2009; BIASOTTO et al., 2010; HOKUGO et al., 2010; ALI-ERDEM et al., 2011).

As maxilas dos animais dos grupos CO, CO-C, AZ, AZ-C foram seccionadas na rafe palatina e feita a análise molecular através da expressão de RNAm de RANK, RANKL, OPG e VEGF.

O sistema RANK/RANKL/OPG é a principal via de ativação e estimulação da formação de OCs. RANK é uma proteína transmembrana expressada na superfície dos OCs e das células precursoras de OCs, que é ativada pelo RANKL que é uma proteína tipicamente ligada a membrana presente na superfície de (OBs) e células T. Quando em presença de fator de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF) o RANKL estimula a diferenciação das

células precursoras de osteoclastos em osteoclastos e também estimula a ativação de osteoclastos, sendo estimulantes da reabsorção óssea. Já a OPG é um receptor solúvel que atua como “decoy” de RANKL, impedindo a interação entre RANK e RANKL, atuando como inibidor da reabsorção óssea (AUBIN; BONNELYE, 2000; KHOSLA, 2001; THEOLEYRE et al., 2004; MURTHY, 2011).

O VEGF é um importante fator pro-angiogênico que estimula a angiogênese direta e indiretamente. Pode ser produzido por células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T, sendo aumentado em regiões de hipóxia e de reparo ósseo (CARDOSO, 2009).

Com a divisão das maxilas em sua linha média foi realizada análise molecular das hemi-maxilas de forma independente, fazendo com que tivéssemos 6 grupos distintos:

- **Grupo CO** (feita a média dos resultados das hemi-maxilas direita e esquerda de cada animal do grupo CO);
- **Grupo AZ** (feita a média dos resultados das hemi-maxilas direita e esquerda de cada animal do grupo AZ);
- **Grupo CO-C dente** (lado que não foi submetido a extração dos animais do grupo CO-C);
- **Grupo AZ-C dente** (lado que não foi submetido a extração dos animais do grupo AZ-C);
- **Grupo CO-C exo** (lado que foi realizada as exodontias dos molares dos animais do grupo CO-C);
- **Grupo AZ-C exo** (lado que foi realizada as exodontias dos molares dos animais do grupo AZ-C).

No presente estudo não houve diferença estatística na expressão em nenhum dos alvos estudados, na comparação entre os 6 grupos estudados. Este resultado leva a crer que o AZ e as exodontias não afetaram a expressão do RANK, RANKL, OPG e VEGF, 105 dias após as exodontias.

Como o tempo decorrido das exodontias até o momento da eutanásia, 105 dias, é um tempo suficiente para o termino do reparo ósseo, nossos resultados sugerem que o grupo CO-C exo apresenta uma expressão de RANK, RANKL, OPG e VEGF basal, semelhante as dos grupos CO e CO-C que não passaram pelo processo de reparo ósseo, por já ter terminado o

processo de reparo ósseo. Já o AZ não afetou a expressão basal dos alvos estudados, pois este apresentam-se semelhantes aos do grupo CO-C.

Analizando a expressão do grupo AZ-C exo ser semelhante ao de todos os outros grupos, surgem algumas hipóteses. A primeira seria a que o AZ não interferiu na expressão de RANK, RANKL, OPG e VEGF. Porém como a análise histológica mostrou uma diferença na presença de áreas de osteonecrose e tendência a maior volume ósseo nas áreas das exodontias dos animais em terapia com AZ, nos sugere que talvez em algum momento do reparo possa ter havido alteração na expressão dos alvos estudados não encontrado no momento em que fizemos nossa análise.

Como já demonstrado por alguns autores, as proteínas RANK, RANKL, OPG e VEGF apresentam expressão aumentada durante os primeiros dias do reparo ósseo voltando aos níveis basais aproximadamente 30 dias após o termino da remodelação óssea (GIORGETTI et al., 2010; VIEIRA, 2013). E como neste estudo fizemos a análise da expressão destas proteínas em um período tardio, após o termino do reparo ósseo, não nos permitiu saber se durante os primeiros dias do reparo dos alvéolos houve alguma expressão destas proteínas. Diante desta condição acredita-se que outra hipótese precisa ser avaliada. Pois, como houve diminuição da reabsorção das cristas alveolares e a presença de sequestros ósseos no grupo AZ-C exo, nos sugere que durante os primeiros dias do reparo ósseo, o AZ interferiu nos picos de expressão de RANK, RANKL, OPG e VEGF, mantendo sempre nos níveis basais, fazendo com que houvesse uma diminuição da remodelação óssea dos alvéolos e um atraso no reparo ósseo.

Outro achado histológico que leva para esta hipótese é o fato de as regiões dos alvéolos do grupo AZ-C exo apresentarem grandes áreas de sequestro ósseo e/ou de osteonecrose, com um aumento do infiltrado inflamatório na região, fatores que sugerem haver expressão aumentada de RANK, RANKL, OPG e VEGF, para que ocorra a reabsorção do tecido necrótico e reparo do alvéolo. Isto deveria fazer com que a expressão destas proteínas fosse diferente entre os grupos CO-C exo e AZ-C exo, já que o primeiro não apresenta na maioria dos casos este atraso no reparo, o que não aconteceu.

Os resultados encontrados nesta pesquisa são opostos aos encontrados por Kimachi et al. (2011), que descreveu que o AZ causa uma inibição da osteoclastogenese e ativação de OCs pelo RANK *in vitro*. Porém efeitos avaliados diretamente sobre as células e momentos iniciais de expressão de RANK podem ser diferentes dos encontrados nos estudos *in vivo*. Sendo o encontrado por Vasconcelos et al. (2012) que em um modelo animal semelhante ao

descrito por Maahs et al. (2011), demonstrou através de imunohistoquímica que não houve diferença na expressão de RANK e OPG nos animais em terapia com AZ e o grupo CO semelhante aos resultados encontrados no nosso estudo (VASCONCELOS et al., 2012).

ÇANKAYA et al. (2013) mostrou uma diminuição da expressão de RANKL em animais tratados com AZ por 10 semanas, e também relatou não haver uma alteração na expressão de OPG nestes animais, que apesar de ter avaliado mais precocemente que em nosso estudo, está de acordo com nosso resultado para a expressão de OPG.

A não alteração da expressão de VEGF neste estudo vai de encontro com os resultados de Yamashita et al. (2011) que não encontrou alteração da expressão de VEGF em estudo in vitro. Maahs et al. (2011) também não encontrou uma diminuição de VEGF em análise imunoistoquímica.

Como descrito anteriormente, a grande variação na dosagem, tempo até o momento das extrações dentárias, tempo até a eutanásia, dificultou a comparação entre esta pesquisa e outros estudos. Esta condição sugere a necessidade da validação de um modelo animal consolidado para estudo da OMAB em animais tal qual o realizado nesta pesquisa com o modelo animal de Maahs et al. (2011).

Apesar de o presente trabalho não mostrar diferenças na expressão de RANK, RANKL, OPG e VEGF, assim como outros trabalhos citados, não podemos concluir que o AZ interferiu no reparo ósseo através destes fatores, pois estes foram avaliados somente em um período tardio do reparo ósseo. Sendo necessário estudos que avaliem nos modelos estabelecidos de OMAB, como o utilizado no presente trabalho, a cinética de remodelação óssea para avaliar as expressões de RANK, RANKL, OPG e VEGF do início do reparo até a formação das lesões de OMAB.

O modelo descrito por Maahs et al. (2011) e reproduzido neste trabalho, apresentou boa incidência do desenvolvimento de OMAB, e se mostrou de fácil execução. Porém, os tempos de administração da droga, momento da exodontia e momento da eutanásia, diferem dos descritos para o desenvolvimento da OMAB em humanos, não sendo possível extrapolar os achados neste modelo que estudamos para os estudos em humanos, mantendo a carência em pesquisa do desenvolvimento de um modelo animal que seja compatível com as características de do aparecimento da OMAB em humanos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O modelo animal descrito por Maahs et al. (2011) é um modelo seguro para o estudo da OMAB em ratos, sendo validado nesta pesquisa.
- O AZ alterou o reparo ósseo de alvéolos após a extração dos molares superiores, causando um atraso no reparo ósseo e uma maior ocorrência de osteonecrose e sequestros ósseos através da análise microscópica.
- O AZ não alterou a expressão basal de RANK, RANKL, OPG e VEGF.
- O AZ não alterou a expressão RANK, RANKL, OPG e VEGF no reparo ósseo 105 dias após as exodontias de molares superiores.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(3):369-76.

Aghaloo TL, Felsenfeld AL, Tetradis S. Osteonecrosis of the jaw in a patient on Denosumab. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):959-63.

Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(7):e879-83.

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

Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg s.* 2009;67(5 Suppl):61-70.

Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, Bilder GE, et al. Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res.* 1992;33(11):1657-63.

Amin D, Cornell SA, Perrone MH, Bilder GE. 1-Hydroxy-3-(methylpentylamino)-propylidene-1,1-bisphosphonic acid as a potent inhibitor of squalene synthase. *Arzneimittelforschung.* 1996;46(8):759-62.

Arden-Cordone M, Siris ES, Lyles KW, Knieriem A, Newton RA, Schaffer V, et al. Antiresorptive effect of a single infusion of microgram quantities of zoledronate in Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int.* 1997;60(5):415-8.

Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature.* 2000;408(6812):535-6.

Aubin JE, Bonnellye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int.* 2000;11(11):905-13.

Bartl R, Frisch B, von Tresckow E, Bartl C. Bisphosphonates in medical practice. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2007. 265 p.

Bassett CA, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H, Francis MD. Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *Lancet.* 1969;2(7625):845.

- Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(5):390-6.
- Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. Principles of bone biology. 3rd ed. San Diego, California: Academic Press; 2008. 1900 p.
- Body JJ, Lortholary A, Romieu G, Vigneron AM, Ford J. A dose-finding study of zoledronate in hypercalcemic cancer patients. *J Bone Miner Res*. 1999;14(9):1557-61.
- Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Miner*. 1986;1(1):27-39.
- Çankaya M, Cizmeci Şenel F, Kadioglu Duman M, Muci E, Dayisoğlu EH, Balaban F. The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(9):1134-9.
- Cardoso C.L. Análise morfométrica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.
- Cardoso CL. Análise morfométrica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferente modalidades de tratamento [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.
- Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats. *J Periodontol*. 2008;79(10):1950-61.
- Cheer SM, Noble S. Zoledronic acid. *Drugs*. 2001;61(6):799-805; discussion 806.
- Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(3):307-12.
- Cremers S, Papapoulos S. Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):42-9.
- de Carvalho PS, Okamoto T, de Carvalho AC. The influence of intra-alveolar curettage on wound healing after tooth extraction. A histological study in rats. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1982;24(1):28-34.
- Dunford JE. Molecular targets of the nitrogen containing bisphosphonates: the molecular pharmacology of prenyl synthase inhibition. *Curr Pharm Des*. 2010;16(27):2961-9.

- Ebetino FH, Hogan AM, Sun S, Tsoumpira MK, Duan X, Triffitt JT, et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):20-33.
- Evans CE, Braidman IP. Effects of two novel bisphosphonates on bone cells in vitro. *Bone Miner*. 1994;26(2):95-107.
- Filleul O, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(8):1117-24.
- Fischer J, Gere A. Timing of analog research in medicinal chemistry. *Drug Discovery and Development*: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 199-211.
- Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol*. 1962a;203:671-5.
- Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature*. 1962b;195:911.
- Fleisch H, Bisaz S. The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experientia*. 1964;20(5):276-7.
- Fleisch H, Maerki J, Russell RG. Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966;122(2):317-20.
- Fleisch H, Russell RG, Bisaz S, Casey PA, Mühlbauer RC. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution. *Calcif Tissue Res*. 1968;Suppl:10-a.
- Fleisch H, Russell RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science*. 1969;165(3899):1262-4.
- Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature*. 1966;212(5065):901-3.
- Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to patient. 4th ed. San Diego, California: Academic Press; 2000. 212 p.
- Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev*. 1998;19(1):80-100.
- Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*. 2002;4(1):30-4.

- Fleisch H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1981;3(4-5):279-87.
- Fleisch H, Neuman WF. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *Am J Physiol*. 1961;200:1296-300.
- Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science*. 1969;165(3899):1264-6.
- Francis MD. The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates. *Calcif Tissue Res*. 1969;3(2):151-62.
- Frith JC, Monkkonen J, Auriola S, Monkkonen H, Rogers MJ. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2001;44(9):2201-10.
- Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1358-67.
- Giorgetti AP, Cesar Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(4):447-52.
- Green JR, Muller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res*. 1994;9(5):745-51.
- Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 4:3-13.
- Green JR. Zoledronic acid: pharmacologic profile of a potent bisphosphonate. *J Organomet Chem*. 2005;690(10):2439-48.
- Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1985;43(5):359-64.
- Guo RT, Cao R, Liang PH, Ko TP, Chang TH, Hudock MP, et al. Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(24):10022-7.
- Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Reszka AA. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone*. 2001;29(6):553-9.

- Hamma-Kourbali Y, Di Benedetto M, Ledoux D, Oudar O, Leroux Y, Lecouvey M, et al. A novel non-containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(3):816-23.
- Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res*. 2010;25(6):1337-49.
- Ibrahim A, Scher N, Williams G, Sridhara R, Li N, Chen G, et al. Approval summary for zoledronic acid for treatment of multiple myeloma and cancer bone metastases. *Clin Cancer Res*. 2003;9(7):2394-9.
- Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
- Kimachi K, Kajiya H, Nakayama S, Ikebe T, Okabe K. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2011;383(3):297-308.
- Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res*. 2007;86(11):1022-33.
- Klein G, Martin JB, Satre M. Methylenediphosphonate, a metabolic poison in *Dictyostelium discoideum*. Phosphorus-31 NMR evidence for accumulation of adenosine 5'-(.beta.,.gamma.-methylenetriphosphate) and diadenosine 5',5'''-P1,P4-(P2,P3-methylenetetraphosphate). *Biochemistry*. 1988;27(6):1897-901.
- Krinke G. The laboratory rat. San Diego, Calif.: Academic Press; 2000. xiv, 756 p.
- Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 1996;18(2):75-85.
- Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck*. 2011;33(2):199-207.
- Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63(11):1567-75.
- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1115-7.

- Menschutkin N. Ueber die Einwirkung des Chloracetyls auf phosphorige Säure. Justus Liebigs Annalen der Chemie. 1865;133(3):317-20.
- Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. J Am Dent Assoc n. 2005;136(12):1658-68.
- Miller PD. The kidney and bisphosphonates. Bone. 2011;49(1):77-81.
- Mühlbauer RC, Russell RG, Williams DA, Fleisch H. The effects of diphosphonates, polyphosphates, and calcitonin on "immobilisation osteoporosis" in rats. Eur J Clin Invest. 1971;1(5):336-44.
- Murthy MB. Osteoimmunology - Unleashing the concepts. J Indian Soc Periodontol. 2011;15(3):190-8.
- Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;106(1):5-13.
- Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. Bone. 2006;38(5):617-27.
- Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. J Cell Biochem. 2009;106(1):109-18.
- Otto S, Sotlar K, Ehrenfeld M, Pautke C. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: a case report. J Med Case Rep. 2011;5:477.
- Pelorgeas S, Martin JB, Satre M. Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould Dictyostelium discoideum. A 31P NMR study. Biochem Pharmacol. 1992;44(11):2157-63.
- Pietrokovski J, Massler M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. J Dent Res. 1967;46(1):222-31.
- Pietrokovski J. Extraction wound healing after tooth fracture in rats. J Dent Res h. 1967;46(1):232-40.
- Poleti ML. Análise morfológica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos Wistar [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5829-39.

Roelofs AJ, Ebetino FH, Reszka AA, Russell RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, editors. *Principles of bone biology*. 3rd ed. San Diego, California: Academic Press; 2008. p. 1737-67.

Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):34-41.

Rogers MJ, Ji X, Russell RG, Blackburn GM, Williamson MP, Bayless AV, et al. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J*. 1994;303 (Pt 1):303-11.

Rogers MJ, Russell RG, Blackburn GM, Williamson MP, Watts DJ. Metabolism of halogenated bisphosphonates by the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commu*. 1992;189(1):414-23.

Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des*. 2003;9(32):2643-58.

Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(4):433-41.

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(5):527-34

Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1218:38-46.

Russell RG, Mühlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res*. 1970;6(3):183-96.

Russell RG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res*. 1999;14 Suppl 2:53-65.

Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*. 1999;25(1):97-106.

- Russell RG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann UDO, Kwaasi A, Hulley PA, et al. Bisphosphonates - An update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1117(1):209-57.
- Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:367-401.
- Russell RG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics.* 2007;119 Suppl 2:S150-62.
- Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011;49(1):2-19.
- Schenk R, Merz WA, Muehlbauer R, Russell RG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res.* 1973;11(3):196-214.
- Schwetz BA. From the Food and Drug Administration. *JAMA.* 2001;286(13):1569.
- Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):385-91.
- Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 2009;45(2):164-72.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(6):457-75.
- Vasconcelos AC, Berti-Couto SA, Azambuja AA, Salum FG, Figueiredo MA, da Silva VD, et al. Comparison of effects of clodronate and zoledronic acid on the repair of maxilla surgical wounds - histomorphometric, receptor activator of nuclear factor-kB ligand, osteoprotegerin, von Willebrand factor, and caspase-3 evaluation. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(9):702-12.
- Vieira AE. Caracterização morfológica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas [tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.
- Wen D, Qing L, Harrison G, Golub E, Akintoye SO. Anatomic site variability in rat skeletal uptake and desorption of fluorescently labeled bisphosphonate. *Oral Dis.* 2011;17(4):427-32.

-
- Widler L, Jaeggi KA, Glatt M, Muller K, Bachmann R, Bisping M, et al. Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J Med Chem.* 2002;45(17):3721-38.
- Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(3):1055-61.
- Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1405-14.

ANEXO

ANEXO A - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 019/2011

Bauru, 22 de agosto de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Análise molecular e microscópica do efeito do ácido zoledrônico sobre o reparo ósseo de alvéolos dentários e defeitos ósseos criados em fêmures de ratos Wistar**, de autoria de Edson Virgílio Zen Filho, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos
Docente do Departamento de Estomatologia