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

GUSTAVO ZANNA FERREIRA

**Avaliação do reparo ósseo alveolar e femoral em um modelo animal tratado
com Ácido Zoledrônico**

**BAURU
2015**

GUSTAVO ZANNA FERREIRA

**Avaliação do reparo ósseo alveolar e femoral em um modelo animal tratado
com Ácido Zoledrônico**

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
2015**

F413a Ferreira, Gustavo Zanna
Avaliação do reparo ósseo alveolar e femoral em um
modelo animal tratado com Ácido Zoledrônico / Gustavo
Zanna Ferreira. – Bauru, 2015.
137p. : il. ; 30cm.

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.

Gustavo Zanna Ferreira

Data:

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

DEDICATÓRIA

A **Deus** todo-poderoso pelo dom de vida que me concebeu e por ter iluminado meu caminho durante todos estes anos.

À **minha família** por todo esforço, para mostrar o quanto estudar é importante, incentivo e dedicação para que pudesse vencer mais esta etapa da minha vida.

Em especial a meu pai **Ivan Ferreira da Cruz** e minha mãe **Vera Lúcia Zanna Ferreira** que me ensinaram, através de seus exemplos, a ser uma pessoa digna, de caráter e que lutar pelos nossos sonhos é algo que vale a pena.

Ao meu irmão **Gabriel Zanna Ferreira** e minha irmã **Ana Flávia Zanna Ferreira** pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos na infância, e pelo espelho que são para mim por suas atitudes e realizações.

À minha noiva **Carolina Ferrairo Danieletto** por toda atenção, carinho e amor que me ajudou e fortaleceu durante os todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente A **Deus** pelo dom da vida, por Sua proteção e por tudo de maravilhoso que tem me dado durante toda a minha existência. Pela minha saúde, força e determinação para que eu pudesse superar todas as dificuldades e conseguisse alcançar meus objetivos.

Ao meu pai **Ivan Ferreira da Cruz**, por todo exemplo de retidão, força de vontade e maneira de lidar com as adversidades da vida. À minha mãe **Vera Lúcia Zanna Ferreira** por todo cuidado, principalmente quando aprontava certas travessuras, carinho, atenção, amor e cuidado, saiba mãe que meu maior orgulho é ter a senhora ao meu lado neste momento. Agradeço a Deus todos os dias por ter me colocado no colo de pessoas tão maravilhosas.

Ao meu irmão **Gabriel Zanna Ferreira**, que sempre foi um exemplo a ser seguido, tenho muita admiração e sempre aprendo com seus atos. À minha irmã **Ana Flávia Zanna Ferreira** que me ajudou a ganhar maturidade e responsabilidade, durante as noites que cuidava dela para meus pais trabalharem. Juntos formamos um grande tripé que se fortalece a cada dia.

À minha noiva **Carolina Ferrairo Danieletto** que durante todos estes anos sempre esteve ao meu lado dando apoio, amor e carinho. Seu incentivo foi fundamental para que eu conseguisse superar mais esta etapa de minha vida. Muito obrigado pelos momentos de paciência e preocupação nestas indas e vindas.

Ao **Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos** pela orientação durante o mestrado, estando sempre disposto a me ajudar quando necessário mostrando sempre ser um profissional exemplar. Saiba professor que o senhor é um grande exemplo profissional e pessoal.

Desta maneira amplio meus agradecimentos a todos os professores do **Departamento de Estomatologia e Cirurgia** que muito contribuíram nesta fase de formação acadêmica!

Também quero aqui registrar meus agradecimentos a todos os **Pós-Graduandos da Estomatologia** que tive contato durante esses anos. Vocês foram companheiros que ajudaram a fazer com que o dia a dia neste departamento fosse tão agradável.

Deixo um agradecimento especial ao meu afilhado e grande amigo **Edson Virgílio Zen Filho (Espeto)**, para mim é motivo de orgulho saber que aquela amizade iniciada quando era graduando e você residente na UEM se perpetua até hoje. Obrigado pela amizade, companheirismo e ajuda fundamental durante a realização da pós-graduação, você sabe que sem você este trabalho não existiria. Agradeço também a afilhada **Michelly Lima Moro Alves**, que muitas vezes mesmo não sendo sua responsabilidade abriu mão de seus compromissos e nos ajudou nos experimentos.

Ao **Departamento de Histologia** e aos professores: **Prof. Dr. Gustavo Garlet**, **Prof. Dr. Gérson**, **Prof. Dr. Rumio** que me acolheram com muito carinho e proporcionaram meios necessários para a realização da pesquisa!

Ao **Departamento de Farmacologia** e nome do **Prof. Dr. Carlos**, que disponibilizaram todo o material e equipamento necessário para o bom andamento do nosso trabalho!

Aos **funcionários do Biotério**, **Erasmus** e **Luís**, por toda sua ajuda e parceria, sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário, tendo um cuidado todos especial com nossos animais.

Aos **funcionários da Estomatologia**: **Andréa**, **Roberto**, **Alexandre**, **Luciana**, **Marília**, **Fernanda** e **Cris** vocês são a peça fundamental para o bom andamento deste departamento. Muito obrigado pelos momentos de trabalho e de descontração.

As **funcionárias da Histologia**: **Patrícia**, **Danielle**, **Teresa** e **Tânia** que me ajudaram muito, sempre procurando a melhor solução para os tantos momentos de incertezas.

Aos **funcionários da Farmacologia**, **Thiago** e **Viviane** que muito nos ajudaram, ensinando com disposição e sendo fundamentais para o andamento do experimento. Obrigado pela disponibilidade inclusive aos finais de semana.

Às **funcionárias da Bioquímica**, **Aline** e **Thelma**, pela ajuda na pesquisa.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** por me receber de braços abertos, sempre oferecendo sempre o que existe de melhor. Me sinto privilegiado em levar o nome desta instituição.

Aproveito para agradecer a **Universidade Estadual de Maringá**, que foi o alicerce da minha carreira profissional e a **Unicesumar** onde hoje posso transmitir um pouco do conhecimento adquirido nestes anos de pós-graduação.

*“Nós somos aquilo que fazemos repetidas vezes. A
excelência portanto não é um feito, mas um hábito”*

Aristóteles

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares associada ao uso dos Bisfosfonatos é 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. Explicar o motivo do desenvolvimento destas lesões ósseas principalmente nos maxilares e desvendar a sua patofisiologia ainda é necessário. Por isso, o reparo ósseo em um modelo animal de osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos em ratos Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*) foi avaliado através de análise microscópica e molecular. A amostra foi composta por 48 ratos machos, com 12 semanas de vida e peso aproximado de 300 gramas, que foram submetidos a administração de Ácido Zoledrônico, 0,6 mg/kg a cada 28 dias com um total de 5 doses. Os animais foram divididos em quatro grupos, cada um composto por 12 animais; 2 grupos de tratamento AZ e AZ-experimental (AZ-exp) e 2 grupos controles CO e CO-experimental (CO-exp) com administração de cloreto de sódio 0,9% no mesmo volume e frequência do Ácido Zoledrônico. As soluções foram administradas por via intraperitoneal. O grupo AZ-exp e o CO-exp foram submetidos a exodontias dos molares superiores direitos e a realização de defeito ósseo no fêmur esquerdo 45 dias após a primeira aplicação das soluções. A eutanásia dos animais ocorreu após 150 dias do início do experimento. A avaliação histológica foi realizada através de análises qualitativa e quantitativa, verificou a presença de sequestros ósseos, áreas de osteonecrose e áreas de osso total por meio de estudos de microscopia óptica pela coloração Hematoxilina e Eosina. Análise quantitativa da expressão do RNAm de proteínas envolvidas no processo de reparo ósseo pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*RealTimePCR*) também foi realizada para avaliação dos osteoclastos (RANK, RANKL e OPG), osteoblastos (ALPL e OCN) osteócitos (DMP-1 e PHEX) e vascularização (VEGF). Apenas o grupo com administração de AZ e realização de exodontias apresentou sequestros ósseos e áreas significativamente maiores de osteonecrose em comparação aos animais com exodontia e sem a administração de AZ. Não foram encontradas áreas de osteonecrose na análise do fêmur. A avaliação do osso total apresentou maior quantidade de osso nos animais submetidos a procedimentos cirúrgicos e administração de AZ, porém não houve significância estatística. Na análise molecular, a administração de AZ e a realização das exodontias e do defeito ósseo, provocou alteração na expressão de marcadores para osteoclastos. A administração do AZ associada à realização dos procedimentos cirúrgicos aumentou a expressão de marcadores iniciais da osteoblastogênese e diminuiu a expressão tardia dos osteoblastos. A expressão de marcadores de osteócitos foi menor após a administração de AZ e exodontias na maxila, no entanto, no fêmur, houve aumento na expressão destes marcadores. A realização das exodontias e de defeitos ósseos no fêmur aumentou a expressão de VEGF nos grupos com e sem administração de AZ. Estes resultados evidenciam a interferência do Ácido Zoledrônico no reparo ósseo dos alvéolos e dos defeitos ósseos nos fêmures, causando incidência de osteonecrose na maxila, atraso na remodelação óssea, e ausência de lesões de osteonecrose no fêmur. A presença de lesões de osteonecrose na maxila pode ser consequência do atraso na remodelação óssea, evidenciado pela alteração na expressão de marcadores para osteoclastos e osteoblastos, e as mesmas ocasionam a diminuição da expressão de proteínas pelos osteócitos.

Palavras-chave: Osteonecrose Associada aos Bisfosfonatos. Remodelação óssea. Maxilares. Fêmur.

ABSTRACT

Evaluation of alveolar and femoral bone repair in an animal model treated with zoledronic acid

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws is a bone exposure persisting for more than 8 weeks in the oral cavity in patients receiving bisphosphonates and who did not undergo radiation therapy for head and neck. Explain the reason for these development bone lesions mainly in the jaws and unveil its pathophysiology is still needed. Therefore, the bone repair in an animal model of Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in Wistar rats (*Rattus norvegicus*, *Albinus*) was evaluated by microscopic and molecular analysis. The sample was composed of 48 male rats, with 12 weeks old and weighing approximately of 300 grams, who underwent the administration of zoledronic acid, 0.6 mg / kg every 28 days with a total of 5 doses. The animals were divided into four groups, each consisting of 12 animals; 2 treatment groups AZ and AZ-experimental (AZ-exp) and 2 control groups CO and CO-experimental (CO-exp) with sodium chloride administration 0.9% in the same volume and frequency of zoledronic acid. All solutions were administered intraperitoneally. The AZ-exp group and the CO-exp group underwent extractions rights upper molars and the bone defect was performed in the left femur 45 days after the first application of the solutions. Euthanasia of animals occurred after 150 days from the beginning of the experiment. Histological evaluation was performed through quantitative and qualitative analysis checked the presence of bone sequestration, osteonecrosis area and whole bone areas by means of optical microscopy by hematoxylin-eosin staining. Quantitative analysis of mRNA expression of proteins involved in bone repair by polymerase chain reaction method in real time (RealTimePCR) was also performed: osteoclasts (RANK, RANKL and OPG), osteoblasts (ALPL and OCN) osteocytes (PMD-1 and PHEX) and vascularization (VEGF). Only the group with administration of AZ and performing tooth extractions presented bone sequestration and significantly larger areas of osteonecrosis when compared to animals with extraction and without AZ administration. There were no areas of osteonecrosis of the femoral analysis. The evaluation of the whole bone showed more bone in animals undergoing surgeries and AZ administration but there was no statistical significance. Molecular analysis, AZ administration and the performance of tooth extractions and bone defect changed the expression of markers for osteoclasts. The AZ administration associated with surgical procedures increased the expression of early markers of osteoblastogenesis and decreased the late expression of osteoblasts. The expression of osteocytes markers was lower after AZ administration and maxillary tooth extractions; however, there was an increase in the expression of these markers in the femur. The performance of tooth extractions and bone defects in the femur increased VEGF expression in animals with and without administration of AZ. These results show the interference of zoledronic acid on bone repair of the sockets and bone defects in the femurs, causing incidence of osteonecrosis of the upper jaw, delayed bone remodeling, and no femoral osteonecrosis injuries. The presence of osteonecrosis injuries in the upper jaw can be the consequence of the delay on bone remodeling, evidenced by the change in the markers expression for osteoclasts and osteoblasts, and they cause the decreased in protein expression by osteocytes.

Keywords: Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw. Bone remodeling. Jaw. Femur.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Fórmula química do pirofosfato e modelo de fórmula dos bisfosfonatos mostrando as cadeias R1 e R2 ligadas ao átomo de carbono (C) central .	28
Figura 2.2 - Sistema RANK/RANKL/OPG.....	37
Figura 2.3 - Expressão de marcadores durante a evolução do osteoblasto a osteócito	38
Figura 4.1 - Distribuição dos animais por grupo e por experimento realizado	48
Figura 4.2 - Esquema de aplicações, procedimento cirúrgico e eutanásia em função do tempo.....	49
Figura 4.3 - Anestesia dos animais. Medicamentos utilizados na anestesia geral e forma de aplicação	50
Figura 4.4 - 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.....	50
Figura 4.5 - Incisão, divulsão dos planos e exposição de epífise do fêmur esquerdo ..	51
Figura 4.6 - Exposição da face lateral da epífise femoral esquerda, confecção de defeito ósseo com broca carbide nº 8, medição do diâmetro do defeito e sutura com seda 4.0	51
Figura 4.7 - 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	52
Figura 4.8 - Maxila coletada com sutura com seda 4.0 na região anterior para fazer a inclusão	53
Figura 4.9 - Distribuição de denominação dos grupos das maxilas para o estudo de qPCR. Azul as maxilas que foram utilizadas em cada grupo e em vermelho as que não foram utilizadas para o <i>RealTimePCR</i>	53

Figura 4.10 - Fêmur direito e esquerdo desarticulados.....	54
Figura 4.11 - Fêmur esquerdo evidenciando o defeito e após preparo para processamento histológico e análise molecular	54
Figura 4.12 - Distribuição de denominação dos grupos dos fêmures para o estudo de <i>RealTime</i> PCR. Azul os fêmures que foram utilizados em cada grupo e em vermelho os que não foram utilizados para o <i>RealTime</i> PCR.....	54
Figura 4.13 - (A, B e C) Cortes histológicos mostrando a realização da análise microscópica quantitativa através do ROI e a demarcação nas B e C das áreas a serem medidas. Em cor preta no menor aumento está demarcado o tecido ósseo. C: mostra a demarcação em maior aumento das áreas de osteonecrose e sequestro ósseo.....	57
Figura 4.14 - (A, B) Cortes histológicos mostrando a realização da análise microscópica quantitativa e ROI. C: mostra imagem em binário com as áreas preenchidas por osso sendo marcadas em branco.....	58
Figura 4.15 - Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa	62
Figura 5.1 - Imagens dos cortes histológicos da região dos alvéolos de áreas de exodontias de 1º molar de ratos do grupo CO-M-exp 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 (*) dos rebordos alveolares com uma reação periosteal (RP).....	69

Figura 5.2 - Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial **(A)** e central **(B)** da região da exodontia do **1º molar** do mesmo animal do grupo **AZ-M-exp** 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-M-exp. 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

71

Figura 5.3 - 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-M-exp** 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

73

Figura 5.4 - Imagens dos cortes histológicos das regiões dos defeitos ósseos nos fêmures do grupo **CO-F-exp (A e B)**; área do defeito ósseo que apresenta reparo com tecido ósseo **(TO)** com permanência dos limites do defeito ósseo apresentando reação periosteal discreta **(RP)** e mantendo a integridade e o volume da medula óssea do fêmur **(MO)**. H.E., 4x

77

Figura 5.5 - Imagens dos cortes histológicos das regiões dos defeitos ósseos nos fêmures do grupo AZ-F-exp (A e B) ; área do defeito ósseo que apresenta reparo com tecido ósseo (TO) com permanência dos limites do defeito ósseo e área de invaginação central formando uma fenda na área de reparo ósseo (IC), apresenta reação periosteal discreta (RP) e medula óssea do fêmur (MO) sendo invadida por osso neoformado (TO) diminuindo seu volume. H.E., 4x	77
Figura 5.6 - Gráficos mostrando as áreas de osteonecrose (A) e osso total (B) 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.....	80
Figura 5.7 - Gráfico mostrando as áreas de osso total das regiões dos defeitos ósseos nos fêmures. Os resultados apresentados representam as médias ± DP por grupo e a área em cada defeito	82
Figura 5.8 - Expressão de marcadores ósseos e vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas dos animais dos grupos CO-M, AZ-M, CO-M-exp e AZ-M-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de ALPL, DMP1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL e VEGF foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios ± DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.....	84
Figura 5.9 - Expressão de marcadores ósseos e vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras dos fêmures dos animais dos grupos CO-F, AZ-F, CO-F-exp e AZ-F-exp coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de ALPL, DMP1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL, e VEGF foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios ± DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.....	86

<p>Figura 5.10 - Expressão de marcadores ósseos para osteoclastos nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANK, RANKL e OPG foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.....</p>	87
<p>Figura 5.11 - Expressão de marcadores ósseos para osteoblastos nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de ALPL e OCN foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo</p>	87
<p>Figura 5.12 - Expressão de marcadores ósseos para osteócitos nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DMP-1 e PHEX foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo</p>	88
<p>Figura 5.13 - Expressão de marcador de vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de VEGF foram analisados através de <i>RealTime</i>PCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo</p>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Marcadores ósseos envolvidos na diferenciação dos osteócitos.....	39
Tabela 5.1 - Frequência da presença/ausência de sequestro ósseo na região dos alvéolos nas áreas das exodontias dos molares superiores nos grupos CO-M-exp e AZ-M-exp.....	79
Tabela 5.2 - 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-M-exp e AZ-M-exp. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$	80
Tabela 5.3 - 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-M-exp e AZ-M-exp. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$	80
Tabela 5.4 - Frequência da presença/ausência de sequestro ósseo na região dos defeitos do fêmur nos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp.....	81
Tabela 5.5 - Média, DP e mediana das áreas em μm^2 do osso total nas lâminas coradas por H.E. dos defeitos nos fêmures dos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado ao nível de significância de $p < 0,005$	82
Tabela 5.6 - Concentração de RNA total nas amostras obtidos em um espectrofotômetro <i>Nanodrop</i> [®] . Resultados expressos em ng/ μL	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	<i>Registered sign</i>
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	molaridade
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)
ALPL	Fosfatase Alcalina
ANOVA	teste de Análise de variância
ANT	Adenina Nucleotídeo Translocase
Apaf-1	Fator de ativação de apoptose-1
AppCp	Análogos não hidrolisáveis metilizados do ATP
ASBMR	Sociedade Americana para Pesquisa Óssea e Mineral (American Society of Bone and Mineral Research)
ATP	Adenosina Trifosfato
AZ	Ácido Zoledrônico
AZ-exp	Grupo Ácido Zoledrônico experimental
AZ-F	Grupo Ácido Zoledrônico Fêmur
AZ-F-exp	Grupo Ácido Zoledrônico Fêmur experimental
AZ-M	Grupo Ácido Zoledrônico Maxila
AZ-M-exp	Grupo Ácido Zoledrônico Maxila experimental
BFs	Bisfosfonatos
BFs-HAP	Ligação Bisfosfonato com Hidroxiapatita
BMP	Proteínas Morfogenéticas Ósseas (Bone morphogenetic proteins)
C	Carbono
CIP	Centro Integrado de Pesquisas
CO	Grupo Controle
CO-exp	Grupo Controle experimental
CO-F	Grupo Controle Fêmur
CO-F-exp	Grupo Controle Fêmur experimental

CO-M	Grupo Controle Maxila
CO-M-exp	Grupo Controle Maxila experimental
CT	Ciclo Limiar (<i>cicle threshold</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato – inibidor da RNAase
DMP-1	Proteína de matriz dentinária 1
DP	Desvio Padrão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Agência Americana de Regulação de Alimentos e Drogas (Food and Drug Administration)
FGF-23	Fator de Crescimento Fibroblástico 23
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FPP	Farnesil Difosfato Sintetase
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GTPases	Guanosina-trifosfatases
H.E.	Hematoxilina de Harris e eosina de Lison
HAP	Hidroxiapatita
IF	Infiltrado Inflamatório
kg	Quilograma
KS	Kolmogorov-Smirnov
KW	Kruskal-Wallis
M-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos
MEPE	Fosfoglicoproteína da matriz extracelular
ml	Miligrama
ng	Nanograma
N-BFs	Bisfosfonatos nitrogenados
O	Oxigênio
OBs	Osteoblastos
°C	Graus Celsius
OCN	Osteocalcina
OCs	Osteoclastos
OMAB	Osteonecrose dos Maxilares Associada ao uso de Bisfosfonatos
OMAM	Osteonecrose dos Maxilares associada a Medicamentos
ON	Osteonecrose
OPG	Osteoprotegerina

P	Pirofosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHEX	Endopeptidase neutra reguladora de fosfato
PIs	Pirofostatos Inorgânicos
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
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>)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	Region of Interest
RP	Reação periosteal
rpm	rotações por minuto
RR	Resto radicular
S-BFs	Bisfosfonatos simples ou não nitrogenados
SO	Sequestro ósseo
SOC	Solução de Continuidade
SR	Septo Interradicular
Tm	Curva de dissociação
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TO	Tecido Ósseo
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (Vascular endothelial growth factor)
VN	Feixe Vasculo-Nervoso palatino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	HISTÓRICO DOS BISFOSFONATOS	27
2.2	ESTRUTURA QUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS BISFOSFONATOS	28
2.3	OSTEONECROSE DOS MAXILARES ASSOCIADA AOS BISFOSFONATOS (OMAB)	32
2.4	MODELOS ANIMAIS DE OMAB	35
2.5	AÇÃO DOS BISFOSFONATOS SOBRE OSTEOLASTOS, OSTEÓCITOS E FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR	36
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	ANIMAIS	47
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	47
4.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	49
4.4	COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	52
4.5	PREPARO PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA	55
4.5.1	Análise das lâminas	56
4.6	PREPARO PARA ANÁLISE MOLECULAR	58
4.6.1	Extração do RNA.....	58
4.6.2	Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total.....	60
4.6.3	Transcrição reversa do RNA em cDNA	60
4.6.4	Reações em cadeia da polimerase em tempo real (<i>RealTimePCR</i>)	61
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5	RESULTADOS	65
5.1	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA DA MAXILA	67
5.1.1	Imagens dos alvéolos dos 1º molares.....	69
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA DO FÊMUR	75
5.2.1	Imagens dos fêmures região dos defeitos ósseos	77
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA DA MAXILA	79
5.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA DO FÊMUR	81

5.5	ANÁLISE MOLECULAR	82
5.5.1	Análise molecular da maxila.....	83
5.5.2	Análise molecular do fêmur.....	84
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICES	115
	ANEXOS	133

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os Bisfosfonatos (BFs) são drogas sintéticas análogas ao pirofosfato inorgânico que apresentam alta afinidade por cálcio, são potentes inibidores da atividade osteoclática e se acumulam por longos períodos na matriz óssea mineralizada (LITTLE et al., 2013).

O seu uso na medicina teve início no fim da década de 60 (RUSSEL, 2011) e atualmente, os BFs são as drogas mais utilizadas para o tratamento de distúrbios ósseos como osteoporose, metástases ósseas, Doença de Paget e Mieloma Múltiplo (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; LITTLE et al., 2013). No Reino Unido mais de um milhão de pacientes receberam algum tipo de bisfosfonato, e mais de 6,5 milhões de prescrições de bisfosfonatos foram emitidas entre os anos de 2009 e 2010 (MHRA, 2010).

Os BFs apresentam características farmacológicas únicas que os diferenciam de outras terapias, incluindo reabsorção seletiva do esqueleto preferencialmente em locais com maior remodelação óssea e menor liberação do osso (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011).

O aumento do uso dos BFs trouxe como consequências o aparecimento de efeitos adversos. A irritação esofágica ou gástrica causada pelas preparações orais dos BF é um efeito adverso estabelecido. No entanto, a osteonecrose dos maxilares associada aos bisfosfonatos (OMAB) e fraturas subtrocantéricas têm sido destaque, principalmente devido sua fisiopatologia ainda não estar bem definida (PAZIANAS; ABRAHAMSEN, 2011).

O primeiro relato descrevendo exposição óssea associada à utilização de bisfosfonatos foi publicado por Marx (2003). No ano seguinte, Rugiero et al. (2004) publicaram um estudo clínico retrospectivo com 63 pacientes com osteomielite refratária associada ao uso de bisfosfonatos. No entanto, não havia definição ou nomenclatura para esta patologia.

Em 2007, foi formalizada pela Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) e Sociedade Americana para Pesquisa Óssea e Mineral (ASBMR) a nomenclatura da osteonecrose dos maxilares associada ao uso dos BFs (OMAB) e sua definição 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 (ADVISORY TASK FORCE ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS, 2007).

O mecanismo exato que leva a OMAB é desconhecido. No entanto, os fatores de risco para desenvolver esta condição podem ser divididos em três: os fatores de risco relacionados com a ingestão de medicamentos, fatores de risco locais, e os fatores de risco sistêmicos (MARX et al., 2005).

A maior parte das pesquisas com BFs, estudou exclusivamente a ação destes medicamentos sobre as células e metabolismo ósseo, havendo poucos estudos correlacionando os efeitos dos BFs com o desencadeamento da osteonecrose dos maxilares.

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

O presente estudo é resultado do projeto FAPESP “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” (PROCESSO 2011/22220-7).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DOS BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos (BFs), que possuem como precursor o pirofosfato inorgânico, foram quimicamente sintetizados pela primeira vez na metade do século XIX, (MENSCHUTKIN, 1865), mas somente nos últimos 40 anos começaram a ser usados para o tratamento de distúrbios do metabolismo do cálcio. No início de sua descoberta, foram utilizados na indústria têxtil, de óleo e de fertilizantes, como inibidor de corrosão e da precipitação do carbonato de cálcio, impedindo a formação de cristais na água. (RUSSELL; ROGERS, 1999; FLEISCH, 2000; BARTL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

O uso dos BFs na medicina iniciou quando Fleisch e Neuman (1961) descobriram que inibidores de calcificação presentes nos fluidos corporais, tais como, plasma e urina, impediam que o colágeno induzisse a calcificação dos mesmos. A capacidade já conhecida dos polifosfatos de atuar inibindo a precipitação do carbonato de cálcio fez com que pensassem na capacidade destes compostos de agir como reguladores naturais da calcificação em condições fisiológicas. No ano seguinte, Fleisch e Bisaz descobriram que o inibidor presente na urina era o pirofosfato inorgânico (PI) (FLEISCH; BISAZ, 1962).

A partir destes estudos, estabeleceu-se o conceito de que o PI é o regulador endógeno da mineralização óssea, e impede a calcificação dos tecidos moles (FLEISCH; MAERKI; RUSSELL, 1966; FLEISCH; RUSSELL; STRAUMANN, 1966, RUSSELL; ROGERS, 1999; WIDLER et al., 2002).

Este achado científico permitiu o desenvolvimento de possibilidades terapêuticas para alterações de distúrbios do metabolismo ósseo, e a realização de pesquisas para avaliar se os pirofosfatos poderiam inibir a calcificação anormal. Entretanto, a instabilidade do PI após a administração oral, devido à inativação por hidrólise no trato gastrointestinal fez com que os estudos fossem voltados para substâncias análogas aos PIs, e que apresentassem características semelhantes, mas que não fossem rapidamente hidrolisados (SCHIBLER; RUSSELL; FLEISCH, 1968; FLEISCH, 1981; FLEISCH, 2000; FLEISCH, 2002; BARTL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

O Dr. Marion Dave Francis em seu estudo para desenvolver agentes tópicos para inibição da formação de cálculos dentários, trabalhava com análogos dos PIs, chamados na

época de disfosfonatos. Fleisch et al. (1966), na busca por substâncias com atividade semelhante à dos Pirofosfatos e maior estabilidade que estes, firmaram uma parceria com o Dr. Marion Dave Francis (FLEISCH et al., 1968; FLEISCH, 1981). Os frutos desta aliança mostraram que os Bisfosfonatos têm efeitos físicos e químicos semelhantes aos do Pirofosfato Inorgânico, mas são resistentes à hidrólise enzimática e a uma degradação metabólica (BARTL et al., 2007).

2.2 ESTRUTURA QUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS BISFOSFONATOS

Os BFs são análogos sintéticos dos PIs. Os BFs possuem duas ligações P-C ligadas pelo mesmo átomo de carbono (P-C-P), ao invés das ligações com oxigênio (P-O-P) apresentadas pelos PIs (Figura 2.1) (FLEISCH; RUSSELL; FRANCIS, 1969; FLEISCH, 2000; FLEISCH, 2002; BARTL et al., 2007). Esta substituição do átomo de O pelo de C confere aos BFs uma estabilidade à maioria dos reagentes químicos e ao calor, assim como resistência à hidrólise enzimática (FLEISCH, 2000; FLEISCH, 2002; BARTL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

Fonte: Adaptado de Roelofs et al. (2008).

Figura 2.1 - Fórmula química do pirofosfato e modelo de fórmula dos bisfosfonatos mostrando as cadeias R1 e R2 ligadas ao átomo de carbono (C) central.

As cadeias laterais, R1 e R2, ligadas ao átomo de carbono, permitem uma grande variabilidade na sua estrutura química, com diferentes características biológicas e toxicológicas (ROGERS, 2003; ROGERS et al., 2011). A cadeia R1, formada por um grupo hidroxila (OH), que confere maior afinidade e ligação mais forte aos íons cálcio, está presente na maioria dos

BFs disponíveis para uso em humanos (RUSSELL; ROGERS, 1999; BARTL et al., 2007; EBETINO et al., 2011). A composição da cadeia R2 classificará os BFs em Simples ou Não-Nitrogenados (S-BFs), e Nitrogenados (N-BFs). (BASSETT et al., 1969; EBETINO et al., 2011; RUSSELL, 2011). Os S-BFs foram os primeiros a serem desenvolvidos, e os estudos iniciais envolviam 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 foram desenvolvidos posteriormente, e apresentam maior potência na inibição da reabsorção óssea devido à presença do átomo de N em sua composição, sendo o Pamidronato o primeiro disponível para uso. Porém a estrutura R2 pode apresentar muitas variações, justificando um mecanismo de ação e potência, específicos de cada droga (BARTL et al., 2007; EBETINO et al., 2011; RUSSELL, 2011).

Atualmente o Ácido Zoledrônico (AZ) é classificado como terceira geração e considerado o BF de maior potência. Foi desenvolvido e patenteado em 1986, pela indústria farmacêutica Novartis (CHEER; NOBLE, 2001; GREEN, 2005). Os primeiros estudos com AZ foram realizados na década de 90, com Evans e Braidman (1994) com estudos *in vitro*, e Green, Muller e Jaeggi (1994) com pesquisas *in vivo* e *in vitro*, demonstrando o efeito do AZ sobre a reabsorção óssea (GREEN; MULLER; JAEGGI, 1994; IBRAHIM et al., 2003).

Os primeiros estudos clínicos para avaliar a eficácia do AZ no tratamento de distúrbios osteolíticos foram realizados no final da década de 90 (ARDEN-CORDONE et al., 1997; BODY et al., 1999). O uso do AZ foi liberado pela agência americana de regulação de drogas e alimentos (FDA) para o tratamento da Hipercalcemia devido a lesões malignas em 2001, 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 podem ter via de administração oral (Etidronato, Clodronato, Alendronato, Risedronato e Ibandronato) ou endovenosa (Clodronato, Ibandronato, Pamidronato e Ácido Zoledrônico) (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). A absorção dos BFs ocorre principalmente por difusão passiva, pela via paracelular, nas áreas de maior superfície na porção inicial do intestino (LIN, 1996; BARTL et al., 2007). Esta absorção é dose-dependente, ou seja, há maior taxa de absorção quando administradas doses mais altas, e a taxa de absorção é diminuída quando ingeridos com alimentos, principalmente leite e seus derivados (LIN, 1996; BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008; ROELOFS et al., 2008).

Após a administração dos BFs, seja por via enteral ou parenteral, estes irão para corrente sanguínea e formarão ligações com as proteínas plasmáticas, principalmente

Albumina. A ligação com proteínas plasmáticas determina a meia-vida dos BFs, e a eliminação ocorre aproximadamente 0,5 a 2 horas após uma administração endovenosa em humanos (LIN, 1996; ROELOFS et al., 2008). Quanto à distribuição, 30% a 70% da dose absorvida para corrente sanguínea é rapidamente distribuída para os tecidos ósseos e o restante é excretado inalterado pelos rins, com menos de 1% sendo eliminado com a bile (LIN, 1996; ROELOFS et al., 2008; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011).

Os BFs apresentam elevada afinidade por íons cálcio e cristais de hidroxiapatita (HAP), fazendo com que eles sejam rapidamente removidos da corrente sanguínea e possuam como alvo a HAP da superfície mineral dos ossos em regiões de remodelação óssea ativa (ROGERS, 2003). Durante o período em que os BFs permanecem ligados às proteínas e dentro do tecido ósseo, não ocasionam efeitos anti-reabsortivos na região, pois não têm contato com células (KIMMEL, 2007).

A ligação BFs-HAP é rompida quando ocorre a reabsorção do tecido ósseo pelos osteoclastos (OCs), portanto, definindo assim a meia-vida dos BFs no tecido ósseo (LIN, 1996; RUSSELL; ROGERS, 1999; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; ROGERS et al., 2011). Esta meia-vida óssea é dependente da intensidade da remodelação óssea, a qual pode ser alterada pelos próprios BFs (ROELOFS et al., 2008). Kimmel, em 2007 relatou a permanência dos BFs no tecido ósseo por períodos que chegam a 10 anos (KIMMEL, 2007). E quando há o rompimento da ligação BFs-HAP, os BFs livres podem ligar-se a novos cristais de HAP, redistribuindo-se a outros sítios ósseos ou podem ser eliminados pela urina (LIN, 1996; KIMMEL, 2007; ROELOFS et al., 2008).

Doses elevadas de BFs podem impedir a mineralização normal de tecidos como osso, cartilagem, dentina e esmalte, aumentando a susceptibilidade a fraturas, e cicatrização alterada (BOONEKAMP et al., 1986). No entanto, a inibição da reabsorção óssea ocorre com doses até 1000 vezes menores do que a necessária para causar a inibição da mineralização (RUSSELL et al., 2007; ROELOFS et al., 2008).

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

Os OCs secretam prótons durante a reabsorção do tecido ósseo, ocasionando acidificação das lacunas de reabsorção, o que ajuda na digestão da matriz de proteínas (FLEISCH, 1998; RUSSELL et al., 1999). Acredita-se que a protonação (acidificação) dos

grupos fosfato resulte em uma diminuição na habilidade de quelar os íons cálcio, facilitando a liberação dos BFs ligados à superfície mineral óssea e consequentemente aumentando a concentração de BFs em solução nas lacunas de reabsorção (ROELOFS et al., 2008; EBETINO et al., 2011). Em fase fluida, a absorção dos BFs carregados negativamente ocorre via endocitose, 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).

Estudos com finalidade de melhor entendimento da atuação dos BFs sobre os OCs foram realizados em amebas *Dictyostelium slime mould amoeba*, e concluíram que o Medronato (metileno BFs) era metabolizado em análogos não hidrolisáveis metilenizados do ATP (KLEIN; MARTIN; SATRE, 1988; ROGERS et al., 2011). Posteriormente, outros autores demonstraram que outros S-BFs também apresentavam a mesma metabolização, e mostraram que havia acúmulo destes metabólitos do tipo AppCp, ocasionando citotoxicidade e inibição da proliferação das amebas (PELORGEAS; MARTIN; SATRE, 1992, ROGERS et al., 1992; ROGERS et al., 1994).

Em anos subsequentes, estudos *in vitro* e *in vivo* definiram que os S-BFs são metabolizados dentro dos OCs em análogos não hidrolisáveis metilenizados do ATP (tipo AppCp), que são tóxicos e acrescentaram que os mesmos induzem apoptose dos OCs, portanto, inibindo a reabsorção óssea (FRITH et al., 1997; FRITH et al., 2001; ROELOFS et al., 2008). Acredita-se que devido à 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) estes análogos do ATP induzem toxicidade (FRITH et al., 2001; COXON; THOMPSON; ROGERS, 2006). Há a hipótese que, a abertura dos poros de transição de permeabilidade, que leva à 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, seja causado pela hiperpolarização da camada interna da membrana mitocondrial devido à inibição da ANT pelo AppCC12p (COXON; THOMPSON; ROGERS, 2006; ROELOFS et al., 2008).

Os N-BFs não sofrem hidrólise, portanto, outras hipóteses foram estudadas para justificar o efeito inibitório destes na reabsorção óssea.

Os N-BFs inibem a enzima farnesil difosfato sintetase (FPP) da via do mevalonato (AMIN et al., 1992, 1996). Alguns N-BFs, como o AZ, também inibem outras enzimas desta via, incluindo a esqualeno sintetase, geranilgeranil difosfato (GGPP) sintetase, com menor

potência que a inibição sobre a FPP (GUO et al., 2007; ROELOFS et al., 2008). A via do mevalonato é responsável pela produção de colesterol e também pela formação de lipídios isoprenoides, os quais são substratos para isoprenilação de proteínas (NANCOLLAS et al., 2006; DUNFORD, 2010).

A maioria destas proteínas isopreniladas são Guanosina-trifosfatases (GTPases) (maioria geranylgeranilsiladas) que são sinalizadoras e regulam diversos processos de funcionamento dos OCs, incluindo, morfologia celular, sinalização de integrinas, bordas em escova, tráfico de endossomos e apoptose (WIDLER et al., 2002; GREEN, 2004; RUSSELL, 2006, 2007). Ao utilizar os N-BFs, as GTPases não seriam capazes de transferir os sinais para a membrana celular (RUSSELL et al., 1999; FLEISCH, 2002; RUSSELL, 2006), ocasionando a inatividade celular, perda de propriedades específicas da membrana que podem induzir a apoptose (BARTL et al., 2007).

2.3 OSTEONECROSE DOS MAXILARES ASSOCIADA AOS BISFOSFONATOS (OMAB)

Marx, em 2003, descreveu pela primeira vez a OMAB, relatando 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). A partir deste relato, outros autores publicaram série de casos de exposição óssea após terapia com Bisfosfonatos (RUGGIERO et al., 2004; BAMIAS et al., 2005; SANNA et al., 2005).

Devido à falta de definição precisa para tais lesões, a Academia Americana de Medicina Oral (AAOM) publicou em 2005 um artigo denominando estas complicações como osteonecrose associada aos BFs (MIGLIORATI et al., 2005). Este foi referência para novas publicações sobre o assunto pela Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) e Sociedade Americana para Pesquisa Óssea e Mineral (ASBMR) (MIGLIORATI et al., 2005; ADVISORY TASK FORCE ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS, 2007).

Em 2007, a AAOMS redefiniu a nomenclatura das lesões para osteonecrose dos maxilares associada ao uso dos BFs (OMAB) e a conceituou como uma exposição óssea que persiste por mais de 8 semanas na cavidade oral em pacientes em tratamento com bisfosfonatos e que não foram submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço (ADVISORY

TASK FORCE ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS, 2007). Mais recentemente, em 2014, na última publicação da AAOMS sobre o tema, houve uma nova alteração na nomenclatura, substituindo OMAB por Osteonecrose dos Maxilares associada a Medicamentos (OMAM), pois foi provado que outras drogas antirreabsortivas (Denosumab[®]) e inibidores da angiogênese também podem ocasionar exposição óssea semelhante à encontrada na OMAB (RUGGIERO et al., 2014). Porém, para melhor entendimento em nosso trabalho, manteremos a classificação de OMAB, pois a pesquisa foi realizada utilizando como medicamentos, os BFs.

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 estendendo para a base da mandíbula ou soalho do seio maxilar.

A OMAB ocorre mais frequentemente em pacientes que fazem uso de BFs por via endovenosa, geralmente o Pamidronato e AZ (FILLEUL; CROMPOT; SAUSSEZ, 2010). A maioria dos trabalhos citam as exodontias como um fator desencadeante, porém Marx mostrou 25% de ocorrência espontânea das lesões (MARX et al., 2005). A mandíbula é o osso mais comumente afetado, porém a maxila pode ser acometida isoladamente em 27% dos casos (MARX et al., 2005; FILLEUL; CROMPOT; SAUSSEZ, 2010).

Os achados histológicos específicos da OMAB são claramente definidos na literatura como áreas de osso não vital, com margens ásperas e lacunas de osteócitos vazias; ausência de sinais de remodelação, com escassos osteoblastos (OBs) e osteoclastos; áreas de espaço medular ampliados, tecido hipervascularizado e com abundante infiltrado inflamatório. Além disso, áreas de osso lamelar com lacunas vazias estão adjacentes a áreas de osso lamelar contendo

osteócitos viáveis. Comumente encontra-se contaminação por fungos e bactérias (FAVIA; PIOLLI; MAIORANO, 2009; BEDOGNI et al., 2008; FRANCO-PRETTO et al., 2014).

Apesar da necrose óssea, pode ser encontrado periósteo viável, indicando que os BFs não apresentam toxicidade direta aos osteoblastos, o que distingue das características apresentadas pelas lesões de osteorradionecrose (FRANCO-PRETTO et al., 2014). Uma das hipóteses descritas para este fenômeno é a remodelação óssea mais intensa apresentada pelo osso alveolar comparada a outros ossos do corpo, e devido à afinidade dos BFs por regiões com alta remodelação óssea, estes seriam depositados mais intensamente nos maxilares (ALLEN; BURR, 2009). No entanto, um estudo analisando a administração de Pamidronato com marcadores fluorescentes, demonstrou que a deposição desta droga nos maxilares é semelhante à que ocorre em ossos longos, como tíbia, fêmur, e menor que nas costelas e vertebrae de ratos (WEN et al., 2011).

A patofisiologia da OMAB, mesmo após anos de estudos, não é completamente compreendida (ALLEN; BURR, 2009).

Uma característica sobre o mecanismo de ação dos BFs é a inibição da farnesilpirofosfato sintetase, da via do mevalonato, que ocasiona uma diminuição da formação de lipídios isoprenoides e consequente redução de proteínas GTPases como RAS, RHO, RAC e RAB, que são proteínas responsáveis por diversas funções dos OCs (FLEISCH, 1998, 2002; KIMMEL, 2007). A diminuição ou não ativação destas proteínas ocasiona uma série de mudanças intracelulares nos OCs como, indução de apoptose, rompimento do citoesqueleto, e perda das bordas crenadas (KIMMEL, 2007). No entanto, o mecanismo completo responsável pela grande diminuição da remodelação óssea ao utilizar os BFs, assim como a patofisiologia da OMAB continuam sem resposta (OTTO et al., 2011).

Kimachi et al. (2011) relatou uma ação dos bisfosfonatos sobre a expressão de proteínas como RANKL e RANK induzida por TNF- α , as quais são reguladores cruciais para função e sobrevivência dos osteoclastos, e indução da migração e da diferenciação das células pré-osteoclásticas em regiões em reparo ósseo. Um anticorpo monoclonal anti-RANKL, que causa inibição da reabsorção óssea por competir com RANKL pela ligação com RANK, o Denosumab, também foi associado à osteonecrose dos maxilares (AGHALOO; FELSENFELD; TETRADIS, 2010), sugerindo que os efeitos dos BFs vão além da inibição da via do mevalonato.

2.4 MODELOS ANIMAIS DE OMAB

A partir do relato da OMAB por Marx em 2003, diversos estudos têm sido realizados. Porém uma questão ainda sem resposta intriga os pesquisadores, o porquê a OMAB ocorre principalmente nos maxilares, se a distribuição dos Bisfosfonatos é sistêmica? (MARX et al., 2005; TSURUSHIMA et al., 2013). Na tentativa de resposta, foram desenvolvidas algumas pesquisas em animais, e devido à facilidade no manuseio e a possibilidade de realizar procedimentos odontológicos como exodontias, os ratos foram os animais de escolha para tais estudos (SHARMA et al., 2013).

Biasotto et al. (2010) utilizaram 10 ratas maduras do tipo Wistar, e dividiu-as em grupo controle, sem uso de medicamentos; e grupo teste, nas quais administrou por via endovenosa AZ (0,04mg em solução salina) uma vez por semana durante 5 semanas. Após 2 semanas do término da terapia medicamentosa, os animais de ambos os grupos foram submetidos a procedimento cirúrgico sob anestesia geral para exodontia do primeiro molar superior, confeccionando um defeito ósseo de 4mm, sem a utilização de suturas. Análises, clínica, histológica, cintilográfica e tomográfica, foram realizadas, e o estudo foi tipo cego. O resultado mostrou que no grupo controle houve o processo fisiológico de cicatrização com epitelização do defeito ósseo. Já no grupo teste, houve deficiência na cicatrização dos tecidos moles e em análise histológica, apresentou osso necrótico, ausência de osteócitos nas lacunas e reabsorção periférica.

Um estudo realizado em 31 ratos Wistar comparou o efeito do Alendronato (0,05mg/kg) via oral, uma vez na semana durante 163 dias; e do Ácido Zoledrônico (0,6mg/kg) intraperitoneal a cada 28 dias durante 116 dias. Após 45 dias da primeira administração foi realizada exodontia dos molares superiores direitos, e após 150 dias do início da terapia, realizou-se o sacrifício dos animais. Foi observada perda da continuidade da mucosa em 72,2% dos animais tratados com Alendronato, e em 100% dos tratados com Ácido Zoledrônico. Em avaliação histológica, houve 80% de áreas com necrose óssea associada ao grupo do AZ e nenhum caso no grupo do Alendronato (MAAHS et al., 2010).

Modelos animais tratados com AZ também avaliam a relação da instalação de implantes e a ocorrência da OMAB, porém devido a anatomia dos ratos a instalação dos implantes é realizada em ossos longos, como tíbia e fêmur, sendo os resultados extrapolados para os maxilares. de Oliveira et al. (2015) utilizara 27 ratos Wistar divididos em, grupos 1 (3 dose semanais de AZ por via subcutânea), grupo 2 (3 doses semanais de AZ por via

subcutânea e 21 doses diárias de dexametasona por via subcutânea) e grupo 3 (grupo controle, os animais que recebem solução salina por via subcutânea). Foram instalados 2 implantes de titânio na tíbia de cada rato e os períodos de sacrifício foram de 7, 14 e 21 dias após o início dos procedimentos. No período de avaliação, grande quantidade de áreas de neoformação óssea medular foram observadas, em um padrão semelhante em todos os três grupos. Os autores não encontraram sinais de inflamação ou necrose óssea. Mostrando que o tratamento com AZ em combinação ou não com dexametasona não interferiu na vitalidade óssea periimplantar ou na deposição óssea medular. Entretanto consideram a importância da realização de futuros estudos com foco no osso alveolar.

Ainda permanece incerto porque a OMAB ocorre principalmente nos maxilares, sendo a administração da droga realizada por via sistêmica. As hipóteses que apresentam maior peso são (1) a alta velocidade na remodelação óssea nos maxilares, levando ao maior acúmulo dos bisfosfonatos, e (2) infecção bacteriana nos maxilares, que facilitaria o desenvolvimento da osteonecrose (TSURUSHIMA et al., 2013). Entretanto ainda faltam dados na literatura para justificar tais teorias, sendo necessários mais estudos para desvendar a ação destas drogas. Portanto, o desenvolvimento de modelos animais, que permitam comprovadamente a reprodução de lesões de osteonecrose e uma correlação da fisiologia da doença nos seres humanos, deve ser buscado.

2.5 AÇÃO DOS BISFOSFONATOS SOBRE OSTEOLASTOS, OSTEÓCITOS E FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR

Os efeitos dos BFs sobre os OBs não foram completamente desvendados (POZZI et al., 2010; MANZANO-MORENO et al., 2014). A inibição da reabsorção óssea pode ser mediada indiretamente pela ação dos Bisfosfonatos sobre os osteoblastos (ZARA et al., 2014). Estudos *in vitro* demonstraram que os BFs agindo sobre os OBs induzem a liberação de fatores que inibem a formação ou atividade dos osteoclastos aumentando a formação óssea mediada pelos osteoblastos (VITTÉ; FLEISCH; GUENTHER, 1996; VIEREKI et al., 2002; LEE et al., 2013).

A ação indireta dos osteoblastos na reabsorção óssea pode ser explicada através do sistema RANK/RANKL/OPG. As proteínas ligantes RANKL são bloqueadas pela osteoprotegerina (OPG). A osteoprotegerina é secretada por osteoblastos, e atua como

antagonista do receptor de RANKL (Figura 2.2), prevenindo a reabsorção óssea (NAIDU et al., 2008).

Fonte: LEE, 2010.

Figura 2.2 - Sistema RANK/RANKL/OPG.

Acredita-se que esta ação dos BF's 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 osteoblastos, como BMPs, ocasionada pela inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos (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).

Os efeitos dos BF's sobre os OB's parecem ser dose dependentes. O tratamento com BF's pode aumentar a proliferação de células osteoblásticas (XIONG et al., 2009), além de elevar a produção de proteínas de matriz extracelular (SIMON et al., 2010), secreção de fatores de crescimento e citocinas (NAIDU et al., 2008) e estimular a diferenciação e mineralização da matriz (KIM et al., 2009). Porém, estudos relataram que os BF's podem afetar negativamente a taxa de proliferação e diferenciação dos osteoblastos e inibir a mineralização da matriz óssea (ORRISS et al., 2009; POZZI et al., 2009). Tal contradição pode ser explicada, pois os efeitos benéficos dos BF's são exercidos quando administrados em concentrações baixas, e os efeitos inibitórios e de citotoxicidade, que podem levar à osteonecrose, podem ser encontrados quando utilizados em concentrações mais elevadas (ZARA et al., 2014). No entanto estudos *in vivo* não conseguiram comprovar esta hipótese.

A avaliação através da expressão de proteínas como a Fosfatase Alcalina (ALPL) pode ser realizada, pois os primeiros osteoblastos são caracterizados pela expressão de ALPL e de colágeno tipo I. Já os osteoblastos em fase final de desenvolvimento são mais cuboidais e expressam sialoproteína óssea e osteocalcina e a mineralização óssea esta associada com a sua fase final de diferenciação (ZARA et al., 2014).

Osteócitos são formados quando os osteoblastos sofrem transição fenotípica dramática à medida que são incorporados dentro da matriz óssea recém-depositada (MULLEN et al., 2013). Em comparação com os osteoblastos, osteócitos maduros expressam níveis mais baixos de marcadores de formação óssea tais como colágeno do tipo I, sialoproteína óssea, osteocalcina (OCN) e fosfatase alcalina (NAKANO et al., 2004; ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010). Vários estudos demonstraram que os osteócitos expressam marcadores específicos e seletivos, com um papel crítico na formação do osso e a homeostase de fósforo, tais como a proteína de matriz dentinária 1 (DMP1), fosfoglicoproteína da matriz extracelular (MEPE), endopeptidase neutra reguladora de fósforo (PHEX), Fator de Crescimento Fibroblástico 23 (FGF-23) e Esclerostin (Figura 2.3 e Tabela 2.1) (WINKLER et al., 2003; ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010; MULLEN et al., 2013).

Fonte: BONEWALD, 2011.

Figura 2.3 - Expressão de marcadores durante a evolução do osteoblasto a osteócito.

Tabela 2.1 - Marcadores ósseos envolvidos na diferenciação dos osteócitos.

Biomarcadores	Osteoblastos	Osteócitos Jovens	Osteócitos Maduros
Fosfatase Alcalina	++	-	-
Osteocalcina	++	+/-	+/-
DMP-1	-	++	+/-
MEPE	-	++	++

++ Presente; +/- Variável expressão; - Ausente ou presente em níveis inferiores de detecção

Fonte: Adaptado de ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010.

Pouco foi estudado sobre o efeito dos BFs sobre os osteócitos, porém quando lesões do tipo osteonecrose são observadas microscopicamente, estas apresentam lacunas vazias onde deveria haver osteócitos (ALLEN; BURR, 2009). A hipótese para este fato é que devido à falta de renovação celular da região, os osteócitos após o seu período normal de vida morrem, não sendo renovados, pois os osteoblastos não sofrem estímulo para neoformação óssea, não sendo aprisionados pelo tecido osteóide neoformado (ALLEN; BURR, 2009). Porém alguns trabalhos mostraram quantidades de Bisfosfonatos depositados nas lacunas dos osteócitos, podendo haver uma ação direta destes sobre os osteócitos (ROELOFS et al., 2008).

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, RUGGIERO et al., 2014). 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).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar 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 e em defeitos criados em fêmures do lado esquerdo de ratos *Wistar* em terapia com Ácido Zoledrônico e ratos controle, correlacionando estes resultados com o desenvolvimento da Osteonecrose dos Maxilares associada ao uso de Bisfosfonatos, 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 mRNA de proteínas envolvidas no processo de reparo ósseo correlacionadas aos OSTEOCLASTOS (RANK, RANKL, OPG), OSTEOBLASTOS (OCN, ALPL), OSTEOCITOS (PHEX e DMP-1) e a ANGIOGÊNESE (VEGF), pelo método de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR);
- avaliar se o modelo utilizado nesta pesquisa em sítio extra-oral para a avaliação da osteonecrose induzida por bisfosfonatos é um modelo válido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS 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, B e C).

4.1 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%.

4.2 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 à exodontia e defeito no fêmur;

- **Ácido Zoledrônico (AZ):** animais receberam Ácido Zoledrônico (Zometa[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) 0,6 mg/kg e NÃO foram submetidos à exodontia e defeito no fêmur;
- **Controle experimental (CO-exp):** animais receberam cloreto de sódio 0,9% no mesmo volume que outras medicações e foram submetidos à exodontia dos molares superiores direitos e defeito no fêmur esquerdo;
- **Ácido Zoledrônico experimental (AZ-exp):** animais receberam Ácido Zoledrônico (Zometa[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) 0,6 mg/kg e foram submetidos à exodontia dos molares superiores direitos e defeito no fêmur esquerdo.

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 a 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 do volume da solução a ser injetada.

A seguir estão descritos a distribuição dos grupos, o número de animais por grupo e a distribuição dos animais por tipo de experimento (Figura 4.1).

Figura 4.1 - 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 doses 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. Maahs et al. (2011) justificam que a dose de 0,6 mg/kg pode ser considerada pouco elevada, no entanto o intervalo de administração foi mensal e que sua segurança é suportada por estudos pré-clínicos *in vivo*.

Como foi realizada a análise molecular por qPCR 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.

4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Passados 45 dias do início do experimento os animais dos grupos CO-exp e AZ-exp foram submetidos ao procedimento cirúrgico, à exodontia do primeiro, segundo e terceiro molares superiores do lado direito e defeito ósseo no fêmur esquerdo (Figura 4.2).

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

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral com uma combinação de cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands®, 25 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands®, 10 mg/kg) por via intramuscular com uma agulha 13 x 0,45 mm (Figura 4.3) (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 4.3 - 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 4.4).

Figura 4.4 - **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.

Realizadas as exodontias os animais foram posicionados em decúbito lateral, sendo realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm na região lateral do quadril esquerdo com posterior divulsão dos tecidos musculares com tesoura de íris chegando até o periósteo da epífise do fêmur esquerdo (Figura 4.5). Após o descolamento do periósteo com esculpador Hollemback nº 3ss, foi realizado o defeito ósseo 2,0 mm de diâmetro na epífise proximal do fêmur esquerdo com uma broca carbide nº 8 em baixa rotação com irrigação abundante com soro fisiológico (Figura 4.6).

Figura 4.5 - Incisão, divulsão dos planos e exposição de epífise do fêmur esquerdo.

Figura 4.6 - Exposição da face lateral da epífise femoral esquerda, confecção de defeito ósseo com broca carbide nº 8, medição do diâmetro do defeito e sutura com seda 4.0.

Concluídos os procedimentos cirúrgicos os alvéolos não foram suturados e na região do fêmur, os retalhos foram suturados com fio reabsorvível polyvicryl no 5.0 (Ethicon® – Johnson & Johnson) e fio não reabsorvível de seda no 4.0 (Ethicon® – Johnson & Johnson). Sendo os últimos retirados após um período de 5 dias de pós-operatório.

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.

4.4 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 4.7).

Figura 4.7 - 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 4.8).

Figura 4.8 - Maxila coletada com sutura com seda 4.0 na região anterior para fazer a inclusão.

As maxilas escolhidas para a análise molecular por qPCR foram seccionadas na rafe palatina e todo o tecido mole dissecado e removido. As hemi-maxilas foram avaliadas de forma independente. No entanto foram analisadas somente as maxilas esquerdas nos animais dos grupos que não foram submetidos a cirurgia assumindo a denominação CO-M e AZ-M, e as maxilas direitas dos grupos cirúrgicos que assumiram a denominação de CO-M-exp e AZ-M-exp (Figura 4.9).

Figura 4.9 - Distribuição de denominação dos grupos das maxilas para o estudo de qPCR. Azul as maxilas que foram utilizadas em cada grupo e em vermelho as que não foram utilizadas para o *RealTimePCR*.

Os membros inferiores foram desarticulados e os tecidos em excesso removidos com auxílio de lâminas de bisturi número 15, sendo, neste momento, ambos os fêmures avaliados macroscopicamente para presença ou ausência de anormalidades ou atraso no processo de reparo ósseo (Figuras 4.10 e 4.11).

Figura 4.10 - Fêmur direito e esquerdo desarticulados.

Figura 4.11 - Fêmur esquerdo evidenciando o defeito e após preparo para processamento histológico e análise molecular.

Assim como as hemi-maxilas os fêmures direito e esquerdo foram avaliados de forma independente, sendo caracterizadas como 2 amostras por animal. A denominação nos grupos sem cirurgia foi CO-F e AZ-F e nos grupos cirúrgicos CO-F-exp e AZ-F-exp (Figura 4.12).

Figura 4.12 - Distribuição de denominação dos grupos dos fêmures para o estudo de *RealTime*PCR. Azul os fêmures que foram utilizados em cada grupo e em vermelho os que não foram utilizados para o *RealTime*PCR.

4.5 PREPARO PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA

As maxilas e os fêmures 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 e os fêmures incluídos foram submetidos a cortes transversais semisseriados de 4 µm de espessura que contemplava os alvéolos pós-exodontia dos molares superiores direitos, da região de molares superiores contralaterais preservados, a área do defeito realizado no fêmur esquerdo e área da epífise proximal do fêmur direito. 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.

Para cada fêmur foram confeccionadas 2 laminas por defeito/região do defeito contendo 3 cortes por lâmina. O objetivo era abranger a área total do defeito ósseo para análise microscópica.

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).

4.5.1 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 e osso total no sítio das exodontias com o auxílio do software Axio Vision Rel 4.8 Ink (Carl Zeiss).

As análises quantitativas das variáveis osteonecrose e 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 µm². A variável sequestro ósseo foi avaliada quanto a sua presença ou ausência nos cortes estudados.

Figura 4.13 - (A, B e C) Cortes histológicos mostrando a realização da análise microscópica quantitativa através do ROI e a demarcação nas **B e C** das áreas a serem medidas. Em cor preta no menor aumento está demarcado o tecido ósseo. **C:** mostra a demarcação em maior aumento das áreas de osteonecrose e sequestro ósseo.

A análise microscópica qualitativa dos fêmures foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico binocular (Olympus Optical do Brasil Ltda, modelo CH-2), sendo escolhidos 3 cortes da área do defeito realizado nos fêmures esquerdos que incluíssem a região mesial, central e distal de cada defeito.

As imagens histológicas destas regiões 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 4x de aumento.

Para a captura das imagens foi delimitada uma área específica que foi padronizada utilizando as medidas feitas no lado contralateral do fêmur, além do diâmetro da broca utilizada para a criação do defeito sendo feita uma média do tamanho da medular e o diâmetro da broca. Foram utilizadas como referências a porção mais medial do defeito criado no fêmur e, com isso definimos um ROI (region of interest) de 2000 µm de largura por 1500 µm de altura

As imagens digitalizadas foram gravadas em formato TIFF, sendo realizada a transformação da imagem em binário através da ferramenta Threshold interative do software AxioVision Rel. 4.8 Ink (Carl Zeiss Microimaging, GmbH, Gottingen, Alemanha). Uma análise qualitativa descritiva e também uma análise quantitativa da variável osso total na área do defeito no fêmur com auxílio do software Axio Vision Rel 4.8 Ink (Carl Zeiss) através da ferramenta Measure – Start Seletive Measure, na qual apenas as áreas correspondentes a osso foram selecionadas.

A variável sequestro ósseo foi avaliada quanto a sua presença ou ausência nos cortes estudados.

Figura 4.14 - (A, B) Cortes histológicos mostrando a realização da análise microscópica quantitativa e ROI. **C:** mostra imagem em binário com as áreas preenchidas por osso sendo marcadas em branco.

As análises quantitativas e qualitativas da maxila e fêmur foram realizadas, somente, nos grupos que foram submetidos a intervenção cirúrgica.

4.6 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).

4.6.1 Extração do RNA

Depois de realizada a eutanásia dos animais do estudo, as hemi-maxilas direita e esquerda, e os fêmures direito e esquerdo de 6 animais de cada grupo foram limpos, removido todo tecido mole (gengiva, mucosa palatina e periósteo) e armazenados 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 e os fêmures foram triturados em moinho criogênico 6770 *Freezer/Mill* (SPEX SamplePrep[®], Metuchen, NJ), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Qiagen[®], Alemanha). Para a extração do RNA, 30 mg do material triturado das amostras foram logo colocados em tubos de microcentrifuga de 2 ml e misturados com 1ml de TRIzol[®] (Life Technologies). Os tubos foram agitados em “vortex” por 2 minutos e o homogenato foi incubado por 5 minutos a $15-30^{\circ}\text{C}$.

Foi adicionado ao tubo 200 μl de clorofórmio para cada ml de TRIzol[®] utilizado, foram agitados em “vortex” durante 15 segundos e incubados de 2-3 minutos a $15-30^{\circ}\text{C}$.

A seguir foram centrifugados a 13.000g por 15 minutos a 4°C .

A fase aquosa superior, aproximadamente 400 μl , foi transferida para um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5ml. Nesses tubos foram adicionados 1 volume igual ao da fase aquosa ($\approx 400 \mu\text{l}$) 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 400 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 microcentrifuga 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 microcentrifuga 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 microcentrifuga de 1,5 ml sendo adicionados 30 μ l 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). Este processo de extração de RNA seguiu o protocolo de Kelly e col, 2014.

4.6.2 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 μ l 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 μ g/mL. A relação A_{260}/A_{280} foi calculada, sendo considerada aceitável entre 1,9 e 2,1, indicando ausência de DNA nas amostras.

4.6.3 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 μ l) 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 μ l de *gDNA wipeout* (fornecido no kit *Quantitect Reverse Transcription*®, Qiagen®, Alemanha), fazendo um volume total de 14 μ l, durante 2 minutos a 42°C e sendo colocado imediatamente no gelo após os 2 minutos durante 1 minuto.

Em seguida foi adicionado, ao RNA tratado com *gDNA wipeout* (fornecido no kit *Quantitect Reverse Transcription*®, Qiagen®, Alemanha), uma mistura preparada com 1 μ L

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, está foi incubada a 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 da Disciplina de Farmacologia da FOB-USP. Todo experimento foi realizado de acordo com o recomendado pelo fabricante (Qiagen[®], Alemanha).

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

A quantificação da expressão de RNAm de fatores integrantes do reparo ósseo alveolar ALPL, DMP-1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL e VEGF foi realizada através de reações de PCR em tempo real (*RealTimePCR*) em um aparelho *ViiA[™]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 4.15.

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.

Alvo (primers)	Número Catálogo
<i>RPL-13</i>	RN00821258_G1
<i>OCN (BGLAP)</i>	RN00566386_61
<i>ALP (ALPL)</i>	RN01516028_M1
<i>VEGF</i>	RN01511601_M1
<i>RANK</i>	RN01426423_M1
<i>RANKL</i>	RN00589289_M1
<i>OPG (TNFrsf11b)</i>	RN00563499_M1
<i>PHEX</i>	RN00448130_M1
<i>DMP-1</i>	RN01450122_M1

Figura 4.15 - Número de catálogo dos kits de PCR inventoriados (Applied Biosystems) utilizados nesta pesquisa.

Para todas as reações de *RealTime*PCR, 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 µM). 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 RPL-13, 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.

As reações de qPCR 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.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da avaliação microscópica qualitativa da presença e ausência de sequestro ósseo na região dos alvéolos dentários após as exodontias e no defeito ósseo realizado no fêmur dos grupos CO-exp e AZ-exp, foram submetidos ao teste do exato de Fischer.

Na análise microscópica quantitativa entre os grupos CO-exp e AZ-exp, tanto na maxila quanto no fêmur, 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. Os resultados encontrados na análise microscópica quantitativa das variáveis osteonecrose e osso total, e molecular das variáveis ALPL, OCN, OPG, DMP-1, PHEX, RANK, RANKL e VEGF foram inicialmente submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS).

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.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Nenhum dos 48 animais utilizados na pesquisa foi a óbito durante o período experimental. Os animais apresentaram discreta perda de peso após a realização das cirurgias, que foi recuperada no período pós-operatório. A administração de AZ não acarretou alterações dignas de nota no comportamento fisiológico dos animais.

5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA DA MAXILA

A avaliação microscópica qualitativa da maxila foi descrita no trabalho de Zen Filho et al. (2014). A análise das maxilas dos animais nas regiões dentadas não mostrou alterações dignas de nota entre os grupos estudados. Na região das exodontias dos molares superiores no grupo CO-M-exp a maioria dos animais apresentava reparo ósseo com formação de tecido ósseo maduro.

Os alvéolos das regiões das exodontias do grupo CO-M-exp, 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-M-exp 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 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-M-exp em comparação com o grupo CO-M-exp, sendo, também, maiores em extensão no grupo AZ-M-exp.

Nas regiões dos alvéolos das exodontias dos molares foi observada a formação de reação periosteal (RP) na cortical óssea vestibular (*) nos animais do grupo CO-M-exp e AZ-M-exp. Na análise qualitativa as reações periosteais aparentavam ser de maior intensidade no grupo CO-M-exp em comparação com as do grupo AZ-M-exp. Estas reações periosteais parecem ser estimuladas pela sindesmotomia realizada durante as exodontias.

Foram escolhidas algumas áreas das regiões dos 1º molares (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3), que fossem representativas das características encontradas na análise qualitativa.

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

5.1.1 Imagens dos alvéolos dos 1º molares

Figura 5.1 - Imagens dos cortes histológicos da região dos alvéolos de áreas de exodontias de 1º molar de ratos do grupo **CO-M-exp** 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 (*) dos rebordos alveolares com uma reação periosteal (RP).

Figura 5.2 - Imagens dos cortes histológicos de regiões mesial (A) e central (B) da região da exodontia do 1º molar do mesmo animal do grupo AZ-M-exp 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-M-exp. 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.

Figura 5.3 - 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-M-exp** 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.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA DO FÊMUR

A análise qualitativa dos fêmures dos animais nas regiões sem defeitos ósseos não mostrou alterações dignas de nota entre os grupos estudados CO-F, AZ-F, CO-F-exp e AZ-F-exp. Na região dos defeitos ósseos no grupo CO-F-exp a maioria dos animais apresentava reparo ósseo com formação de tecido ósseo maduro e organização tecidual reestabelecendo a cortical óssea e a delimitação da medula óssea do fêmur.

Esta organização tecidual não foi observada em alguns animais do grupo AZ-F-exp que apresentavam na área central do defeito uma fenda, provocando uma invaginação em direção a medula óssea, que formava uma solução de continuidade na cortical óssea neste defeito. Além disso, trabéculas ósseas neo-formadas eram visualizadas dentro da medula do fêmur, em alguns casos obliterando grande parte desta área. A análise qualitativa sugeria uma maior neoformação óssea, principalmente no interior da medula óssea dos fêmures, nos animais do grupo AZ-F-exp em comparação aos animais do grupo CO-F-exp, este fato dava a clara ideia de maior quantidade de osso total na área do defeito no grupo AZ-F-exp.

Áreas de osteonecrose e de sequestro ósseo não foram encontradas nos grupo AZ-F-exp e no grupo CO-F-exp, fato bem diferente do observado na maxila dos mesmos grupos de estudo.

Nas regiões dos defeitos dos fêmures foi observada a formação de reação periosteal (RP) na cortical óssea externa animais do grupo CO-F-exp e AZ-F-exp, esta RP era condizente com a área do descolamento realizado para acesso a epífise proximal dos fêmures. Na análise qualitativa das reações periosteais não conseguimos diferenciar a intensidade entre os grupos CO-F-exp e AZ-F-exp.

Foram escolhidas e fotografadas algumas áreas das regiões dos defeitos dos fêmures (Figuras 5.4 e 5.5) que fossem representativas das características encontradas na análise qualitativa.

As estruturas representadas foram identificadas como: invaginação cortical (IC), tecido ósseo (TO), sequestro ósseo (SO), reação periosteal (RP) e medula óssea (MO).

5.2.1 Imagens dos fêmures região dos defeitos ósseos

Figura 5.4 - Imagens dos cortes histológicos das regiões dos defeitos ósseos nos fêmures do grupo **CO-F-exp (A e B)**; área do defeito ósseo que apresenta reparo com tecido ósseo (**TO**) com permanência dos limites do defeito ósseo apresentando reação periosteal discreta (**RP**) e mantendo a integridade e o volume da medula óssea do fêmur (**MO**). H.E., 4x.

Figura 5.5 - Imagens dos cortes histológicos das regiões dos defeitos ósseos nos fêmures do grupo **AZ-F-exp (A e B)**; área do defeito ósseo que apresenta reparo com tecido ósseo (**TO**) com permanência dos limites do defeito ósseo e área de invaginação central formando uma fenda na área de reparo ósseo (**IC**), apresenta reação periosteal discreta (**RP**) e medula óssea do fêmur (**MO**) sendo invadida por osso neoformado (**TO**) diminuindo seu volume. H.E., 4x.

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA DA MAXILA

A avaliação microscópica quantitativa da maxila foi descrita no trabalho de Zen Filho (2014). Na análise microscópica das áreas dos alvéolos onde foram realizadas as exodontias dos molares superiores dos grupos CO-M-exp e AZ-M-exp, foi realizada avaliação quanto à frequência (presença/ausência) de sequestro ósseo. Os sequestros ósseos estavam presentes em todos os animais do grupo AZ-M-exp (100%) e em nenhum animal do grupo CO-M-exp (0%) nas regiões das exodontias dos molares superiores (Tabela 5.1). O teste de exato de Fischer, ao nível de significância de 5% demonstrou diferença estatística com o grupo AZ-M-exp, associado à presença de sequestros ósseos ($p=0,0022$).

Tabela 5.1 - Frequência da presença/ausência de sequestro ósseo na região dos alvéolos nas áreas das exodontias dos molares superiores nos grupos CO-M-exp e AZ-M-exp.

GRUPO	Sequestro ósseo*			
	Presente		Ausente	
	n	%	n	%
CO-M-exp	0	0	6*	100
AZ-M-exp	6*	100	0	0

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

As regiões dos alvéolos dentários das exodontias dos molares superiores nos grupos CO-M-exp e AZ-M-exp, foram analisadas quantitativamente para área de osteonecrose e área de osso total dos alvéolos. As áreas dessas 2 variáveis foram quantificadas em 3 cortes escolhidos por dente que abrangiam região mesial, central e distal de cada da 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 5.2 e 5.3 e Figura 5.6. 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 5.2 - 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-M-exp e AZ-M-exp. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student não pareado e Mann-Whitney ao nível de significância de $p < 0,005$.

OSTEONECROSE							
	CO-M-exp			AZ-M-exp			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 5.3 - 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-M-exp e AZ-M-exp. 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-M-exp			AZ-M-exp			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*

Figura 5.6 - Gráficos mostrando as áreas de osteonecrose (A) e osso total (B) das regiões dos 1º, 2º, 3º molares e área total (soma das áreas do 1º, 2º, 3º molares). Os resultados apresentados representam as médias $\pm$ 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.

5.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA DO FÊMUR

Na análise microscópica das áreas dos fêmures onde foram realizados os defeitos ósseos dos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp, foi realizada avaliação quanto à frequência (presença/ausência) de sequestro ósseo. Todos os animais tanto do grupo CO-F-exp (100%) quanto do grupo AZ-F-exp (100%) não apresentavam sequestros ósseos nas áreas dos defeitos ósseos (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Frequência da presença/ausência de sequestro ósseo na região dos defeitos do fêmur nos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp.

GRUPO	Sequestro Ósseo			
	Presente		Ausente	
	n	%	n	%
CO-F-exp	0	0	6	100
AZ-F-exp	0	0	6	100

As regiões dos defeitos dos fêmures nos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp, foram analisadas quantitativamente somente para área de osso total dos alvéolos, pois como não foram encontradas áreas de sequestros ósseos e osteonecrose, estas variáveis não puderam ser avaliadas.

As áreas foram quantificadas em 3 cortes escolhidos por defeito que abrangiam região mesial, central e distal, sendo feita a média dos resultados a qual foi utilizada para a análise estatística. Os resultados da média, desvio padrão (DP) e mediana estão apresentados na Tabela 5.5 e Figura 5.7. 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. Em todos os testes estatísticos foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,005$).

Tabela 5.5 - Média, DP e mediana das áreas em μm^2 do **osso total** nas lâminas coradas por H.E. dos defeitos nos fêmures dos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp. Os dados foram analisados estatisticamente pelos teste “t” de Student não pareado ao nível de significância de $p < 0,005$.

OSSO TOTAL							
	CO-F-exp			AZ-F-exp			p
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
Fêmur	1287194,1	424512,04	1344575,965	1636858,9	269970,71	1669137,09	0,1195

Figura 5.7 - Gráfico mostrando as áreas de osso total das regiões dos defeitos ósseos nos fêmures. Os resultados apresentados representam as médias $\pm$ DP por grupo e a área em cada defeito.

5.5 ANÁLISE MOLECULAR

A concentração de RNA total das amostras obtido após a extração por ser visualizada na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Concentração de RNA total nas amostras obtidos em um espectrofotômetro *Nanodrop*[®]. Resultados expressos em ng/ μL .

CONCENTRAÇÃO RNA					
Fêmur			Maxila		
Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana
435,13875	155,60876	415,565	172,19167	114,2411	134,675

5.5.1 Análise molecular da maxila

A expressão quantitativa do RNAm da ALPL, DMP-1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL e VEGF foi realizada através de reações de qPCR, utilizando-se o sistema *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um aparelho *ViiA*[™] 7 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

A expressão de RANK aumentou nos grupos AZ-M, CO-M-exp e AZ-M-exp, e houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-M x AZ-M-exp. Na variável RANKL observamos aumento na expressão nos grupos AZ-M, CO-M-exp e AZ-M-exp, apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-M x AZ-M e CO-M x AZ-M-exp. Houve aumento na expressão de OPG nos grupos CO-M-exp e diminuição no grupo AZ-M-exp e a diferença entre os grupos CO-M-exp x AZ-M-exp foi estatisticamente significativa.

Na variável ALPL encontramos aumento nos níveis de expressão nos grupos AZ-M e CO-M-exp, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A expressão de OCN diminuiu nos grupos AZ-M e AZ-M-exp, e aumentou no grupo CO-M-exp, evidenciando diferença estatisticamente significativa entre os grupos AZ-M x CO-M-exp e CO-M-exp x AZ-M-exp.

Na variável DMP-1 observamos diminuição na expressão dos grupos AZ-M e AZ-M-exp, no entanto sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Aumento na expressão de PHEX ocorreu nos grupos CO-M-exp e diminuição no AZ-M, houve diferença estatisticamente significantes na comparação entre os grupos CO-M x CO-M-exp, AZ-M x CO-M-exp e CO-M-exp x AZ-M-exp.

Na variável VEGF observamos expressão aumentada nos grupos AZ-M, CO-M e AZ-M-exp e diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-M x AZ-M-exp, AZ-M x AZ-M-exp e CO-M-exp x AZ-M-exp.

A Figura 5.8 representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados nas maxilas (ALPL, DMP1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL e VEGF). As tabelas com os resultados da expressão dos alvos estudados na maxila encontram-se no Apêndice A.

Figura 5.8 - Expressão de marcadores ósseos e vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas dos animais dos grupos CO-M, AZ-M, CO-M-exp e AZ-M-exp foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de ALPL, DMP1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL e VEGF foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.

5.5.2 Análise molecular do fêmur

A expressão quantitativa do RNAm da ALPL, DMP-1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL e VEGF foi realizada através de reações de qPCR, utilizando-se o sistema *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um aparelho *ViiA*[™] 7 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Na expressão de RANK observamos aumento nos grupos AZ-F e AZ-F-exp e diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-F x AZ-F e CO-F x AZ-F-exp. A expressão de RANKL aumentou nos grupos AZ-F e AZ-F-exp e houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-F x AZ-F e CO-F x AZ-F-exp. Aumento na

expressão de OPG ocorreu nos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp e houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-F x CO-F-exp e AZ-F x CO-F-exp.

A expressão de ALPL apresentou aumento nos seus níveis nos grupos AZ-F e AZ-F-exp, e houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-F x AZ-F-exp. Já a expressão de OCN diminuiu no grupo AZ-F e aumentou no grupo CO-F-exp e AZ-F-exp e apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-F x CO-F-exp, AZ-F x CO-F-exp e CO-F-exp x AZ-F-exp.

Na variável DMP-1 observou-se um aumento na expressão dos grupos AZ-F, CO-F-exp e AZ-F-exp e diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos CO-F x AZ-F-exp, AZ-F x AZ-F-exp e CO-F-exp x AZ-F-exp, e na expressão de PHEX houve aumento nos grupos AZ-F, CO-F-exp e AZ-F-exp e diferença estatisticamente significantes na comparação entre os grupos CO-F x CO-F-exp, CO-F x AZ-F-exp e AZ-F x AZ-F-exp.

Na variável VEGF observamos aumento nos grupos AZ-F, CO-F-exp e AZ-F-exp e diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-F x AZ-F-exp.

A Figura 5.9 representa os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados nos fêmures (ALPL, DMP1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL e VEGF). As tabelas com os resultados da expressão dos alvos estudados no fêmur encontram-se no Apêndice B.

Figura 5.9 - Expressão de marcadores ósseos e vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras dos fêmures dos animais dos grupos CO-F, AZ-F, CO-F-exp e AZ-F-exp coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de ALPL, DMP1, OCN, OPG, PHEX, RANK, RANKL, e VEGF foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.

O resultado da expressão para osteoclastos (Figura 5.10), osteoblastos (Figura 5.11), osteócitos (Figura 5.12) e vascularização (Figura 5.13) representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, fazendo a comparação entre as maxilares e os fêmures.

(*)= Teste Kruskal-Wallis; (**) = Teste ANOVA.

Figura 5.10 - Expressão de marcadores ósseos para osteoclastos nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANK, RANKL e OPG foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.

(*)= Teste Kruskal-Wallis; (**) = Teste ANOVA.

Figura 5.11 - Expressão de marcadores ósseos para osteoblastos nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de ALPL e OCN foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.

(**)= Teste ANOVA

Figura 5.12 - Expressão de marcadores ósseos para osteócitos nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DMP-1 e PHEX foram analisados através de qPCR. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.

(*)= Teste Kruskal-Wallis; (**)= Teste ANOVA

Figura 5.13 - Expressão de marcador de vascularização nos grupos e regiões estudadas. As amostras das maxilas e fêmures dos animais dos grupos CO, AZ, CO-exp e AZ-exp foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de VEGF foram analisados através de *RealTimePCR*. Os resultados apresentados representam os valores médios $\pm$ DP de CT dos alvos estudados, normalizados pela expressão da RPL-13 obtidos de 6 animais de cada grupo.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O modelo animal utilizado em nosso estudo, foi inicialmente desenvolvido por Maahs et al. (2011) e comprovada sua eficiência no desenvolvimento de lesões do tipo OMAB no estudo de Zen Filho (2014), utilizando somente áreas após exodontia para avaliação. Este modelo animal permitiu realizar comparações entre sítios intra e extra-bucais com o objetivo de elucidar peculiaridades do efeito do Ácido Zoledrônico sobre os maxilares e sobre o fêmur, identificando diferenças que podem ser importantes para o desenvolvimento da OMAB. Poucos estudos experimentais e clínicos têm como objetivo determinar os fatores que influenciam os efeitos dos BFs nos maxilares e ossos longos (ERDOGAN et al., 2014).

Não foram encontrados na literatura estudos que, através da análise molecular, comparem a função de osteócitos nos maxilares e em ossos longos em modelo de OMAB. Entretanto nossos resultados histológicos e a avaliação molecular sugerem que a função do osteócito foi prejudicada na OMAB.

Os animais dos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp não apresentaram lesões clínicas no fêmur, nem qualquer outro sinal de alteração macroscópica, fato que corrobora o estudo de Tsurushima et al. (2013). No entanto, nas maxilas foram encontradas lesões de solução de continuidade da mucosa oral em ambos os grupos submetidos a procedimentos cirúrgicos, mas estas lesões ocorriam principalmente no grupo AZ-M-exp, apresentando exposição de tecido ósseo, e que, após avaliação histológica, observou-se relação desta exposição óssea com áreas de osteonecrose e/ou sequestros ósseos (ZEN FILHO, 2014).

Nos grupos em que os animais não foram submetidos a procedimentos cirúrgicos (CO e AZ), não foram encontradas lesões espontâneas, tanto na maxila quanto no fêmur. Este fato demonstra que as extrações dentárias são fatores importantes no desenvolvimento da OMAB, assim como mostrou Maahs et al. (2011). Em contrapartida, o trauma causado ao fêmur pela criação do defeito ósseo não parece ser um fator primordial para o desencadeamento da OMAB.

O processo de reparo ósseo no fêmur foi estudado através de modelos simulando fraturas ósseas. Os primeiros 7 a 10 dias, é a fase de condrogênese e intensa resposta inflamatória. Aos 14 dias o osso começa a se formar abaixo do periósteo e aos 21 dias (4 ou 5 semanas nos humanos) a fratura apresenta-se estável. No período de 28 a 35 dias há uma combinação de cartilagem calcificada e osso neoformado que posteriormente sofrerá a ação

dos osteoclastos remodelando o calo ósseo e a estrutura óssea então, será convertida em osso lamelar capaz de suportar as forças mecânicas (EINHORN, 2005).

O processo de reparo ósseo dos alvéolos de ratos ocorre em cerca de 60 dias. Neste período, nos primeiros 30 dias ocorre a proliferação celular, formação óssea inicial e cobertura dos alvéolos com epitélio da mucosa bucal. O completo preenchimento por osso lamelar ocorre após 60 dias da realização das extrações (PIETROKOVSKI, 1967; PIETROKOVSKI; MASSLER, 1967; DE CARVALHO; OKAMOTO; DE CARVALHO, 1982; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1985).

Seguindo esta cronologia de reparo ósseo alveolar e femoral, em nosso estudo, a eutanásia dos animais foi realizada 105 dias após as extrações dos molares superiores e a criação dos defeitos ósseos nos fêmures. Portanto, seria esperado um completo reparo dos alvéolos e dos defeitos ósseos com formação de tecido ósseo maduro.

Na análise qualitativa dos cortes histológicos, pudemos observar que nos animais do grupo CO-M-exp 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 (ZEN FILHO, 2014). A análise qualitativa dos animais do grupo CO-F-exp, mostrou um reparo normal semelhante ao reparo que ocorreu na maxila. Houve formação de tecido ósseo maduro, reestabelecendo a cortical óssea. Importante ressaltar, que neste grupo de animais, a análise do reparo em maxila e fêmur não evidenciou sinais de osteonecrose.

No grupo AZ-M-exp a maioria dos animais apresentou atraso no reparo ósseo dos alvéolos, com formação de áreas de osteonecrose e sequestro ósseo. Em grande parte dos cortes histológicos analisados, os sequestros ósseos estavam circunscritos por um infiltrado inflamatório mais intenso. Os alvéolos dos animais do grupo AZ-M-exp apresentavam menor perda em altura e volume da área total, em comparação com o ocorrido no grupo CO-M-exp, com uma diminuição da reabsorção das cristas alveolares e dos septos interradiculares, e formação de sequestros ósseos em grande parte nestas regiões.

Nossos resultados corroboram Hokugo et al. (2010), que relataram presença de sequestro ósseo com características preservadas da estrutura alveolar, indicando ausência de reabsorção óssea das cristas alveolares 4 semanas após a extração dos molares superiores de ratos em terapia com AZ (HOKUGO et al., 2010). Durante a realização das exodontias em nossa pesquisa, sugere-se ter ocorrido microfraturas nas áreas de septo e crista óssea alveolar.

Devido à ação do AZ, a função dos OCs e a remodelação óssea tornaram-se comprometidas, não ocorrendo reparo ou consolidação óssea nas regiões fraturadas. Desta forma ocorre à morte dos osteócitos com consequente necrose do tecido ósseo, e formação de sequestros ósseos das regiões de cristas alveolares e septos interradiculares.

A análise qualitativa do grupo AZ-F-exp não apresentou a mesma organização tecidual encontrada nos animais do grupo CO-F-exp. No grupo AZ-F-exp, foi evidenciada a formação de uma fenda na área central do defeito, provocando uma invaginação em direção à medula óssea do fêmur. Além disso, trabéculas ósseas neo-formadas foram visualizadas dentro da medula, e em alguns casos obliterou grande parte desta área, fornecendo sinais de maior quantidade óssea no grupo AZ-F-exp.

Apesar de modelos diferentes este achado corrobora Amanat et al. (2007) que afirmam que uma única dose sistêmica de AZ aumenta o volume e a quantidade de osso nos calos ósseos, além da resistência na área de reparo de fraturas em tíbias de ratos. Palacio et al. (2012) realizando testes biomecânicos encontraram que o AZ, aumentou significativamente a carga máxima suportada, e reduziu o coeficiente de rigidez na região proximal do fêmur de ratas ovariectomizadas.

As áreas de osteonecrose foram analisadas quanto à presença ou ausência de sequestros ósseos, e posteriormente, foram quantificadas. Nossos resultados assemelham-se aos encontrados por Maahs et al. (2011), ausência de necrose nos animais do grupo CO-M-exp e presença de sequestros ósseos em 100% dos animais do grupo AZ-M-exp, corroborando o estudo de Vasconcelos et al. (2012).

A análise do fêmur destacou-se, pois não foram encontradas áreas de osteonecrose e de sequestro ósseo nos grupos AZ-F-exp e no grupo CO-F-exp, apesar de ser observado osteonecrose nas maxilas em 100% dos animais submetidos à exodontias e em terapia com AZ. Nos achados de osteonecrose evidenciamos que existe diferença no fator etiológico para o desenvolvimento da OMAB entre os ossos gnáticos e o fêmur. Portanto a utilização de modelos utilizando ossos extra gnáticos para o estudo da OMAB parece ser equivocado. de Oliveira et al. (2015) enfatizam a importância da realização do mesmo modelo por eles utilizado em osso alveolar, pois após a instalação de implantes na tíbia não houve diferenças significativas no reparo periimplantar entre os animais com e sem a administração do AZ.

Nas avaliações histológicas, também foi observado uma reação periosteal significativa, e na pesquisa de Zen Filho (2014) esta reação foi avaliada quantitativamente e

não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos CO-M-exp e AZ-M-exp. Durante a avaliação do fêmur nos animais dos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp percebemos que a reação periosteal estava mais relacionada à quantidade do descolamento realizado no momento da cirurgia, não sendo influenciado pelo tratamento com AZ.

Apesar de nos cortes avaliados, ser observado maior área de osso total nos alvéolos e nos defeitos ósseos no fêmur, e os resultados mostrarem uma tendência de maior área de osso total nos animais do grupo AZ-exp, tanto na maxila quanto no fêmur esta diferença não foi estatisticamente significativa. Esta tendência deve-se à falta de reabsorção e remodelação óssea dos alvéolos e no fêmur, observada na análise qualitativa dos cortes histológicos. Nos ossos longos a maior quantidade de osso total observada pode ser a responsável pela maior resistência óssea como descrito por Palacio et al. (2012).

O fato da variável ON ser estatisticamente maior no grupo AZ-M-exp em comparação ao grupo CO-M-exp, está de acordo 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. Entretanto, Maahs et al. (2011) não analisaram o fêmur, e nosso estudo não foi encontrado presença de ON no fêmur. Os resultados de Tsurushima et al. (2013), mostraram presença de ON em mandíbula e fêmur de ratos tratados com AZ, no entanto, os animais que apresentaram ON haviam sido inoculados na área dos defeitos criados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Este fato nos faz refletir sobre o papel das bactérias no desenvolvimento da OMAB.

O desenvolvimento da OMAB em modelos animais é rotineiramente publicado na literatura. Variáveis como, posologia da droga, tempo de uso, tempo entre as doses, as exodontias realizadas e a eutanásia podem influenciar nos resultados. Um fato que parece claro após esta pesquisa é que a utilização de ossos longos como área de análise para a OMAB parece ser precipitada, pois no modelo animal pesquisado houve 100% de lesões clínicas e histológicas nas áreas de exodontias e não encontramos nenhum animal com a presença das lesões de ON nos defeitos realizados nos fêmures.

A extração do RNA seguindo a utilização do TRIzol[®] (Life Technologies) e as colunas de centrifugação (RNeasy mini kit 250, Qiagen[®], Alemanha) permitiu a obtenção de quantidade e qualidade nas amostras de maxila e fêmur, seguindo o protocolo de Kelly et al. (2014).

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, a qual é ativada pelo ligante RANKL, 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 OCs e também estimula a ativação de OCs, portanto, sendo estimulantes da reabsorção óssea. 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).

Analisando estes alvos e comparando a expressão deles entre maxila e fêmur, a grande diferença foi encontrada na expressão de RANKL e OPG. Os resultados sugerem que o aumento de OPG nos grupos CO-F-exp e AZ-F-exp leve a uma inibição da osteoclastogênese. Essa alteração na expressão de RANK, RANKL e OPG não parece ser fator que desencadeou a osteonecrose, mas pode ser um indicativo de atraso no processo de reparo.

Çankaya et al. (2013) demonstraram em ratos (Sprague-Dawley) tratados com AZ por 10 semanas, porém sem manipulação cirúrgica, aumento nos níveis de OPG e RANKL na tíbia, e diminuição da expressão de RANKL e aumento de OPG na mandíbula. Segundo os autores, o aumento nos níveis de OPG na tíbia, indica inibição osteoclástica, e o aumento nos níveis de RANKL na tíbia é considerada como sendo um efeito de compensação que indica a fisiologia normal. O aumento nos níveis de OPG na mandíbula também indica inibição osteoclástica. No entanto, a diminuição dos níveis de RANKL na mandíbula sugere uma falta de ativação dos osteoclastos. Esta alteração nos níveis de RANKL com ausência da ativação osteoclástica poderia ser um fator predisponente para o desenvolvimento da OMAB. No entanto o autor neste modelo não avaliou a incidência de OMAB. Nossos resultados mostram apenas elevação na expressão de RANKL nos animais dos grupos AZ-M e AZ-F, sem alterações na expressão de OPG. As diferenças na expressão de RANK, RANKL e OPG encontradas em nossa pesquisa não parece influenciar no desenvolvimento da OMAB.

Os efeitos dos bisfosfonatos sobre osteoblastos não foram completamente desvendados (POZZI et al., 2009; MANZANO-MORENO et al., 2014). A inibição da reabsorção óssea pode ser mediada indiretamente pela ação dos bisfosfonatos sobre os osteoblastos (ZARA et al., 2014). A avaliação através da expressão de proteínas como a

Fosfatase Alcalina pode ser realizada, pois os osteoblastos jovens são caracterizados pela expressão de ALPL e de colágeno tipo I. Já os osteoblastos em fase final de desenvolvimento são mais cuboidais e expressam sialoproteína óssea e osteocalcina e a mineralização óssea esta associada com a sua fase final de diferenciação (ZARA et al., 2014).

A administração do AZ aumentou a expressão de ALPL no fêmur com e sem defeito ósseo. Os níveis de expressão nos animais controles submetidos à exodontia e ao defeito ósseo foram similares, porém nos animais que fizeram o uso de AZ e realizaram exodontia o nível de ALPL diminuiu. O que pode ser relacionado com o atraso no processo de reparo e consequentemente no desenvolvimento da OMAB. Quando comparamos maxila e fêmur fica evidente a diminuição na expressão de OCN após a administração de AZ, e após a realização da exodontia e do defeito ósseo, indicando atraso no processo de reparo ósseo.

Estudos *in vitro* mostram que os BFs afetam negativamente a taxa de proliferação e diferenciação dos osteoblastos além de inibir a mineralização da matriz (ORRISS et al., 2009; POZZI et al., 2009). Este efeito negativo sobre os osteoblastos é explicado pelo fato de que os efeitos benéficos são exercidos se BFs são administrados em concentrações baixas que variam de 10^{-9} a 10^{-6} M; efeitos inibitórios e citotoxicidade, que pode levar a osteonecrose, são encontrados em concentrações mais elevadas do que 10^{-5} M (NAIDU et al., 2008; ORRISS et al., 2009; POZZI et al., 2009; BELLIDO; PLOTKIN, 2011). Nesta pesquisa utilizamos concentrações altas de Ácido Zoledrônico (0,6mg/kg), que podem ser a causa da diminuição das proteínas secretadas pelos osteoblastos e consequentemente ter ocasionado a osteonecrose.

Pouco foi estudado sobre o efeito dos bisfosfonatos sobre os osteócitos, porém quando lesões do tipo osteonecrose são observadas microscopicamente, estas demonstram lacunas vazias onde deveria haver osteócitos (ALLEN; BURR, 2009). A perda da viabilidade dos osteócitos tem papel importante no desenvolvimento da OMAB (ALLEN; BURR, 2009). Assim buscamos avaliar a função dos osteócitos através da expressão de DMP-1 e PHEX.

Diferentemente do observado na expressão de DMP-1 e PHEX na maxila, a expressão destes marcadores no fêmur foi aumentada após a administração do AZ, e houve elevação ainda maior na expressão dos mesmos ao realizar o defeito ósseo. Este aumento na expressão de DMP-1 e PHEX indica que os osteócitos estão viáveis, sintetizando proteínas, e que o processo de remodelação óssea está ocorrendo no fêmur.

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). A redução da angiogênese dentro do osso é um efeito secundário e esperado ao uso de BFs, pois estes inibem a remodelação óssea e consequentemente diminuem a angiogênese, devido a íntima relação entre vascularização e o reparo ósseo (ALLEN; BURR, 2009).

A realização das exodontias na maxila e defeitos ósseos no fêmur pode ter contribuído para o aumento da expressão nos grupos experimentais já que este é um fator envolvido na angiogênese. Nossos resultados são similares ao de Marino et al. (2012) que avaliaram um modelo animal utilizando ratos Sprague-Dawley, nos quais foi administrado por via intravenosa AZ (20µg/kg IV), com intervalos de 3 semanas. Aos 21 dias foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito. Os níveis de VEGF começaram a diminuir nos grupos controles após 4 semanas. Os níveis de VEGF no grupo experimental, no entanto, continuaram a aumentar, mesmo depois de 8 semanas de cicatrização. A teoria que os autores postularam é que o fornecimento de sangue para área de cicatrização era insuficiente; portanto, a expressão de VEGF continuou a aumentar. Este processo de cura prolongado diminuiu a formação de vasos sanguíneos e consequentemente aumentou os níveis de VEGF. No entanto nos chamou a atenção o aumento dos níveis de VEGF nos grupos tratados somente com AZ sem procedimento cirúrgico, tanto na maxila quanto no fêmur.

O modelo descrito por Maahs et al. (2011) e reproduzido neste trabalho, apresentou alta incidência de desenvolvimento de OMAB, e se mostrou de fácil execução. Porém, os tempos de administração da droga, momento do procedimento cirúrgico e período 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 do aparecimento da OMAB em humanos (ZEN FILHO, 2014). Entretanto fica evidente a importância do cuidado bucal nos pacientes que fazem o uso do AZ para prevenir ou minimizar as possíveis lesões de OMAB.

Através da análise molecular encontramos pontos divergentes na expressão de marcadores ósseos e de vascularização que podem indicar diferenças no reparo e consequentemente no desenvolvimento da OMAB. Entretanto estes foram avaliados somente em um período tardio do reparo ósseo, tornando necessários estudos, que avaliem a cinética de remodelação óssea, em modelos estabelecidos de OMAB.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O modelo animal utilizado nesta pesquisa para avaliação em sítio extra-oral não é um modelo válido para o estudo da OMAB.
- O AZ alterou o reparo ósseo, causando atraso, ocorrência de osteonecrose e sequestros ósseos na maxila, porém com maior tendência a formação óssea e sem osteonecrose e/ou sequestros ósseos no fêmur.
- Na análise molecular, a administração de AZ e a realização das exodontias e do defeito ósseo, provocou, alteração na expressão de marcadores para osteoclastos, sugerindo atraso no processo de reparo ósseo na maxila e fêmur e indicando maior ativação osteoclástica na maxila.
- A administração do AZ aumentou a expressão molecular na fase inicial da osteoblastogênese no fêmur com e sem defeito ósseo, foi estável na maxila e diminuiu a expressão tardia dos osteoblastos na maxila e fêmur principalmente após a realização das cirurgias, sugerindo atraso no processo de reparo ósseo.
- A administração de AZ e as exodontias afetaram a expressão dos osteócitos e a diminuição da expressão pode ser reflexo da osteonecrose. O aumento da expressão dos osteócitos no fêmur após a administração do AZ e realização do defeito ósseo, sugere a viabilidade dos osteócitos.
- A expressão de VEGF aumentou após a administração de AZ, e os procedimentos cirúrgicos contribuíram para um aumento ainda maior desta expressão na maxila e fêmur.

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.

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

Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res.* 2007 Jun;22(6):867-76.

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.

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.

Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 1;23(34):8580-7.

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.

Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, et al. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Mar;105(3):358-64.

- Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*. 2011 Jul;49(1):50-5.
- 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.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):229-38.
- 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 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.
- de Oliveira MA, Asahi DA, Silveira CA, Lima LA, Glick M, Gallottini M. The effects of zoledronic acid and dexamethasone on osseointegration of endosseous implants: histological and histomorphometrical evaluation in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Apr;26(4):17-21.
- 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, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):20-33.
- Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2005 Nov-Dec;19(10 Suppl):S4-6.
- Erdogan M, Bereket C, Ozkan N, Alici O, Sener I, Desteli EE, et al. The effect of zoledronic acid on growth plates and high turnover bones. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(3):131-5.
- Favia G, Pilolli GP, Maiorano E. Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy. *Bone*. 2009;45:406-13.
- 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, 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, Neuman WF. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *Am J Physiol*. 1961;200:1296-300.
- 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.

- 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.
- Franco-Pretto E, Pacheco M, Moreno A, Messa O, Gnecco J. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: clinical, imaging, and histopathology findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Oct;118(4):408-17.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kelly NH, Schimenti JC, Patrick Ross F, van der Meulen MC. A method for isolating high quality RNA from mouse cortical and cancellous bone. *Bone*. 2014 Nov; 68:1-5.
- Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.

Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Yoon TR. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*. 2009; 467:3121-8.

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. Methylene diphosphonate, a metabolic poison in *Dictyostelium discoideum*. Phosphorus-31 NMR evidence for accumulation of adenosine 5'-(β,γ -methylene triphosphate) and diadenosine 5',5''-P₁,P₄-(P₂,P₃-methylene tetraphosphate). *Biochemistry*. 1988;27(6):1897-901.

Krinke G. The laboratory rat. San Diego, Calif.: Academic Press; 2000. xiv, 756 p.

Lee NK. Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology *Endocrinol Metab*. 2010 Dec;25(4):264-269.

Lee YJ, Jeong JK, Seol JW, Xue M, Jackson C, Park SY. Activated protein C differentially regulates both viability and differentiation of osteoblasts mediated by bisphosphonates. *Exp Mol Med*. 2013;45(9).

Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 1996;18(2):75-85.

Little JW, Falace D, Miller C, Rhodus NL. Dental management of the medically compromised patient. 8th ed. St. Louis: Elsevier Mosby; 2013. 488 p.

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.

Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, Ruiz C, García-Martínez O. High doses of bisphosphonates reduce osteoblast-like cell proliferation by arresting the cell cycle and inducing apoptosis. *J Craniomaxillofac Surg*. In press 2014.

Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol*. 2012 Sep;38 Spec No:511-8.

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.
- MHRA. How many people take oral bisphosphonates in the UK? United Kingdom. 2010 [cited 11/26/2014] Available from: <http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Generalsafetyinformationandadvice/product-specificinformationandadvice/Product-specificinformationandadvice-AF/Bisphosphonates/QuestionsandanswersonthestudybyGreenandcoworkers2010onoralbisphosphonatesandoesophagealcancer/index.htm#q1>.
- 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.
- 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.
- Mullen CA, Haugh MG, Schaffler MB, Majeska RJ, McNamara LM. Osteocyte differentiation is regulated by extracellular matrix stiffness and intercellular separation. J Mech Behav Biomed Mater. 2013 Dec; 28:183-94.
- 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.
- Nakano Y, Beertsen W, Vandenbos T, Kawamoto T, Oda K, Takano Y. Site-specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane: tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma membrane calcium ATPase. Bone. 2004;35(5):1077-85.
- 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.
- Palacio EP, Müller SS, Sardenberg T, Mizobuchi RR, Galbiatti JA, Durigan Jr A, et al. Detecting early biomechanical effects of zoledronic Acid on femurs of osteoporotic female rats. J Osteoporos. 2012; 2012:162806.

- Pazianas M, Abrahamsen B. Safety of bisphosphonates. *Bone*. 2011 Jul;49(1):103-10.
- 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 morfométrica, 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.
- Rocheffort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*. 2010 Sep;21(9):1457-69.
- 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, Mönkkönen 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 Commun*. 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, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Oct;72(10):1938-56.
- 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.

- 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.
- Sanna G, Zampino MG, Pelosi G, Nolè F, Goldhirsch A. Jaw avascular bone necrosis associated with long-term use of biphosphonates. *Ann Oncol.* 2005 Jul;16(7):1207-8.
- Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci.* 1968; 35: 363-72.
- Schwetz BA. From the Food and Drug Administration. *JAMA.* 2001;286(13):1569.
- Sharma D, Hamlet S, Petcu E, Ivanovski S. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--an appraisal. *Oral diseases.* 2013 Nov;19(8):747-54.
- Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig.* 2010;14:51-8.
- 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.
- Tsurushima H, Kokuryo S, Sakaguchi O, Tanaka J, Tominaga K. Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Nov;42(11):1481-7.

- 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- κ B ligand, osteoprotegerin, von Willebrand factor, and caspase-3 evaluation. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(9):702-12.
- Viereck V, Emons G, Lauck V, Blaschke S, Gründker C, Hofbauer LC. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 291:680-6.
- Vitté C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology*. 1996; 137(6):2324-33.
- 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.
- Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*. 2003;22:6267-76.
- Xiong Y, Yang HJ, Feng J, Shi ZL, Wu LD. Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *J Int Med Res*. 2009;37:407-16.
- Zara S, De Colli M, di Giacomo V, Zizzari VL, Di Nisio C, Di Tore U, et al. Zoledronic acid at subtoxic dose extends osteoblastic stage span of primary human osteoblasts. *Clin Oral Investig*. In press 2014.
- Zen Filho, EV. 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]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ANÁLISE MOLECULAR DA MAXILA

Variável receptor ativador do NF- κ B (RANK)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANK nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-M	0,9386	0,1657	0,9925
AZ-M	1,628	0,6938	1,588
CO-M-exp	1,724	0,5646	1,712
AZ-M-exp	2,369	1,637	1,946
Dif. Grupos	KW=7,903 p=0,0481		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Dunn para RANK.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-M vs. AZ-M	-7,833	Não
CO-M vs. CO-M-exp	-9	Não
CO-M vs. AZ-M-exp	-10,5	Sim
AZ-M vs. CO-M-exp	-1,167	Não
AZ-M vs. AZ-M-exp	-2,667	Não
CO-M-exp vs. AZ-M-exp	-1,5	Não

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

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANKL nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-M	0,9958	0,2772	0,9769
AZ-M	2,608	0,4382	2,625
CO-M-exp	2,160	0,8218	2,101
AZ-M-exp	5,032	2,456	4,761
Dif. Grupos	KW=16,12 p=0,0011		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Dunn para RANKL.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-M vs. AZ-M	-10,83	Sim
CO-M vs. CO-M-exp	-7,833	Não
CO-M vs. AZ-M-exp	-16	Sim
AZ-M vs. CO-M-exp	3	Não
AZ-M vs. AZ-M-exp	-5,167	Não
CO-M-exp vs. AZ-M-exp	-8,167	Não

Variável osteoprotegerina (OPG)

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

	Média	DP	Mediana
CO-M	1,096	0,3019	1,039
AZ-M	0,9845	0,4019	0,9433
CO-M-exp	1,528	0,2587	1,627
AZ-M-exp	0,5926	0,2310	0,4816
Dif. Grupos	KW=14.35 p=0,0025		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Dunn para OPG.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-M vs. AZ-M	2	Não
CO-M vs. CO-M-exp	-6,667	Não
CO-M vs. AZ-M-exp	8,667	Não
AZ-M vs. CO-M-exp	-8,667	Não
AZ-M vs. AZ-M-exp	6,667	Não
CO-M-exp vs. AZ-M-exp	15,33	Sim

Variável fosfatase alcalina (ALPL)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de ALPL nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-M	0,9637	0,1779	1
AZ-M	1,305	0,4785	1,282
CO-M-exp	1,285	0,5562	1,4
AZ-M-exp	0,9405	0,3892	1,098
Dif. Grupos	KW=4,442 p=0,2175		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Dunn para ALPL.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-M vs AZ-M	-7,000	Não
CO-M vs CO-M-exp	-6,000	Não
CO-M vs AZ-M-exp	-1,000	Não
AZ-M vs CO-M-exp	1	Não
AZ-M vs AZ-M-exp	6	Não
CO-M-exp vs AZ-M-exp	5	Não

Variável osteocalcina (OCN)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de OCN nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-M	0,8808	0,2490	0,9860
AZ-M	0,5449	0,2147	0,5224
CO-M-exp	1,724	1,251	1,339
AZ-M-exp	0,4917	0,1778	0,5575
Dif. Grupos	F=4.563 p=0,0136		

F= ANOVA; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Turkey para OCN.

Grupo	Diferença das médias	q	p<0,05
CO-M vs AZ-M	0,3359	1,26	Não
CO-M vs CO-M-exp	-0,8434	3,165	Não
CO-M vs AZ-M-exp	0,3891	1,46	Não
AZ-M vs CO-M-exp	-1,179	4,425	Sim
AZ-M vs AZ-M-exp	0,05323	0,1997	Não
CO-M-exp vs AZ-M-exp	1,233	4,625	Sim

Variável proteína da matriz de dentina-1 (DMP-1)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de DMP-1 nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-M	1,131	0,7846	0,9437
AZ-M	0,8343	0,3786	0,9257
CO-M-exp	1,545	0,9945	1,257
AZ-M-exp	0,6378	0,2862	0,6037
Dif. Grupos	KW=6,483 p=0,0903		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Dunn para DMP-1.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-M vs. AZ-M	1	Não
CO-M vs. CO-M-exp	-5,000	Não
CO-M vs. AZ-M-exp	5,333	Não
AZ-M vs. CO-M-exp	-6,000	Não
AZ-M vs. AZ-M-exp	4,333	Não
CO-M-exp vs. AZ-M-exp	10,33	Não

Variável endopeptidase neutra reguladora de fosfato (PHEX)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de PHEX nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-M	1,130	0,3750	1,015
AZ-M	0,7452	0,3116	0,8063
CO-M-exp	2,436	1,147	2,280
AZ-M-exp	1,274	0,4880	1,436
Dif. Grupos	F=7,109 p=0,0019		

F= ANOVA; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Tukey para PHEX.

Grupo	Diferença das médias	q	p<0,05
CO-M vs AZ-M	0,3843	1,407	Não
CO-M vs CO-M-exp	-1,307	4,784	Sim
CO-M vs AZ-M-exp	-0,1447	0,5298	Não
AZ-M vs CO-M-exp	-1,691	6,19	Sim
AZ-M vs AZ-M-exp	-0,529	1,936	Não
CO-M-exp vs AZ-M-exp	1,162	4,254	Sim

Variável fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de VEGF nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-M	0,9129	0,2695	1
AZ-M	1,507	0,4695	1,511
CO-M-exp	1,459	0,5153	1,259
AZ-M-exp	2,527	0,6658	2,765
Dif. Grupos	F=10,87 p=0,0002		

F= ANOVA; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-M, CO-M-exp, AZ-M e AZ-M-exp pelo pós-teste de Tukey para VEGF.

Grupo	Diferença das médias	q	p<0,05
CO-M vs AZ-M	-0,5939	2,907	Não
CO-M vs CO-M-exp	-0,5462	2,673	Não
CO-M vs AZ-M-exp	-1,615	7,902	Sim
AZ-M vs CO-M-exp	0,04771	0,2335	Não
AZ-M vs AZ-M-exp	-1,021	4,995	Sim
CO-M-exp vs AZ-M-exp	-1,068	5,229	Sim

APÊNDICE B

ANÁLISE MOLECULAR DO FÊMUR

Variável receptor ativador do NF- κ B (RANK)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANK nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-F	0,9165	0,1436	1,000
AZ-F	1,862	0,6283	1,910
CO-F-exp	1,221	0,2830	1,182
AZ-F-exp	1,712	0,2106	1,654
Dif. Grupos	KW=12,75 p=0,0052		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Dunn para RANK.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-F vs. AZ-F	-12,5	Sim
CO-F vs. CO-F-exp	-5	Não
CO-F vs. AZ-F-exp	-11,83	Sim
AZ-F vs. CO-F-exp	7,5	Não
AZ-F vs. AZ-F-exp	0,6667	Não
CO-F-exp vs. AZ-F-exp	-6,833	Não

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

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de RANKL nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-F	0,8729	0,2108	0,9843
AZ-F	3,682	1,488	3,222
CO-F-exp	1,315	0,5423	1,123
AZ-F-exp	6,592	6,266	4,695
Dif. Grupos	KW= 17,79 p= 0,0005		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Dunn para RANKL.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-F vs. AZ-F	-12,67	Sim
CO-F vs. CO-F-exp	-4,333	Não
CO-F vs. AZ-F-exp	-15	Sim
AZ-F vs. CO-F-exp	8,333	Não
AZ-F vs. AZ-F-exp	-2,333	Não
CO-F-exp vs. AZ-F-exp	-10,67	Não

Variável osteoprotegerina (OPG)

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

	Média	DP	Mediana
CO-F	1,374	0,3759	1,340
AZ-F	1,705	0,7157	1,895
CO-F-exp	4,644	2,878	4,417
AZ-F-exp	4,087	1,646	4,442
Dif. Grupos	F=5,630 p=0,0058		

F= ANOVA; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Tukey para OPG.

Grupo	Diferença das médias	q	p<0,05
CO-F vs AZ-F	-0,3304	0,4743	Não
CO-F vs CO-F-exp	-3,27	4,694	Sim
CO-F vs AZ-F-exp	-2,713	3,895	Não
AZ-F vs CO-F-exp	-2,939	4,219	Sim
AZ-F vs AZ-F-exp	-2,383	3,42	Não
CO-F-exp vs AZ-F-exp	0,5568	0,7992	Não

Variável fosfatase alcalina (ALPL)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de ALPL nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-F	1,116	0,7462	1,000
AZ-F	2,102	0,7522	2,011
CO-F-exp	1,285	0,6621	1,183
AZ-F-exp	2,241	0,6427	2,349
Dif. Grupos	KW=9,064 p=0,0285		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Dunn para ALPL.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-F vs AZ-F	-7,167	Não
CO-F vs CO-F-exp	-1,000	Não
CO-F vs AZ-F-exp	-10,50	Sim
AZ-F vs CO-F-exp	6,167	Não
AZ-F vs AZ-F-exp	-3,333	Não
CO-F-exp vs AZ-F-exp	-9,500	Não

Variável osteocalcina (OCN)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de OCN nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-F	0,9845	0,1868	0,9401
AZ-F	0,2051	0,02598	0,2026
CO-F-exp	2,563	0,9473	2,211
AZ-F-exp	1,227	0,9301	1,155
Dif. Grupos	F=12,84 p<0,0001		

F= ANOVA; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Turkey para OCN.

Grupo	Diferença das médias	q	p<0,05
CO-F vs AZ-F	0,7794	2,848	Não
CO-F vs CO-F-exp	-1,578	5,767	Sim
CO-F vs AZ-F-exp	-0,2423	0,8854	Não
AZ-F vs CO-F-exp	-2,358	8,614	Sim
AZ-F vs AZ-F-exp	-1,022	3,733	Não
CO-F-exp vs AZ-F-exp	1,336	4,881	Sim

Variável proteína da matriz de dentina-1 (DMP-1)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de DMP-1 nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-F	2,166	1,424	1,775
AZ-F	3,895	1,470	4,462
CO-F-exp	5,103	2,333	4,999
AZ-F-exp	8,427	2,947	7,597
Dif. Grupos	F=9,155 p=0,0005		

F= ANOVA; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Tukey para DMP-1.

Grupo	Diferença das médias	q	p<0,05
CO-F vs AZ-F	-1,729	1,98	Não
CO-F vs CO-F-exp	-2,937	3,362	Não
CO-F vs AZ-F-exp	-6,261	7,166	Sim
AZ-F vs CO-F-exp	-1,207	1,382	Não
AZ-F vs AZ-F-exp	-4,531	5,187	Sim
CO-F-exp vs AZ-F-exp	-3,324	3,805	Sim

Variável endopeptidase neutra reguladora de fosfato (PHEX)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de PHEX nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-F	1,229	0,2844	1,096
AZ-F	2,553	0,8175	2,803
CO-F-exp	4,648	1,881	5,322
AZ-F-exp	6,492	2,197	6,359
Dif. Grupos	F=14,14 p<0,0001		

F = ANOVA; DP = Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Tukey para PHEX.

Grupo	Diferença das médias	q	p<0,05
CO-F vs AZ-F	-1,324	2,149	Não
CO-F vs CO-F-exp	-3,419	5,547	Sim
CO-F vs AZ-F-exp	-5,263	8,54	Sim
AZ-F vs CO-F-exp	-2,095	3,399	Não
AZ-F vs AZ-F-exp	-3,939	6,391	Sim
CO-F-exp vs AZ-F-exp	-1,844	2,992	Não

Variável fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Média, DP e Mediana dos resultados de CT da expressão de VEGF nos grupos estudados.

	Média	DP	Mediana
CO-F	1,094	0,2302	1,000
AZ-F	2,063	0,4157	2,172
CO-F-exp	1,825	0,6953	1,872
AZ-F-exp	3,587	0,8690	3,353
Dif. Grupos	KW=17,57 p=0,0005		

KW= Kruskal-Wallis; DP= Desvio Padrão.

Diferença entre os grupos CO-F, CO-F-exp, AZ-F e AZ-F-exp pelo pós-teste de Dunn para VEGF.

Grupo	Diferença das médias	p<0,05
CO-F vs. AZ-F	-8,167	Não
CO-F vs. CO-F-exp	-6,833	Não
CO-F vs. AZ-F-exp	-17	Sim
AZ-F vs. CO-F-exp	1,333	Não
AZ-F vs. AZ-F-exp	-8,833	Não
CO-F-exp vs. AZ-F-exp	-10,17	Não

ANEXOS

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

ANEXO B - Alteração do pesquisador responsável 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**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 019/2011

Bauru, 2 de dezembro de 2014.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para alteração do pesquisador responsável do projeto de pesquisa **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 e coorientação do Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, para o pesquisador *Gustavo Zanna Ferreira* informamos que, após análise de um relator, referida solicitação foi considerada **APROVADA ad referendum** desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que qualquer outra alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado 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,

Profª Drª Ana Paula Campanelli

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Docente do Departamento de Estomatologia

ANEXO C - Protocolo de entrega do Relatório Final para avaliação 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**

**Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em
Animais**

Proc. Nº 019/2011

Título do Projeto:

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

Autor(es):

Gustavo Zanna Ferreira

Orientador(a):

Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Coorientador(a)

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

**Data de entrega para avaliação do
Relatório Final:**

13 de fevereiro de 2015

**Data da reunião da CEEPA em será
analisado:**

a definir

Maristela Petenuci Ferrari

Secretária da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais