



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO PERI-IMPLANTAR EM
RATAS TRATADAS COM DOSE ONCOLÓGICA OU DOSE
OSTEOPORÓTICA DE ZOLEDRONATO

LUAN FELIPE TORO

ORIENTADOR: PROF. ASSOC. EDILSON ERVOLINO

COORIENTADOR: PROF. TIT. VALDIR GOUVEIA GARCIA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração: *Biologia Celular
Estrutural e Funcional*.

**BOTUCATU – SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Toro, Luan Felipe.

Avaliação do processo de reparo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato / Luan Felipe Toro. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Edilson Ervolino

Coorientador: Valdir Gouveia Garcia

Capes: 20600003

1. Difosfonatos. 2. Implantes dentários. 3. Osseointegração. 4. Osteonecrose.

Palavras-chave: Difosfonatos; Implantes dentários; Osseointegração; Osteonecrose.

LUAN FELIPE TORO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO PERI-IMPLANTAR EM RATAS
TRATADAS COM DOSE ONCOLÓGICA OU DOSE OSTEOPORÓTICA DE
ZOLEDRONATO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Assoc. Edilson Ervolino

Coorientador: Prof. Tit. Valdir Gouveia Garcia

Comissão examinadora:

Prof. Assoc. Edilson Ervolino

Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araçatuba, UNESP

Orientador

Prof. Assoc. Juliano Milanezi de Almeida

Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araçatuba, UNESP

Prof^a. Tit. Maeli Dal Pai

Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP

Aprovada em ____/____/____.

Botucatu – SP

DADOS CURRICULARES

LUAN FELIPE TORO

Nascimento: 03 de novembro de 1992
Birigui – SP

Filiação: Valdir Olgado Toro
Márcia Sueli Jorge Toro

2008 - 2010: Ensino Médio
Escola Estadual “Profª. Regina Valarini Vieira”, Birigui – SP

2011 - 2016: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araçatuba – SP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

2017 - 2019: Curso de mestrado acadêmico em Biologia Geral e Aplicada
Área de concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu – SP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

DEDICATÓRIA



Ao cientista inglês Robert Hooke, que pela simples observação de um pedaço de cortiça ao microscópio de luz, publicada em seu livro Micrographia, de 1665, lançou a pedra fundamental para o surgimento do fascinante universo da biologia celular e tecidual.



AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, acima de tudo, e à **Nossa Senhora**, pela sua inestimável intercessão junto a Ele, por me permitirem viver para realizar mais este sonho e por serem fonte inesgotável de fortaleza e amparo em todas as horas, sobretudo nas mais difíceis.

Ao meu pai **Valdir O. Toro** e à minha mãe **Marcia S. J. Toro**, pelo amor incondicional e, principalmente, por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar cada um dos meus objetivos. À minha irmã **Aniele M. T. Fagundes**, pelo exemplo de organização e dedicação em tudo o que faz, pela integridade pessoal e por toda torcida e cumplicidade de sempre. A vocês três dedico mais do que este título e o presente trabalho, dedico e compartilho todas as conquistas e vitórias da minha vida.

Ao querido mestre e orientador, mas, acima de tudo, ao grande amigo **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, idealizador deste trabalho e responsável direto pelo meu ingresso e trajetória no universo acadêmico e da ciência. Minha eterna gratidão por toda confiança depositada e pelas inúmeras portas que me foram abertas. Minha sincera admiração e respeito pela pessoa que é e pelo profissional diferenciado, competente e íntegro que todos reverenciam.

Ao meu coorientador **Prof. Tit. Valdir G. Garcia**, pela capacidade de transformar, com a sua vasta experiência, até os maiores problemas em simples contratemplos e, além disso, possibilitar aprendizagem e crescimento com as suas resoluções. À **Profª. Assoc. Letícia H. Theodoro**, pelo valioso suporte e colaboração nesta pesquisa e nos demais projetos desenvolvidos por nosso laboratório.

Ao **Prof. Assoc. Juliano M. de Almeida**, pela sua incalculável contribuição na idealização do presente trabalho e durante toda a sua realização, principalmente nas cirurgias para instalação dos implantes de titânio. Sinto-me honrado em apresentar-lhe nesta dissertação o resultado de tamanho empenho.

Ao **Prof. Ass. Dr. Luis A. Justulin Junior** e à **Profª. Assoc. Mariza A. Matsumoto**, pela atenta leitura e análise crítica do Exame Geral de Qualificação que precedeu este trabalho, além das inúmeras sugestões e comentários enriquecedores que tanto contribuíram para o aperfeiçoamento de sua versão final.

Aos membros da comissão examinadora do processo de defesa desta dissertação de mestrado, **Prof. Assoc. Juliano M. de Almeida**, **Profª. Tit. Maeli Dal Pai** e **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, pela gentileza, prontidão e disponibilidade em realizarem a avaliação deste trabalho. A indicação de tais nomes reflete a nossa certeza de que cada um, com a sua devida

expertise, apresentará grandiosa contribuição para o aprimoramento deste texto e para o direcionamento de novas etapas e pesquisas futuras.

À nossa incomparável equipe de trabalho do **Laboratório de Osteobiologia Aplicada à Odontologia**, constituída por alunos de graduação e pós-graduação, nível mestrado acadêmico e doutorado, e majestosamente conduzida pelo **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**. Aos meus queridos amigos **João M. de Mello Neto, Thamires P. Cavazana, João V. F. Rodrigues, Cristian Statkiewicz, Daniela P. de Sá, Fernanda F. V. dos Santos, Letícia C. Ferreira, Tiago E. da Rocha, Nathália J. de Araujo, Luy de A. Costa, Jéssica S. Santana, Jéssica de O. A. Freire, Isabella Z. Guiati, Vinícius F. Ganzaroli, Mariane B. Olivo e Eduardo Q. M. Souza**, meus mais sinceros agradecimentos pela sólida amizade construída e pela incontestável colaboração em todas as etapas do presente estudo, sem a qual nada seria possível, e nas demais pesquisas e projetos desenvolvidos por nosso grupo. Este trabalho é novamente fruto do grande empenho e dedicação de cada um de vocês.

Aos meus amigos do coração, pela torcida, apoio e cumplicidade durante esta etapa tão importante da minha vida. À **Daniela P. de Sá**, por todo carinho a mim atribuído, pela confiança e amizade verdadeiras. Ao **João M. de Mello Neto**, pelo companheirismo nos momentos mais difíceis e pela alegria compartilhada nas horas de sucesso. Ao **Jefferson J. de Oliveira**, por incentivar e apoiar todas as minhas decisões, vibrar com as minhas conquistas e me possibilitar inestimável conhecimento e crescimento, tanto pessoal quanto profissional. E ao **Henrique R. Matheus**, não apenas pela parceria desde a época da graduação, mas pelo auxílio durante a cirurgia para instalação dos implantes de titânio e pelo generoso suporte oferecido ao longo deste trabalho.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP** e, em especial, ao **Instituto de Biociências de Botucatu**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Cesar Martins** e do senhor vice-diretor **Prof. Assoc. Luiz F. R. de Almeida**, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada (PG-BGA)**, nas pessoas do senhor coordenador **Prof. Assoc. José M. Sforcin** e da senhora vice-coordenadora **Profª. Tit. Maeli Dal Pai**, pela dedicação, entusiasmo e transparência na condução deste programa de pós-graduação.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Wilson R. Poi** e do senhor vice-diretor **Prof. Tit. João E. Gomes Filho**, pela possibilidade de execução desta pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de Bolsa de Mestrado (CAPES-DS; 01/03/2017 – 31/12/2017), e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, também pela concessão de Bolsa de Mestrado (processo FAPESP nº. 2017/16364-2; 01/01/2018 – 28/02/2019).

À empresa **DSP Biomedical**, pela gentileza no fornecimento dos implantes de titânio utilizados nesta pesquisa. Ao **Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO)** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, e à **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)**, pela disponibilização de uso e suporte operacional aos aparelhos e à *workstation* de controle da microtomografia computadorizada (FINEP/CT-INFRA – Convênio FINEP nº. 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011).

À **Disciplina de Histologia e Embriologia**, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, representada pelos docentes **Prof. Assoc. Cláudio A. Casatti**, **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, **Profª. Assoc. Mariza A. Matsumoto** e **Profª. Ass. Drª. Alaíde Gonçalves**, pelas incontáveis oportunidades de crescimento pessoal e profissional, pelo aceite para realização do estágio-docência, monitorias voluntárias e aulas ministradas, que me permitiram viver e respirar histologia diariamente. Carinho, respeito e gratidão aos meus eternos mestres.

Aos docentes da **Disciplina de Anatomia**, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Tit. José A. de Oliveira**, **Prof. Assoc. Roelf J. C. Rizzolo**, **Profª. Assoc. Roberta Okamoto** e **Prof. Ass. Dr. Paulo R.**

Botacin, pelo gratificante convívio diário e pelos inúmeros momentos de aprendizagem e apoio gentilmente oferecidos desde o curso de graduação.

Aos **servidores técnico-administrativos** do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP e, em especial, ao **Davi B. de O. Müller**, supervisor da Seção Técnica de Pós-Graduação, pela disponibilidade, prontidão e boa vontade na resolução de todas as dúvidas e contratempos no decorrer do curso.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa da chefe de departamento **Prof^a. Ass. Dr^a. Ana C. de M. S. Nakamune** e do vice-chefe de departamento **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, e aos seus **servidores técnico-administrativos**, em especial ao **André L. M. Piedade**, à **Eliseide M. F. S. Navega**, ao **Arnaldo C. dos Santos**, e ao **José A. G. Junqueira**, por todo o suporte oferecido nas mais diversas etapas deste curso, além da agradável convivência diária.

Aos meus companheiros de pós-graduação e aos colegas de departamento, graduandos e pós-graduandos, com os quais tive a honra de trabalhar e desfrutar momentos indescritíveis. Meus agradecimentos especiais ao doutorando **Gestter W. L. Tessarin**, por todas as conversas, científicas ou não, pelos conselhos e companhia durante as viagens e estadias em Botucatu; à mestranda **Jaqueline S. Hassumi**, pela ajuda gentilmente oferecida nas diversas etapas experimentais deste trabalho, além da amizade verdadeira que construímos; à pós-doutoranda **Claudia C. Bigueti**, e aos doutorandos **Fábio R. de S. Batista**, **Pedro G. Ferreira** e **Gabriel M. dos Santos**, pelos ensinamentos e auxílio durante a realização das microtomografias computadorizadas.

Aos meus familiares, desde os mais próximos aos mais distantes, pelo constante incentivo, apoio e torcida. Aos meus queridos avós **Esther O. Toro**, **Urbano T. Costa** (*in memoriam*), **Marli C. Jorge** e **Jaime Jorge**, por todas as orações e momentos inigualáveis que pude viver ao lado de vocês até hoje. Aos meus tios e primos **Josiane J. Fardin**, **Márcio Fardin**, **Thaís Fardin** e **Vinícius Fardin**, por estarem presentes em cada conquista e por me ajudarem a levantar após cada tropeço. Ao meu cunhado **Gustavo F. da Silva**, por me proporcionar as melhores reflexões acerca das mais diversas situações cotidianas, sempre com bom humor e inteligência. E por estarem ao meu lado em todos os momentos, aos grandes amigos **Desirée A. Caldeira**, **Diva G. Demarchi**, **Raquel L. Balesteros**, **Rafaela L. B. Érnica**, **Carolina C. S. Lacerda**, **Denis Contini**, **Márcio R. Contardi**, **Natalie B. Alvares**, **Marina S. Gonçalves**, **Ana M. V. Vasques** e **Juliana R. Becker**.

Enfim, meu profundo respeito aos **animais** desta pesquisa, por servirem à ciência com suas próprias vidas.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ



“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

RESUMO



TORO, L. F. **Avaliação do processo de reparo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato.** 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.

RESUMO

Bisfosfonatos (BPs) são fármacos amplamente empregados no tratamento de condições que desencadeiam osteólise, atuando via inibição do processo de reabsorção óssea. Os BPs de maior potência, como o zoledronato, são utilizados para o controle da progressão de metástase óssea em neoplasias malignas osteotrópicas ou para o tratamento da osteoporose severa. Todavia, um dos seus efeitos adversos é a ocorrência da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). Dentre os principais fatores de risco locais para a ONM-M destacam-se as intervenções odontológicas invasivas, como as cirurgias para instalação de implantes dentários osseointegráveis. Apesar do aumento no número de relatos clínicos de ONM-M após a instalação de implantes dentários em pacientes tratados com BPs, poucos são os estudos que visam compreender quais as alterações que desencadeiam esta condição. Diante disso, o objetivo deste estudo foi analisar o processo de reparo peri-implantar na tíbia de ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato e avaliar a existência de correlação entre tal processo e a ocorrência de lesões osteonecroticas. Quarenta ratas (6 meses) foram distribuídas em dois experimentos: Experimento I: receberam injeções intraperitoneais (IP) de 0,45ml de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% (grupo VEI-ONC, n=10) ou desta mesma solução acrescida de 100µg/Kg de zoledronato (grupo ZOL-ONC, n=10), a cada 4 dias, durante 8 semanas; Experimento II: receberam injeções IP de 0,45ml de NaCl 0,9% (grupo VEI-OST, n=10) ou desta mesma solução acrescida de 100µg/Kg de zoledronato (grupo ZOL-OST, n=10), a cada 28 dias, durante 24 semanas. Em ambos os experimentos, decorridas 16 semanas do início do protocolo medicamentoso, os animais foram submetidos à instalação de um implante de titânio nas tíbias direita e esquerda. A eutanásia foi efetuada aos 56 dias pós-operatórios. Após a dissecação e realização de um minucioso exame clínico da região peri-implantar, as tíbias esquerdas foram submetidas ao escaneamento microtomográfico para análise da microarquitetura e estruturação do tecido ósseo peri-implantar e, posteriormente, ao processamento histológico por desgaste para análise histométrica do contato osso/implante (COI), um parâmetro para avaliação da osseointegração dos implantes de titânio. As tíbias direitas foram submetidas ao processamento histológico convencional pós-desmineralização, e as secções histológicas

foram coradas pela hematoxilina-eosina para análise histopatológica dos tecidos peri-implantares e adjacentes, análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar, ou destinadas à reação imunoistoquímica para detecção e quantificação da proteína morfogenética óssea 2/4 (BMP2/4, *Bone morphogenetic protein 2/4*), do fator de transcrição relacionado à runt 2 (RUNX2, *Runt-related transcription factor 2*), da osteocalcina (OCN, *Osteocalcin*), e da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *Tartrate-resistant acid phosphatase*). Os dados foram analisados estatisticamente com nível de significância de 5%. ZOL-ONC apresentou maior porcentagem de volume ósseo e menor porosidade total em relação aos grupos VEI-ONC e ZOL-OST, e maior PTO-T em relação ao grupo VEI-ONC. ZOL-ONC e ZOL-OST apresentaram maior PTO-NV e menor número de células RUNX2-positivas e OCN-positivas em relação aos grupos VEI-ONC e VEI-OST, respectivamente, além de extensas áreas de tecido ósseo não vital e focos de inflamação. O COI e o número de células BMP2/4-positivas e TRAP-positivas não diferiram entre os grupos, porém, estas últimas exibiram características de inatividade em ZOL-ONC e ZOL-OST. Deste modo, conclui-se que o tratamento com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato não afeta negativamente a osseointegração dos implantes de titânio e a quantidade de tecido ósseo peri-implantar, porém ocasiona o surgimento de áreas de tecido ósseo não vital e focos de inflamação, o que sugere que a instalação de implantes osseointegráveis deva ser vista com grande cautela em tais condições, pois pode constituir-se em um importante fator de risco local para o desencadeamento da ONM-M.

Palavras-chave: Difosfonatos. Implantes dentários. Osseointegração. Osteonecrose.

ABSTRACT



TORO, L. F. Evaluation of the peri-implant repair process in rats treated with oncologic dose or osteoporotic dose of zoledronate. 2019. 100 p. Dissertation (Master degree) - Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu/SP.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BPs) are drugs widely used for the treatment of conditions that cause osteolysis, by inhibition of the bone resorption process. High potency BPs, such as zoledronate, are used to control the progression of bone metastasis in osteotropic malignant neoplasms or for the treatment of severe osteoporosis. However, one of its adverse effects is the occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). Among the main local risk factors for MRONJ are invasive dental procedures, such as surgeries for installation of osseointegratable dental implants. Despite the increased number of clinical reports of MRONJ after installation of dental implants in patients treated with BPs, there are few studies that aim to understand the changes triggering this condition. So, the objective of this study was to analyze the peri-implant repair process in the tibia of rats treated with oncologic dose or osteoporotic dose of zoledronate and to evaluate the existence of correlation between this process and the occurrence of osteonecrotic lesions. Forty female rats (6 months old) were distributed in two experiments: Experiment I: rats received intraperitoneal (IP) injections of 0.45ml of 0.9% sodium chloride (NaCl) solution (group VEI-ONC, n=10) or this same solution added by 100µg/Kg of zoledronate (group ZOL-ONC, n=10), every 4 days for 8 weeks; Experiment II: rats received IP injections of 0.45ml of 0.9% NaCl solution (group VEI-OST, n=10) or this same solution added by 100µg/Kg of zoledronate (group ZOL-OST, n=10), every 28 days for 24 weeks. In both experiments, 16 weeks after the beginning of drug protocol, all animals were submitted to installation of a titanium implant in both right and left tibiae. Euthanasia was performed at day 56 postoperatively. After dissection and a thorough clinical examination of the peri-implant area, left tibiae were submitted to microtomographic scanning for analysis of the microarchitecture and structuring of peri-implant bone tissue and, later, to ground-section histological processing for histometric analysis of the bone/implant contact (BIC), a parameter for evaluation of the osseointegration of titanium implants. The right tibiae were submitted to conventional histological processing after demineralization, and the histological sections were stained by hematoxylin-eosin for histopathological analysis of the peri-implant tissues and adjacencies, histometric analysis of the percentage of total bone tissue (PTBT) and the percentage of non-vital bone tissue (PNVBT) in the peri-implant area,

or intended for immunohistochemical reaction for detection and quantification of bone morphogenetic protein 2/4 (BMP2/4), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Data were statistically analyzed at significance level of 5%. ZOL-ONC presented higher percentage of bone volume and lower total porosity in relation to groups VEI-ONC and ZOL-OST, and higher PTBT in relation to group VEI-ONC. Groups ZOL-ONC and ZOL-OST presented higher PNVBT and smaller number of RUNX2-positive cells and OCN-positive cells than groups VEI-ONC and VEI-OST, respectively, as well as extensive areas of non-vital bone tissue and foci of inflammation. BIC and the number of BMP2/4-positive cells and TRAP-positive cells did not differ amongst groups, however, these last cells exhibited features of inactivity in ZOL-ONC and ZOL-OST. Thus, it is concluded that the treatment with oncologic dose or osteoporotic dose of zoledronate does not negatively affects osseointegration of titanium implants and the amount of peri-implant bone tissue, but it does cause areas of non-vital bone tissue and inflammation foci, suggesting that installation of osseointegratable implants should be viewed with great caution in such conditions, since it may constitute an important local risk factor for the onset of MRONJ.

Keywords: Dental implants. Diphosphonates. Osseointegration. Osteonecrosis.

LISTAS



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Estrutura molecular dos bisfosfonatos nitrogenados e esquema representativo da via do mevalonato no osteoclasto, com destaque para o local de atuação destes fármacos.....	29
FIGURA 2 -	Sequência de procedimentos clínicos para a instalação do implante de titânio na tíbia dos animais	43
FIGURA 3 -	Fluxograma ilustrativo dos procedimentos experimentais realizados no Experimento I para os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC	44
FIGURA 4 -	Fluxograma ilustrativo dos procedimentos experimentais realizados no Experimento II para os grupos VEI-OST e ZOL-OST.....	44
FIGURA 5 -	Esquema representativo da ROI para as análises microtomográficas	51
FIGURA 6 -	Esquema representativo da ROI para as análises microscópicas	52
FIGURA 7 -	Peso corporal dos animais dos diferentes grupos ao longo de todo o período experimental	59
FIGURA 8 -	Resultados das análises microtomográficas para os diferentes parâmetros avaliados nos grupos experimentais	60
FIGURA 9 -	Aspecto microtomográfico da metáfise proximal da tíbia esquerda na região em que foi instalado o implante de titânio.....	61
FIGURA 10 -	Aspecto histopatológico dos tecidos peri-implantares nos diferentes grupos experimentais.....	63
FIGURA 11 -	Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.....	64
FIGURA 12 -	Contato osso/implante (COI) nos diferentes grupos experimentais	66
FIGURA 13 -	Padrão de imunomarcação para BMP2/4 nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais	70
FIGURA 14 -	Padrão de imunomarcação para RUNX2 nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais	71
FIGURA 15 -	Padrão de imunomarcação para OCN nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais	72
FIGURA 16 -	Padrão de imunomarcação para TRAP nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
±	mais ou menos
°	grau
°C	grau Celsius
°GL	grau GL (Gay Lussac)
μA	microampère
μg/Kg	micrograma por quilograma
μm	micrômetro
ADA	Associação Americana de Odontologia, <i>American Dental Association</i>
ALE	Alemanha
ALP	fosfatase alcalina, <i>alkaline phosphatase</i>
AM	Amazonas, Brasil
AN	Antuérpia, Bélgica
ATP	adenosina trifosfato
BEL	Bélgica
BMP2/4	proteína morfogenética óssea 2/4, <i>bone morphogenetic protein 2/4</i>
BPs	bisfosfonatos
BRA	Brasil
BSA	soro albumina bovino, <i>bovine serum albumine</i>
BV/TV	porcentagem de volume ósseo, <i>bone tissue/tissue volum</i>
CA	Califórnia, Estados Unidos da América
CCAC	Conselho Canadense de Cuidado Animal, <i>Canadian Council on Animal Care</i>
cél/mm ²	célula por milímetro quadrado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COI	contato osso/implante
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
FL	Flórida, Estados Unidos da América
FOA-UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

g	grama
GO	Goiás, Brasil
HE.....	hematoxilina-eosina
IL1 β	interleucina 1 β , <i>interleukin 1β</i>
IL6	interleucina 6, <i>interleukin 6</i>
IP.....	intraperitoneal
IV	intravenosa
kV	quilovolt
M.....	molar
MD.....	Maryland, Estados Unidos da América
mg	miligrama
mg/Kg	miligrama por quilograma
ml	mililitro
mm.....	milímetro
mM	milimolar
mm ²	milímetro quadrado
MO.....	Missouri, Estados Unidos da América
MUBIO.....	Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia
NaCl.....	cloreto de sódio
NI.....	Niedersachsen, Alemanha
n°.....	número
OCN.....	osteocalcina, <i>osteocalcin</i>
ONM-M.....	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa
PBS	tampão fosfato-salino, <i>phosphate buffered-saline</i>
pH	potencial hidrogeniônico
Po(tot).....	porosidade total, <i>total porosity</i>
PR	Paraná, Brasil
PTO-NV	porcentagem de tecido ósseo não vital
PTO-T.....	porcentagem de tecido ósseo total
RANKL	ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β , <i>receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand</i>
ROI.....	região de interesse, <i>region of interest</i>
rpm.....	rotação por minuto
RUNX2.....	fator de transcrição relacionado à runt 2, <i>runt-related transcription factor 2</i>

SP.....	São Paulo, Brasil
Tb.N.....	número de trabéculas ósseas, <i>trabecular number</i>
Tb.Sp	separação de trabéculas ósseas, <i>trabecular separation</i>
Tb.Th	espessura de trabéculas ósseas, <i>trabecular thickness</i>
TNF α	fator de necrose tumoral α , <i>tumoral necrosis factor α</i>
TRAP.....	fosfatase ácida resistente ao tartarato, <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP **98**

APÊNDICE B - Diretrizes ARRIVE para pesquisa animal **99**

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.1.1	Protocolo de habituação dos animais	38
3.1.2	Anestesia geral	39
3.1.3	Protocolo medicamentoso	39
3.1.4	Instalação dos implantes de titânio	40
3.1.5	Grupos experimentais	41
3.1.5.1	<i>Experimento I</i>	41
3.1.5.2	<i>Experimento II</i>	42
3.1.6	Eutanásia e obtenção das amostras	42
3.2	PROCESSAMENTO MICROTOMOGRÁFICO DAS AMOSTRAS	44
3.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS	45
3.3.1	Preparado histológico por desgaste	45
3.3.2	Preparado histológico com desmineralização	46
3.3.2.1	<i>Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)</i>	47
3.3.2.2	<i>Reação imunoistoquímica</i>	47
3.4	ANÁLISE DOS DADOS	49
3.4.1	Análise da condição geral de saúde dos animais e exame clínico das tíbias e da região peri-implantar	49
3.4.2	Análises microtomográficas	50
3.4.3	Análises microscópicas	51
3.4.3.1	<i>Análise histopatológica</i>	53
3.4.3.2	<i>Análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar</i>	53
3.4.3.3	<i>Análise histométrica do contato osso/implante (COI)</i>	54
3.4.3.4	<i>Análise imunoistoquímica</i>	54
3.4.4	Análise estatística	55
4	RESULTADOS	56

4.1	CONDIÇÃO GERAL DE SAÚDE DOS ANIMAIS E EXAME CLÍNICO DAS TÍBIAS E DA REGIÃO PERI-IMPLANTAR	57
4.1.1	Peso corporal dos animais	57
4.2	ANÁLISES MICROTOMOGRÁFICAS	58
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	61
4.4	PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO TOTAL (PTO-T) E PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO NÃO VITAL (PTO-NV) NA REGIÃO PERI-IMPLANTAR	64
4.5	CONTATO OSSO/IMPLANTE (COI).....	64
4.6	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	67
4.6.1	Imunomarcção para BMP2/4 nos tecidos peri-implantares.....	67
4.6.2	Imunomarcção para RUNX2 nos tecidos peri-implantares.....	67
4.6.3	Imunomarcção para OCN nos tecidos peri-implantares.....	68
4.6.4	Imunomarcção para TRAP nos tecidos peri-implantares	68
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICES.....	97
	APÊNDICE A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP	98
	APÊNDICE B - Diretrizes ARRIVE para pesquisa animal	99

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

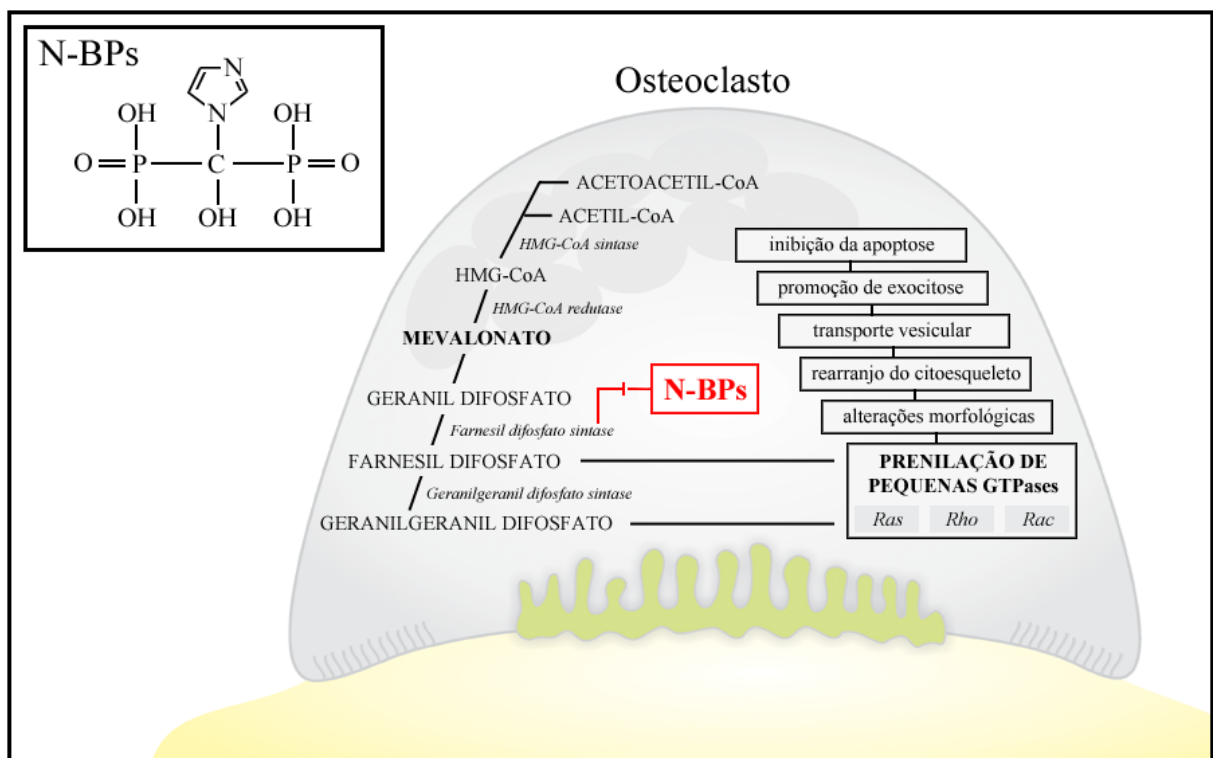
Os bisfosfonatos (BPs) consistem em uma linha de fármacos com potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea e que, deste modo, apresentam grande efetividade no tratamento de algumas osteopatias como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo, paratireoidismo primário, dentre outras (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008). Além disso, os BPs mais potentes são comumente empregados como adjuvantes na terapia oncológica para o controle da progressão de metástase óssea, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas, a exemplo de tumores de mama, próstata, pulmão e rim (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008).

Tais drogas são moléculas sintéticas análogas ao pirofosfato endógeno e que possuem dois grupamentos fosfatos ligados covalentemente a um carbono, onde estão ainda ligadas duas cadeias laterais, R1, que medeia a afinidade pelos cristais de hidroxiapatita e, R2, responsável pela potência e por suas principais propriedades farmacológicas (ROGERS et al., 2011). Uma forma de classificação dos BPs é baseada em sua via de administração, ou seja, oral ou intravenosa (IV). Outra maneira de classificação, a qual é mais utilizada, baseia-se em sua estruturação química (CHADHA et al., 2013). Assim, segundo sua composição e estruturação molecular, os BPs diferem-se uns dos outros por apresentarem ou não nitrogênio em sua cadeia lateral R2 (ROGERS et al., 2011), sendo que a presença ou a ausência desta molécula resulta em importantes alterações em seus mecanismos de ação (EBETINO et al., 2011) (FIGURA 1).

Dentre os BPs que não contêm nitrogênio estão: etidronato, clodronato e tiludronato. Estes fármacos são endocitados pelos osteoclastos, que os metabolizam, convertendo-os em uma molécula não funcional que compete com a adenosina trifosfato (ATP) no metabolismo energético da célula. O acúmulo intracelular dessas substâncias tem ação citotóxica e desencadeia a apoptose nos osteoclastos (EBETINO et al., 2011; ROGERS et al., 2011). Os BPs que contêm nitrogênio, por sua vez, são: pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato e zoledronato. Estes alteram o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato, através de sua interação e consequente inativação da enzima farnesil difosfato sintase (DUNFORD et al., 2001). A interrupção desta via ao nível da referida enzima impede a formação de farnesil difosfato e geranylgeranyl difosfato, os quais são essenciais para prenilação de pequenas GTPases, dentre as quais estão Ras, Rho e Rac (LUCKMAN et al., 1998), alvos do efeito desta classe de BPs. A ausência de tais proteínas está relacionada com a inibição da osteoclastogênese (ABE et al., 2012), com a indução de

apoptose prematura em osteoclastos ativos e, especialmente, com significativas alterações na dinâmica do citoesqueleto destas células, impossibilitando o tráfego vesicular e a formação da zona clara e da zona pregueada nos osteoclastos, eventos essenciais para a interação da célula com a matriz óssea e para a formação do microambiente propício para o início da atividade reabsortiva, respectivamente (COXON; ROGERS, 2003; EBETINO et al., 2011; ORY et al., 2008; ROGERS et al., 2011) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Estrutura molecular dos bisfosfonatos nitrogenados e esquema representativo da via do mevalonato no osteoclasto, com destaque para o local de atuação destes fármacos.



Abreviação: *N-BPs*, bisfosfonatos nitrogenados. FONTE: Adaptado de Migliaccio; Brama; Spera (2007).

Dentre as reações adversas ocasionadas pelo uso dos BPs merece destaque, principalmente dentro da área odontológica, a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M), a qual tem sido observada cada vez com maior frequência em função da crescente utilização desta classe de fármacos (LUNGU et al., 2018) e também em razão do aumento significativo na expectativa de vida da população, de modo geral. A ONM-M é definida como a presença de osso exposto na região maxilofacial por um período maior do que oito semanas, em pacientes submetidos a tratamento prévio ou atual com droga antirreabsortiva e que não possuem história prévia de radioterapia nesta região (RUGGIERO et al., 2014). Além dos BPs, outros medicamentos com potente atividade antirreabsortiva têm

sido relacionados à ocorrência da ONM-M, como é o caso do Denosumab, um inibidor seletivo do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANKL, *Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand*) (KAJIZONO et al., 2015; O'HALLORAN; BOYD; SMITH, 2014; SIVOLELLA et al., 2013).

Ruggiero et al. (2014) classificaram a ONM-M da seguinte maneira: estágio I: osso necrótico exposto com ausência de dor e/ou sinais de infecção (assintomático); estágio II: osso necrótico exposto com presença de dor e/ou sinais de infecção (sintomático) e; estágio III: osso necrótico exposto com presença de dor e/ou sinais de infecção, juntamente com um ou mais dos seguintes sinais: fratura patológica, fístula oro-cutânea, envolvimento do seio maxilar ou extensão da necrose para a borda inferior ou ramo da mandíbula. Além disso, um estágio 0 precede os descritos anteriormente, no qual há ausência de osso exposto, no entanto, há evidências de sinais clínicos ou radiográficos de osteonecrose (RUGGIERO et al., 2014).

Ainda que as primeiras descrições de ONM-M tenham sido publicadas em 2003 (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003; WANG; GOODGER; POGREL, 2003), sua etiopatogenia é pobremente compreendida. Como a investigação dos fatores etiopatológicos apresenta limitações em estudos executados em humanos, atualmente os modelos experimentais em animais têm direcionado as pesquisas científicas, entretanto, em função de tais modelos e protocolos medicamentosos serem muito diversificados, os resultados mostram-se escassos, incongruentes e, muitas vezes, contraditórios. Além disso, atualmente é que as pesquisas epidemiológicas ganharam consistência e, com isso, os fatores de risco têm ficado cada vez mais evidentes (DODSON, 2015). Sendo assim, modelos experimentais em animais correlacionados aos principais fatores de risco para o desenvolvimento da ONM-M ainda são uma necessidade.

Dentre os supostos fatores etiopatológicos que atualmente são apontados como os desencadeadores da ONM-M estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, o que resulta no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo e, conseqüentemente, em áreas de tecido ósseo não vital, favorecendo o estabelecimento de infecção com subsequente aumento da necrose óssea; o potente efeito antiangiogênico dos BPs, o que resulta em necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzido pelos BPs, os quais aumentam a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto; o efeito citotóxico dos BPs sobre várias linhagens de células, o que resulta na diminuição da capacidade de reparo, tanto dos tecidos moles, quanto dos tecidos duros da região bucomaxilofacial e; a disfunção local da resposta imunológica, o que compromete a resposta protetiva local e a reparação tecidual, concomitantemente (ALLEN; BURR, 2009;

RUGGIERO et al., 2014). Todavia, muitas são as hipóteses e poucas são as comprovações científicas (ALLEN; BURR, 2009). Assim, a limitada compreensão da etiopatogenia desta condição restringe sobremaneira a elaboração de protocolos para sua prevenção e tratamento, os quais não obedecem a uma conduta clínica padrão e mostram-se frequentemente falhos (ROSELLA et al., 2016; YAMACHIKA et al., 2015; YAMASHITA; MCCAULEY, 2012).

A ONM-M é uma condição menos comum em pacientes que fazem uso de BPs administrados por via oral, no entanto, em paciente que fazem uso de BPs pela via IV, como é o caso do zoledronato ou de sua associação com outros BPs, prescritos para a complementação da terapia oncológica, a incidência da ONM-M atinge de 1 a 12% dos pacientes, e como os BPs têm efeito cumulativo nos tecidos mineralizados, esta incidência pode atingir até 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso destes medicamentos (GOMEZ FONT; MARTINEZ GARCIA; OLMOS MARTINEZ, 2008). Além disso, a administração anual IV de zoledronato em pacientes com osteoporose vem se tornando uma conduta terapêutica bastante utilizada na atualidade para o tratamento desta condição, especialmente em função de sua praticidade (SHIRAKI et al., 2017; YANG, Y. et al., 2015). Alguns casos de ONM-M relacionados a esta posologia medicamentosa já foram descritos, todavia, ainda existem grandes controversas (ATA-ALI et al., 2016; KATZ; ORDOVEZA, 2014; MINIELLO et al., 2015; PREIDL et al., 2014).

Otto et al. (2011), em um acurado estudo epidemiológico, reportaram que a ONM-M acomete com maior frequência o sexo feminino (73%), com idade avançada (em média 66 anos e uma variação entre 42-90 anos de idade), que fazem ou fizeram uso crônico de BPs administrados por via IV (96,8%), especificamente o zoledronato, ou este em associação com outros BPs. Há uma predileção pela ocorrência na mandíbula, especialmente na região dos pré-molares e molares (70,6%), e procedimentos odontológicos invasivos, como exodontias de dentes com comprometimento periodontal ou periapical e cirurgias orais menores, de modo geral, são tidos como os principais fatores desencadeadores da ONM-M (OTTO et al., 2011; WALTER et al., 2016).

Apesar da crescente valorização da odontologia nos últimos anos, a perda de elementos dentais ainda continua sendo uma realidade para muitos indivíduos, principalmente em decorrência da falta de acesso à informação, da precariedade nos atendimentos do sistema público de saúde, da sua condição socioeconômica, ou mesmo devido a mutilações provenientes de traumas ou ressecções cirúrgicas de lesões do complexo bucomaxilofacial (FERNÁNDEZ-BARRERA et al., 2016; KIM et al., 2015). Para suprir a necessidade de restabelecimento da função afetada nestes pacientes, há algumas décadas os implantes

dentários osseointegráveis vêm sendo considerados como o padrão ouro nas reabilitações de desdentados totais ou parciais, pois oferecem não apenas vantagens biológicas e funcionais quando comparados às próteses fixas e removíveis convencionais, mas também excelentes resultados a longo prazo, como documentado em estudos de acompanhamento por dez anos, que apontaram altas taxas de sucesso e sobrevida dos implantes em aproximadamente 95% dos casos (BOSSHARDT; CHAPPUIS; BUSER, 2017; BUSER; SENNERBY; BRUYN, 2017; NGUYEN; DRISCOLL; COLETTI, 2011).

Apesar de todos os benefícios já descritos, a instalação de implantes dentários, por si só, deve ser considerada como um procedimento odontológico invasivo, classificado dentro do grupo das cirurgias orais menores, e que pode ser uma opção de tratamento reabilitador muito comum em pacientes que fizeram ou fazem o uso de BPs, tendo em vista que as enfermidades que levam à necessidade de utilização de tais fármacos e a ausência de elementos dentais são características comuns em pacientes da terceira idade (CHADHA et al., 2013; WALTER et al., 2016). Assim, diante da necessidade de se trabalhar com maior segurança neste grupo de pacientes, torna-se cada vez mais pertinente questionar o risco de desenvolvimento da ONM-M em pacientes submetidos ao tratamento com BPs e que receberam implantes dentários antes, durante ou após a utilização destes medicamentos (DE FREITAS et al., 2016).

No ano de 2006, a Associação Americana de Odontologia (ADA, *American Dental Association*) alertou para o fato de que a instalação de implantes osseointegráveis ou o emprego de terapias regenerativas guiadas em pacientes tratados com BPs poderia aumentar o risco de ocorrência da ONM-M (ATA-ALI et al., 2016). Estudos clínicos evidenciaram o desenvolvimento de ONM-M como resultado pós-cirúrgico em pacientes que fizeram o uso de BPs, incluindo o zoledronato, na maioria dos casos, como adjuvantes ao tratamento oncológico e foram submetidos à instalação de implantes dentários (JACOBSEN et al., 2013; JUNQUERA; GALLEGO; PELAZ, 2011; LAZAROVICI et al., 2010; SVERZUT et al., 2012). Lazarovici et al. (2010) e Miniello et al. (2015) ainda reportaram a ocorrência de ONM-M em pacientes que fizeram uso de BPs de baixa potência relativa ou em pequenas concentrações para o tratamento da osteoporose e que também foram submetidos à instalação de implantes dentários. Porém, para alguns autores, o uso de BPs não pode ser considerado uma contra-indicação para a cirurgia de instalação dos implantes (FERLITO; LIARDO; PUZZO, 2011; MATTHEOS et al., 2013; SIEBERT et al., 2015).

Assim, devido a esta grande diversidade de achados clínicos disponíveis até então, pesquisas experimentais tornam-se cada vez mais necessárias para direcionarem o

entendimento a respeito da relação entre o uso de BPs, a instalação de implantes osseointegráveis e a ocorrência da ONM-M, além de nortear o estabelecimento de protocolos e condutas clínicas seguras a serem aplicadas nestes pacientes. Porém, a escassez de estudos experimentais que envolvam especificamente tais condições ainda é uma realidade dentro deste campo da pesquisa odontológica. Ademais, a não utilização de um modelo experimental adequado e padronizado, reunindo os principais fatores de risco para o desenvolvimento da ONM-M, e as análises dos resultados evidentemente direcionadas apenas para a quantidade de tecido ósseo neoformado ao redor do implante em detrimento da avaliação histopatológica dos tecidos peri-implantares, a qual estaria intimamente associada à ocorrência ou ao risco de desenvolvimento da ONM-M, são os achados mais frequentes na literatura (ABTAHI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; KIM et al., 2013).

O processo de reparo dos tecidos peri-implantares deve ser encarado como algo dinâmico, complexo e que está diretamente relacionado ao sucesso clínico dos implantes osseointegráveis (INSUA et al., 2017). Com a utilização das ligas de titânio para a confecção dos implantes dentários, Brånemark et al. (1977) introduziram o termo osseointegração para caracterizar a união anatômico-funcional entre a superfície do implante e o tecido ósseo adjacente, analisada através de microscopia de luz. Desde então, muitos autores têm utilizado apenas este conceito para descrever o sucesso ou o fracasso do tratamento reabilitador (AYAN et al., 2012; DUNDAR et al., 2017; YAMAN et al., 2012). Porém, deve-se atentar ao fato de que outros quesitos são imprescindíveis para que o processo de reparo peri-implantar seja considerado bem sucedido, sendo que a osseointegração é simplesmente mais um deles. Assim, não apenas a extensão da área de contato osso/implante, mas a quantidade de tecido ósseo neoformado em espessura ao redor das espiras do componente metálico e, principalmente, a qualidade deste tecido, no que diz respeito às suas características celulares, estruturais e à sua vitalidade, são aspectos que merecem destaque durante a avaliação do processo de reparação tecidual (CHADHA et al., 2013; DE FREITAS et al., 2016). A instalação de implantes de titânio em tibia tem sido o modelo animal clássico para a avaliação do reparo peri-implantar, especificamente da osseointegração, em virtude das facilidades operatórias, da previsibilidade do curso de reparação tecidual e da similaridade estrutural e taxa de remodelação que o tecido ósseo desta região, especialmente o esponjoso, apresenta com o tecido ósseo alveolar (GLOSSEL et al., 2010).

Fatores relacionados ao implante, como o diâmetro e o tipo de tratamento de superfície, parecem ter influência direta sobre o processo de reparo ósseo peri-implantar (BRINK; MERAW; SARMENT, 2007; FRANCHI et al., 2004). Além disso, algumas

condições sistêmicas desfavoráveis podem interferir negativamente durante a neoformação óssea ao redor dos implantes de titânio, destacando-se: doenças pré-existentes, como o diabetes e a osteoporose; tratamentos prévios ou concomitantes com irradiação na região de cabeça e pescoço; pacientes fumantes e; a utilização de vários tipos de medicamentos, incluindo os antirreabsortivos, como é o caso dos BPs (CHADHA et al., 2013; WALTER et al., 2016). Tais medicamentos, por suas características farmacológicas, reduzem significativamente a taxa de remodelação óssea e exercem potente efeito citotóxico sobre as células dos tecidos moles e duros ao redor dos implantes, prolongando o tempo de exposição óssea e favorecendo a instalação de infecções, o que dificulta sobremaneira o processo de reparação tecidual (ANAVI-LEV et al., 2013; ATA-ALI et al., 2016; BASSO et al., 2013; REID; BOLLAND; GREY, 2007). Com isso, complicações mais severas, como a peri-implantite, e que estão relacionadas a condições inflamatórias e infecciosas agudas, têm alto potencial para favorecer o desencadeamento da ONM-M (WALTER et al., 2016). Todavia, mais estudos ainda são necessários para elucidar efetivamente a patogênese desta condição.

Diante do exposto, verifica-se que em decorrência do envelhecimento da população, a utilização de BPs será cada vez mais frequente, por se tratar de uma das únicas alternativas terapêuticas para algumas osteopatias comuns na terceira idade. A instalação de implantes dentários também é um procedimento odontológico cuja prevalência tem aumentado à medida que o seu sucesso clínico e suas vantagens sobre as próteses fixas e removíveis convencionais têm ficado cada vez mais evidentes, tornando-se um tratamento comum em pacientes de idade avançada, sejam eles desdentados totais ou parciais. Deste modo, pacientes que fazem ou fizeram uso crônico de BPs e que necessitam de um tratamento reabilitador com implantes osseointegráveis serão cada vez mais comuns no consultório odontológico. Por isso, elucidar como se dá a evolução do processo de reparo peri-implantar durante ou após o tratamento com dose oncológica ou dose osteoporótica de BPs e estabelecer sua relação com a ocorrência de eventos osteonecróticos, a fim de que se possa trabalhar de modo seguro, além de possibilitar o desenvolvimento de terapias curativas e/ou preventivas para tal condição, é algo que se faz necessário.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi analisar o processo de reparo peri-implantar na tíbia de ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato e avaliar a existência de correlação entre tal processo e a ocorrência de lesões osteonecroticas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tal propósito, foram conduzidos simultaneamente dois experimentos: o Experimento I, cujo intuito foi avaliar a evolução do processo de reparo peri-implantar na tíbia de ratas tratadas com dose oncológica de zoledronato e, posteriormente, submetidas ao procedimento de instalação dos implantes de titânio osseointegráveis e; o Experimento II, cujo intuito foi avaliar a evolução do processo de reparo peri-implantar na tíbia de ratas tratadas com dose osteoporótica de zoledronato e que, em dado momento da terapia medicamentosa, foram submetidas ao procedimento de instalação dos implantes de titânio osseointegráveis.

Nas regiões de interesse pré-estabelecidas, foram efetuadas as seguintes avaliações: análise da condição geral de saúde dos animais e exame clínico das tíbias e da região peri-implantar; análises microtomográficas de parâmetros que permitiram verificar a microarquitetura e estruturação do tecido ósseo peri-implantar; análise histopatológica dos tecidos peri-implantares e adjacentes; análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total e análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo não vital na região peri-implantar; análise histométrica do contato osso/implante, parâmetro que possibilitou avaliar a osseointegração dos implantes de titânio, e; análise imunoistoquímica direcionada para a detecção dos seguintes biomarcadores: proteína morfogenética óssea 2/4 (BMP2/4, *Bone morphogenetic protein 2/4*); fator de transcrição relacionado à runt 2 (RUNX2, *Runt-related transcription factor 2*); osteocalcina (OCN, *Osteocalcin*), envolvidos com a osteoblastogênese e atividade das células da linhagem osteoblástica, e; fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *Tartrate-resistant acid phosphatase*), um evidenciador de osteoclastos.

MATERIAL E MÉTODOS



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo foram utilizadas 40 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com seis meses de idade e peso corporal médio de 300g no início do período experimental. Tais animais foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP) e foram, posteriormente, mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Ciências Básicas (Disciplina de Histologia e Embriologia) da FOA-UNESP sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação e exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55\% \pm 5\%$, e acondicionamento em gaiolas plásticas com, no máximo, quatro animais por gaiola, onde tiveram livre acesso à água e à alimentação, constituída exclusivamente por ração industrializada (Presence Ratos e Camundongos®, Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda., Paulínia/SP, BRA). Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento.

Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “*Guide to the care and use of experimental animals*”, elaborado pelo Conselho Canadense de Cuidado Animal (CCAC, *Canadian Council on Animal Care*). Todo o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP em 19/04/2017 (Processo FOA nº. 00336-2017; vide APÊNDICE A). Este trabalho encontra-se também de acordo com as diretrizes ARRIVE para pesquisa animal (KILKENNY et al., 2010; vide APÊNDICE B).

3.1.1 Protocolo de habituação dos animais

Com a principal finalidade de minimizar o estresse provocado pelas manobras pré-operatórias e de manipulação, além de promover a familiarização com o ambiente, todos os animais passaram por um período padrão de habituação ao serem trazidos do Biotério Central para o Biotério de Experimentação. Tal protocolo compreendeu os 14 dias que antecederam ao início do delineamento dos grupos, sendo que neste período, a cada quatro dias, cada animal foi suavemente manuseado entre as mãos do operador durante um intervalo de 30

segundos, no qual foram aplicadas as manobras de restrição específicas que simularam aquelas a serem empregadas no posterior protocolo experimental.

3.1.2 Anestesia geral

Para a instalação dos implantes de titânio e eutanásia, todos os animais foram submetidos à anestesia geral prévia, via injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (80mg/Kg; Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda., Santana do Parnaíba/SP, BRA) acrescida de cloridrato de xilazina (10mg/Kg; Xilazin®, Syntec do Brasil Ltda.). Nos casos em que não foi possível a obtenção de um plano profundo de anestesia houve a complementação com a metade da dose inicial aplicada.

3.1.3 Protocolo medicamentoso

No Experimento I, o plano de tratamento medicamentoso teve duração total de oito semanas e a administração ocorreu pela via intraperitoneal (IP), com aplicações a cada quatro dias, totalizando quinze doses de zoledronato ou veículo. No Experimento II, o plano de tratamento medicamentoso teve duração total de 24 semanas e a administração também ocorreu pela via IP, com aplicações a cada 28 dias, totalizando sete doses.

O veículo para administração do medicamento consistiu em 0,45ml de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. A dose de zoledronato (*Zoledronic acid monohydrate*, Sigma-Aldrich Co., St. Louis/MO, EUA) utilizada foi de 100µg/Kg, a qual foi diluída no veículo. Tal dosagem e planos de tratamento medicamentosos consistiram em uma adaptação para o rato dos atuais protocolos clínicos empregados para a complementação da terapia oncológica (dosagem oncológica) e para o tratamento osteoporótico (dosagem osteoporótica) no humano.

A terapia com zoledronato na dosagem oncológica em humanos consiste, na grande maioria das vezes, na administração IV de 4mg deste fármaco a cada três ou quatro semanas (BIENZ; SAAD, 2015; VAN POZNAK et al., 2011). Alguns estudos experimentais publicados nos últimos anos que envolviam a administração de zoledronato na posologia utilizada para mimetizar o tratamento oncológico empregaram uma dose deste medicamento que variou de 200µg/Kg a 300µg/Kg, fracionada ou não ao longo de uma semana, por um período compreendido entre quatro e doze semanas (AGAÇAYAK et al., 2014; AGHALOO et al., 2011; BARBA-RECREO et al., 2015; BARBA-RECREO et al., 2014; ÇANKAYA et al., 2013; DAYISOYLU et al., 2014; DAYISOYLU et al., 2013; JANG; KIM; CHA, 2015;

KIM et al., 2016; MERGONI et al., 2016; PACHECO et al., 2015; SENEL et al., 2010; SILVA et al., 2015). Silva et al. (2015) avaliaram especificamente o efeito de diferentes doses de zoledronato no rato e preconizaram o emprego de 200µg/Kg por semana como a dose ideal para estudos neste animal. Deste modo, em estudos publicados (ERVOLINO et al., 2019; STATKIEVICZ et al., 2018; TORO et al., 2019) e nos trabalhos em andamento realizados por nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Osteobiologia Aplicada à Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, FOA-UNESP), considerando o tempo médio de vida, o peso e a superfície corporal da espécie utilizada, optou-se por fracionar tal dose ao longo de uma semana, correspondendo à administração IP de 100µg/Kg a cada quatro dias, o que favoreceria a manutenção de um nível mais constante de absorção.

Na atualidade, o protocolo medicamentoso com zoledronato empregado para o tratamento da osteoporose em humanos é realizado através da aplicação IV de 5mg do fármaco em dosagem única, anualmente (SHIRAKI et al., 2017; YANG, Y. et al., 2015). Esta dosagem corresponde, aproximadamente, a 10% daquela utilizada no protocolo oncológico com o mesmo tipo de medicamento. Mantendo-se as devidas proporções e utilizando-se dos mesmos parâmetros adotados para a definição da dosagem oncológica, a dose utilizada foi de 100µg/Kg a cada 28 dias, à semelhança de estudos experimentais prévios (HAO et al., 2015; KHAJURIA et al., 2017; OLEJNIK et al., 2016; TÜRKER et al., 2016).

3.1.4 Instalação dos implantes de titânio

Com os animais submetidos à anestesia geral, foi realizada a tricotomia da porção medial das patas posteriores direita e esquerda, seguida pela antisepsia destas regiões com solução tópica de iodopovidona a 10%. Os animais foram então posicionados em mesa operatória apropriada, com a finalidade de permitir a manutenção dos mesmos em condição adequada para o acesso às tíbias. Uma incisão de aproximadamente 30mm foi realizada com lâmina de bisturi 15C pelo lado medial em cada uma das tíbias (FIGURA 2A). Com o auxílio de um descolador de periósteo, os tecidos moles foram devidamente afastados, respeitando-se os planos anatômicos, até que houvesse a exposição completa do tecido ósseo subjacente (FIGURA 2B). Um leito bicortical foi preparado na metáfise proximal de cada uma das tíbias, perpendicular ao seu longo eixo, utilizando-se uma fresa helicoidal de 2,0mm de diâmetro (Conexão Sistema de Prótese Ltda., Arujá/SP, BRA) montada em motor cirúrgico com 980rpm (Ômega®, Dentscler Indústria de Aparelhos Odontológicos Ltda., Ribeirão Preto/SP,

BRA), acompanhada por irrigação constante com solução de NaCl 0,9% e aspiração com sugador de alta potência (FIGURA 2C).

Em cada um dos leitos preparados foi instalado um implante de titânio (DSP Biomedical, Campo Largo/PR, BRA) com 4,0mm de comprimento, 2,2mm de diâmetro, superfície tratada por meio de jateamento e ataque ácido e conexão protética do tipo cone morse. A instalação foi realizada com o auxílio de uma chave digital de 1,2mm acoplada à plataforma do implante até que o mesmo ficasse ao nível do tecido ósseo (FIGURA 2D, 2E). Por fim, foi realizada a sutura em planos dos tecidos, utilizando-se fio de seda 4.0 (Shalon Sutures, São Luís de Montes Belos/GO, BRA) (FIGURA 2F). Todos os procedimentos cirúrgicos para a instalação dos implantes de titânio basearam-se no protocolo descrito por Matheus et al. (2018).

3.1.5 Grupos experimentais

3.1.5.1 Experimento I

Nesta etapa do estudo, os animais (n=20) foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais, os quais foram tratados apenas com veículo (grupo VEI-ONC, n=10) ou com veículo acrescido de zoledronato (grupo ZOL-ONC, n=10), na posologia utilizada para mimetizar o tratamento oncológico:

Grupo VEI-ONC: Receberam injeção IP constituída por veículo, a cada quatro dias, durante oito semanas. Decorridas oito semanas do término do tratamento medicamentoso, foi realizada a instalação de um implante de titânio nas tíbias direita e esquerda de todos os animais. A eutanásia foi efetuada aos 56 dias pós-operatórios (FIGURA 3).

Grupo ZOL-ONC: Receberam injeção IP constituída por veículo acrescido de zoledronato, a cada quatro dias, durante oito semanas. Decorridas oito semanas do término do tratamento medicamentoso, foi realizada a instalação de um implante de titânio nas tíbias direita e esquerda de todos os animais. A eutanásia foi efetuada aos 56 dias pós-operatórios (FIGURA 3).

Neste experimento, o intuito foi simular a seguinte condição clínica: paciente tratado com dose oncológica de zoledronato por um período de aproximadamente três anos, seguido por um intervalo de outros três anos, e então submetido à instalação de implantes osseointegráveis. Para este propósito, as ratas foram tratadas com a dose de zoledronato supracitada durante dois meses, seguida por um intervalo de outros dois meses, e então foram

submetidas à instalação dos implantes de titânio nas tíbias. Os períodos de tempo empregados nesta etapa basearam-se na correspondência entre o tempo de vida do rato e do humano (ANDREOLLO et al., 2012).

3.1.5.2 *Experimento II*

Nesta etapa do estudo, os animais (n=20) foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais, os quais foram tratados apenas com veículo (grupo VEI-OST, n=10) ou com veículo acrescido de zoledronato (grupo ZOL-OST, n=10), na posologia utilizada para mimetizar o tratamento osteoporótico:

Grupo VEI-OST: Receberam injeção IP constituída por veículo, a cada 28 dias, durante 24 semanas. Decorridas 16 semanas do início do tratamento medicamentoso, foi realizada a instalação de um implante de titânio nas tíbias direita e esquerda de todos os animais. A eutanásia foi efetuada aos 56 dias pós-operatórios (FIGURA 4).

Grupo ZOL-OST: Receberam injeção IP constituída por veículo acrescido de zoledronato, a cada 28 dias, durante 24 semanas. Decorridas 16 semanas do início do tratamento medicamentoso, foi realizada a instalação de um implante de titânio nas tíbias direita e esquerda de todos os animais. A eutanásia foi efetuada aos 56 dias pós-operatórios (FIGURA 4).

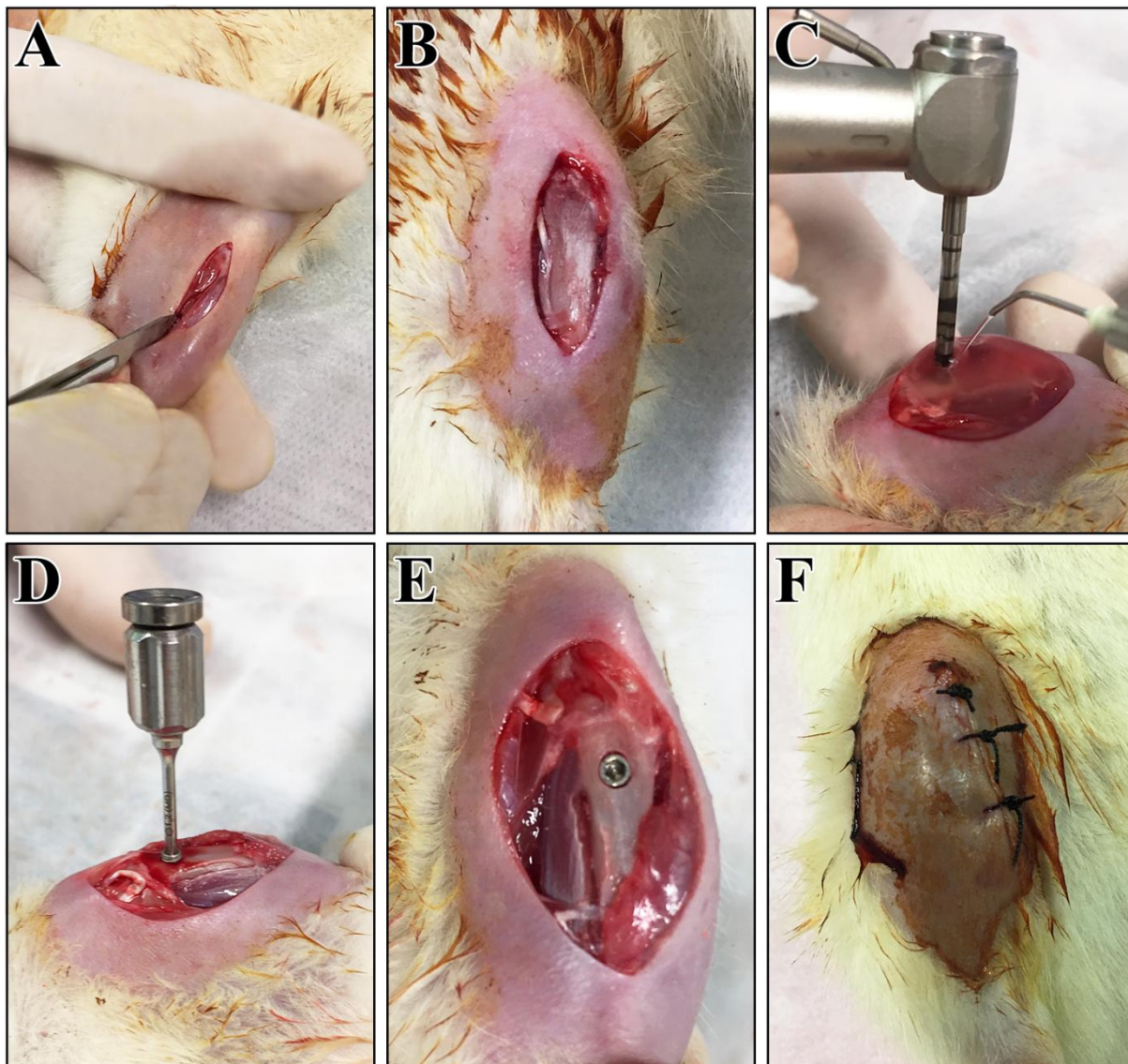
Neste experimento, o intuito foi simular a seguinte condição clínica: paciente em tratamento contínuo com dose osteoporótica de zoledronato há cerca de seis anos e então submetido à instalação de implantes osseointegráveis. Para este propósito, as ratas foram tratadas com a dose de zoledronato supracitada durante quatro meses, e então foram submetidas à instalação dos implantes de titânio nas tíbias. À semelhança do Experimento I, os períodos de tempo empregados nesta etapa também se basearam na correspondência entre o tempo de vida do rato e do humano (ANDREOLLO et al., 2012).

3.1.6 Eutanásia e obtenção das amostras

Findado o protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com 100ml de solução de NaCl 0,9% acrescida de 0,1% de heparina, seguida por 800ml de solução fixadora, constituída de 4% de formaldeído (*Paraformaldehyde*, Sigma-Aldrich Co.) em tampão fosfato-salino (PBS, *Phosphate buffered-saline*), 0,1M, 4°C, pH 7,4. As tíbias direitas e esquerdas foram cuidadosamente dissecadas e

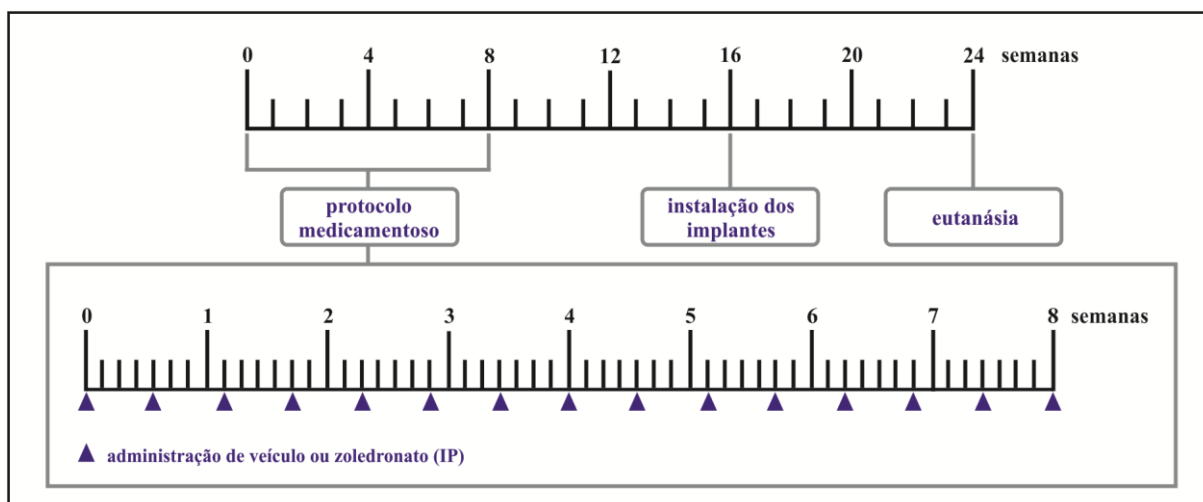
submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora por um período de 48 horas para os processamentos laboratoriais subsequentes.

FIGURA 2 - Sequência de procedimentos clínicos para a instalação do implante de titânio na tíbia dos animais.



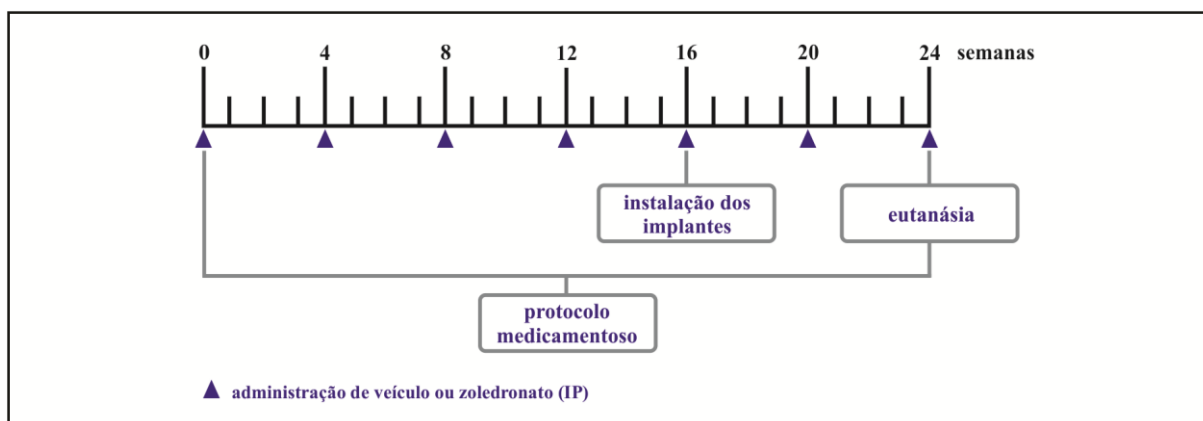
Descrição: (A) Incisão realizada na porção medial da pata posterior do animal após a tricotomia e antissepsia desta região; (B) Tecidos moles afastados até a completa exposição do tecido ósseo subjacente; (C) Fresagem do osso para confecção de um leito bicortical na metáfise proximal da tíbia sob constante irrigação com solução de NaCl 0,9%; (D) Instalação do implante de titânio com chave digital; (E) Implante em posição apresentando sua plataforma ao nível do tecido ósseo; (F) Ferida cirúrgica suturada. FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 3 - Fluxograma ilustrativo dos procedimentos experimentais realizados no Experimento I para os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC.



Abreviação: *IP*, injeção intraperitoneal. FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 4 - Fluxograma ilustrativo dos procedimentos experimentais realizados no Experimento II para os grupos VEI-OST e ZOL-OST.



Abreviação: *IP*, injeção intraperitoneal. FONTE: O Autor (2019).

3.2 PROCESSAMENTO MICROTOMOGRÁFICO DAS AMOSTRAS

Para a análise da estruturação e microarquitetura do tecido ósseo peri-implantar, as tíbias esquerdas pós-fixadas foram lavadas em água corrente durante 12 horas e permaneceram imersas em água durante todo o período de escaneamento microtomográfico. Tais peças foram escaneadas em microtomógrafo computadorizado de alta resolução (SkyScan® 1272, Bruker Corporation, Kontich/AN, BEL), pertencente ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO) da FOA-UNESP, com o auxílio de *software* próprio do aparelho (versão 1.1.9), de acordo com os seguintes parâmetros e

especificações: tempo aproximado de aquisição das imagens: 60 minutos, sendo que foram escaneadas duas amostras por vez, as quais foram reconstruídas separadamente em momento posterior; fonte de raio-x (voltagem - corrente): 70kV - 142 μ A; filtro: alumínio 0,5mm; tamanho do pixel: 8,0 μ m; intervalo de exposição: 0,6°; ângulo de rotação: 360°; movimentação aleatória em pixel: 10; resolução das imagens em pixel: 2016 x 1344; formato do arquivo das imagens adquiridas: TIFF.

Os cortes tomográficos, também chamados de *slices*, obtidos a partir do escaneamento das amostras foram reconstruídos através do *software* NRecon® (versão 1.6.10.2; SkyScan®), de acordo com as configurações: suavização: 5; compensação de desalinhamento: -6,5; redução de artefatos em anel: 7; correção de endurecimento de feixe: 40%; valor mínimo e máximo do histograma: 0,017000 - 0,280000. Na sequência, as imagens reconstruídas foram editadas com o auxílio do *software* DataViewer® (versão 1.4.1.2 64-bit; SkyScan®), de modo a permitir a escolha da orientação e do posicionamento mais adequados para as análises subsequentes. Tais imagens foram então salvas no formato de conjunto de dados (*dataset*), segundo o plano de corte sagital (eixos Z-Y). Findado o protocolo de escaneamento microtomográfico, as amostras foram novamente imersas na solução fixadora em que se encontravam.

3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Preparado histológico por desgaste

Para a avaliação da osseointegração dos implantes de titânio através da análise histométrica do contato osso/implante (COI), após o escaneamento microtomográfico das tíbias esquerdas, tais amostras foram submetidas à lavagem em água corrente por 24 horas. Na sequência, foi realizada a desidratação e concomitante coloração das peças pelo etanol em série crescente (60°GL, 24 horas; 80°GL, 24 horas; 90°GL, 24 horas; 100°GL, 24 horas) com adição de fucsina básica (0,005%), seguida por cinco trocas de acetona, uma a cada seis dias. As amostras foram então submetidas a seis banhos (24 horas; 48 horas; 7 dias; 10 dias; 10 dias; 10 dias) de resina de poliéster cristal de alta viscosidade (Arazyn 1.0#00 BB®, Redelease Produtos para Indústrias Ltda., Barueri/SP, BRA), sem adição de catalisador e, em seguida, incluídas a vácuo na mesma resina, desta vez com adição de seu catalisador específico (Butanox M-50®, Redelease Produtos para Indústrias Ltda.). Após a presa completa do material, os excessos de resina foram recortados com o auxílio de uma broca de

tungstênio de corte cruzado médio montada em micromotor odontológico com peça reta. Os blocos de resina contendo as tíbias e os seus respectivos implantes de titânio foram então desgastados com a utilização de lixas d'água (Wetordry®, 3M do Brasil Ltda., Sumaré/SP, BRA) de granulação crescente (#100; #400; #600), seguindo o longo eixo do implante, até atingirem a espessura de 500µm, quando foram colados em lâminas de vidro convencionais para microscopia (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais, São José dos Pinhais/PR, BRA), utilizando-se adesivo à base de resina fotopolimerizável, com o intuito de aumentar a resistência das peças e, assim, possibilitar o término do desgaste e polimento das mesmas com lixa d'água (Wetordry®, 3M do Brasil Ltda.) de maior granulação (#1200), até alcançarem a espessura final de 150µm. Todas as etapas do processamento para obtenção do preparado histológico por desgaste foram baseadas no protocolo descrito por Matheus et al. (2018).

3.3.2 Preparado histológico com desmineralização

As tíbias direitas pós-fixadas foram submetidas à lavagem em água corrente por 12 horas e imersas em solução desmineralizadora, constituída por 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; *Ethylenediaminetetraacetic acid*, Sigma-Aldrich Co.) em PBS, durante 30 dias. Após a desmineralização, as amostras foram novamente submetidas à lavagem em água corrente por 24 horas e o implante foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma chave digital de 1,2mm. Na sequência foi realizado o processamento histológico convencional para microscopia de luz, através da desidratação pelo etanol em série crescente (70°GL, 60 minutos; 80°GL, 30 minutos; 90°GL, 30 minutos; 95°GL, 60 minutos; 100°GL-I, 60 minutos; 100°GL-II, 60 minutos; 100°GL-III, 60 minutos), diafanização em sequência de xilol (etanol 100°GL 50%/xilol 50%, 60 minutos; xilol-I, 40 minutos, xilol-II, 40 minutos; xilol-III, 40 minutos), impregnação pela parafina histológica em série (parafina-I, 60 minutos; parafina-II, 60 minutos; parafina-III, 60 minutos) e, por fim, inclusão na parafina histológica, de modo que o longo eixo da loja anteriormente ocupada pelo implante ficasse paralelo à superfície do bloco de parafina. As amostras foram então seccionadas em micrótomo com 5µm de espessura, seguindo um plano de corte longitudinal em relação à loja anteriormente ocupada pelo implante. Os cortes seriados correspondentes à porção central de tal loja foram devidamente coletados em lâminas de vidro convencionais para microscopia (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais), impregnadas por polilisina, e em lâminas de vidro silanizadas para microscopia (Platinum Line® StarFrost, Mercedes Medical LLC., Sarasota/FL, EUA).

3.3.2.1 Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)

Para a análise histopatológica, análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar, as secções histológicas foram submetidas à coloração pela HE. Para isso, as secções histológicas coletadas em lâminas de vidro convencionais para microscopia passaram pelo processo de desparafinização inicial em estufa de cultura bacteriológica com temperatura controlada (56°C a 58°C), durante aproximadamente 30 minutos, seguida pela desparafinização completa em sequência de xilol (xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 10 minutos), hidratação pelo etanol em série decrescente (100°GL-I, 2 minutos; 100°GL-II, 2 minutos; 100°GL-III, 2 minutos; 95°GL, 2 minutos; 70°GL, 2 minutos), lavagem em água, imersão em hematoxilina de Harris por 45 segundos, lavagem em água para retirada do excesso de corante, imersão em eosina acrescida de floxina por 3 minutos, lavagem em água para retirada do excesso de corante, desidratação pelo etanol em série crescente (70°GL, 1 minuto; 90°GL, 1 minuto; 95°GL, 1 minuto; 100°GL-I, 1 minuto; 100°GL-II, 1 minuto; 100°GL-III, 1 minuto), diafanização em sequência de xilol (etanol 100°GL 50%/xilol 50%, 1 minuto; xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 5 minutos) e, por fim, recobrimento com meio de montagem (Permount®, Fisher Scientific Company LLC., San Diego/CA, EUA) e proteção com lamínulas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais).

3.3.2.2 Reação imunoistoquímica

Para a análise de contagem das células que expressam BMP2/4, RUNX2, OCN e TRAP nos tecidos peri-implantares, as secções histológicas coletadas em lâminas de vidro silanizadas para microscopia foram submetidas à reação imunoistoquímica pela técnica da imunoperoxidase indireta. Para isso, tais secções histológicas foram submetidas à desparafinização inicial em estufa de cultura bacteriológica com temperatura controlada (56°C a 58°C), durante aproximadamente 30 minutos, seguida pela desparafinização completa em sequência de xilol (xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 10 minutos) e hidratação pelo etanol em série decrescente (100°GL-I, 2 minutos; 100°GL-II, 2 minutos; 100°GL-III, 2 minutos; 95°GL, 2 minutos; 70°GL, 2 minutos). A partir desta e previamente às próximas etapas da reação imunoistoquímica, os cortes histológicos foram lavados em PBS durante 5 minutos, PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich Co.) durante 5 minutos, e em PBS, novamente, durante mais 5 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 10mM e pH 6,0 (*Antigen Retrieval Buffer 1*, Spring Bioscience Corporation, Pleasanton/CA, EUA), colocadas em câmara pressurizada (Decloaking Chamber®, Biocare Medical LLC., Concord/CA, EUA), alcançando a temperatura máxima de 95°C durante 5 minutos, seguida pelo resfriamento gradual até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução constituída de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS durante 60 minutos, e em solução constituída de 4% de leite em pó desnatado em PBS durante 60 minutos, para o bloqueio da peroxidase e da biotina endógenas, respectivamente. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado em solução constituída de 1,5% de soro albumina bovino (BSA, *Bovine serum albumine*) em PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 durante 12 horas.

As lâminas contendo as amostras de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, sendo que cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-BMP2/4 do rato produzido em coelho (SC-9003; Santa Cruz Biotchnology Inc., Santa Cruz/CA, EUA); anti-RUNX2 do rato produzido em coelho (SC-10758; Santa Cruz Biotchnology Inc.); anti-OCN do rato produzido em cabra (SC-18319; Santa Cruz Biotchnology Inc.) e; anti-TRAP do rato produzido em cabra (SC-30833; Santa Cruz Biotchnology Inc.). Todos os anticorpos primários acima listados foram preparados na concentração de 1:100, em diluente específico (S3022; *Antibody Diluent with Background Reducing Components*, Dako North America Inc., Carpinteria/CA, EUA). Em seguida, as secções histológicas destinadas à detecção de BMP2/4 e RUNX2 foram primeiramente incubadas durante 90 minutos em solução contendo anticorpo secundário biotilado anti-coelho produzido em cabra (K0675; *Biotinylated Link*, Dako North America Inc.) e, posteriormente, tratadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase (K0675; *Streptavidin-HRP*, Dako North America Inc.), também durante 90 minutos. As secções histológicas destinadas à detecção de OCN e TRAP, por sua vez, foram primeiramente incubadas durante 90 minutos em solução contendo anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em coelho (ZB0923; *Biotinylated anti-goat IgG (H+L)*, Vector Laboratories Inc., Burlingame/CA, EUA) e, posteriormente, tratadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase (ZC0422; *R.T.U. Streptavidin/Peroxidase Complex*, Vector Laboratories Inc.), também durante 90 minutos. Todas as soluções contendo os anticorpos secundários biotilados acima listados foram preparadas na concentração de 1:200, no mesmo diluente específico utilizado para a preparação dos anticorpos primários.

A revelação foi realizada utilizando-se como cromógeno o composto 3,3'-diaminobenzidina (K3468; *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*, Dako North America Inc.), durante 80 segundos (para BMP2/4), 90 segundos (para RUNX2), 35 segundos (para OCN) ou 40 segundos (para TRAP). Para a contracoloração, os espécimes foram então lavados em água, imersos em hematoxilina de Harris por 10 segundos (para BMP2/4, OCN e TRAP) ou em *fast-green* por 30 minutos (para RUNX2), lavados em água para retirada do excesso de corante, desidratados pelo etanol em série crescente (70°GL, 2 minutos; 95°GL, 2 minutos; 100°GL-I, 2 minutos; 100°GL-II, 2 minutos; 100°GL-III, 2 minutos), diafanizados em sequência de xilol (etanol 100°GL 50%/xilol 50%, 2 minutos; xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 10 minutos), recobertos pelo meio de montagem (Permount®, Fisher Scientific Company LLC.) e protegidos com lamínulas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais). Como controle negativo da reação, as secções histológicas foram submetidas às mesmas etapas descritas, suprimindo-se apenas a utilização dos respectivos anticorpos primários. Todas as etapas da reação imunohistoquímica basearam-se no protocolo descrito por Ervolino et al. (2019) e Garcia et al. (2014).

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

3.4.1 Análise da condição geral de saúde dos animais e exame clínico das tíbias e da região peri-implantar

A condição geral de saúde dos animais foi cuidadosamente verificada durante todo o período experimental e as intercorrências foram devidamente registradas e analisadas. Efetuou-se o monitoramento do peso corporal dos animais a cada 28 dias e os resultados foram expressos em gramas (g), sob a forma de média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

Durante o procedimento cirúrgico para instalação dos implantes de titânio foi realizado um minucioso exame clínico de inspeção visual das tíbias direita e esquerda dos animais, previamente e posteriormente à incisão, com o intuito de possibilitar a verificação do território no qual seriam instalados os implantes, as características macroscópicas destes ossos, bem como a presença de lesões pré-existentes. Durante a fresagem e instalação dos implantes, a resistência do tecido ósseo frente à perfuração e a qualidade do travamento da estrutura de titânio também foram observados e registrados. Após a eutanásia, foi novamente

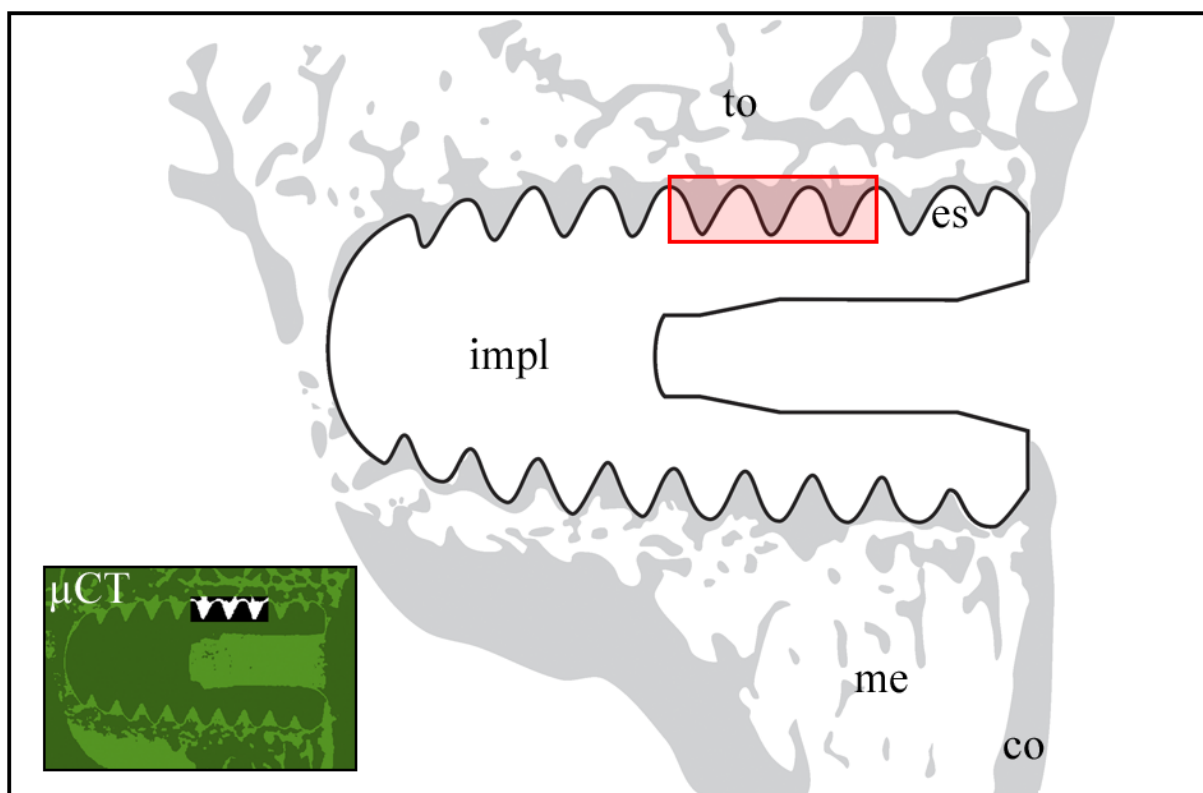
realizado um acurado exame clínico de inspeção visual da região peri-implantar nas tíbias direita e esquerda e os aspectos verificados foram descritos.

3.4.2 Análises microtomográficas

Depois de reconstruídas e devidamente reposicionadas e orientadas, as imagens foram analisadas através do *software* CTAn® (versão 1.15.4.0+ (64-bit); SkyScan®). Para isso, primeiramente foi selecionado o *slice* correspondente ao centro do implante escaneado e, subsequentemente, uma região de 50 *slices* anteriores e 50 *slices* posteriores ao corte tomográfico central foi mantida para análise, totalizando 100 *slices*. Foi desenhada a região de interesse (ROI, *Region of interest*) para as análises microtomográficas, com perfil retangular de 1,2mm por 0,4mm, posicionada a partir da região central da segunda espira do implante completamente visualizada até alcançar a região central da quinta espira, na porção superior, contadas a partir da plataforma da estrutura de titânio (FIGURA 5).

As imagens foram então convertidas em escala de cinza, com valor mínimo e valor máximo de 25 e 100, respectivamente, para todos os grupos experimentais. Tais valores foram definidos baseados na visualização das trabéculas do tecido ósseo esponjoso localizado na ROI para as análises microtomográficas, desde que o titânio não pudesse ser visualizado. Todos os procedimentos adotados para as análises microtomográficas, incluindo a padronização da ROI, foram baseados no protocolo descrito por Faverani et al. (2018) e Yogui et al. (2018).

A análise tridimensional foi realizada observando-se os seguintes parâmetros: porcentagem de volume ósseo (BV/TV, *Bone volume/tissue volume*; %); espessura de trabéculas ósseas (Tb.Th, *Trabecular thickness*; mm); número de trabéculas ósseas (Tb.N, *Trabecular number*; 1/mm); separação de trabéculas ósseas (Tb.Sp, *Trabecular separation*; mm); e porosidade total (Po(tot), *Total porosity*; %).

FIGURA 5 - Esquema representativo da ROI para as análises microtomográficas.

Abreviações e símbolos: μCT , microtomografia computadorizada (visualização pelo *software* CTAn®); *co*, região cortical da tibia; *es*, espira do implante; *impl*, implante de titânio; *me*, região medular da tibia; *retângulo vermelho*, demarcação da ROI para as análises microtomográficas; *to*, trabéculas ósseas. FONTE: O Autor (2019).

3.4.3 Análises microscópicas

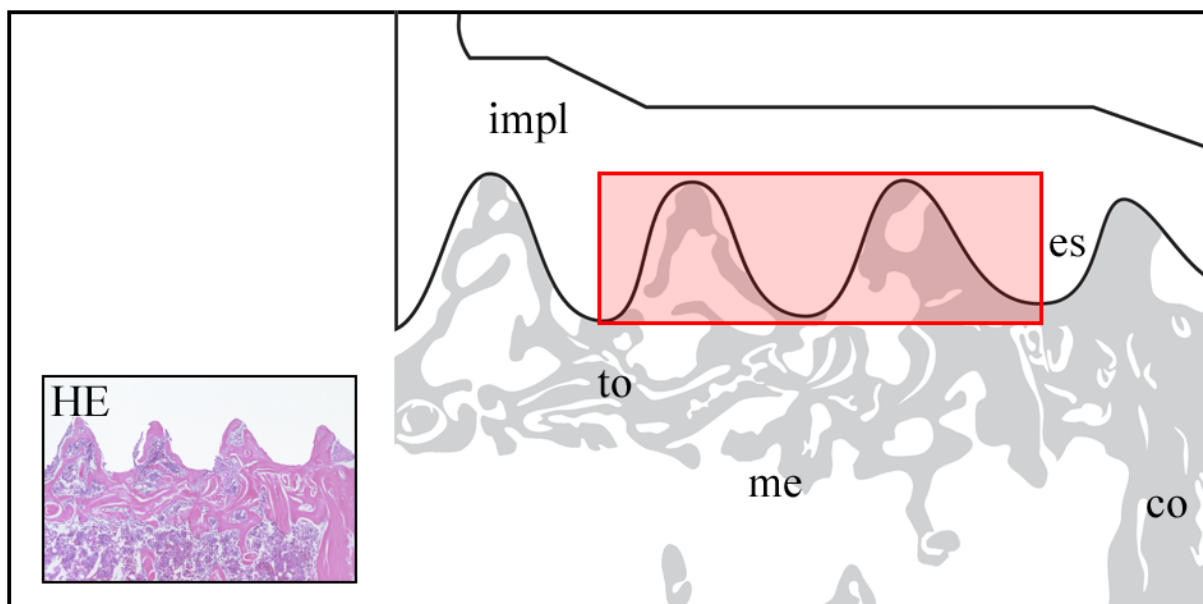
As análises microscópicas foram realizadas por um examinador calibrado e blindado aos grupos experimentais (L.F.T.) e, posteriormente, validadas por um histologista certificado (E.E.), também blindado aos grupos experimentais. Tais análises foram realizadas utilizando-se um sistema composto por um microscópio de luz (Axio Scope®, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen/NI, ALE) com câmera digital acoplada (AxioCam® MRc5, Carl Zeiss Microscopy GmbH), conectados ao microcomputador. As fotomicrografias das devidas lâminas histológicas foram capturadas segundo a ROI para as análises microscópicas, com o auxílio do *software* ZEN 2 (*Blue edition*; versão 6.1.7601; Carl Zeiss Microscopy GmbH).

A ROI para as análises microscópicas consistiu na região compreendida pelos dois primeiros espaços entre as espiras do implante que estejam situados no tecido ósseo esponjoso da tibia, contados a partir da plataforma da estrutura de titânio (FIGURA 6). Esta área foi definida com base em estudos experimentais prévios (FAVERANI et al., 2018; MATHEUS et

al., 2018; NOCITI JÚNIOR et al., 2002; PALIN et al., 2018; SIROLI et al., 2016). Matheus et al. (2018) utilizaram esta mesma ROI em tecido ósseo esponjoso, porém, acrescida de um espaço entre espiras situado em tecido ósseo compacto, ou seja, da cortical óssea tibial. Entretanto, no presente estudo optou-se pela não avaliação da área referente ao tecido ósseo compacto da região cortical da tíbia devido ao fato deste tratar-se de um tecido pré-existente, submetido às injúrias provenientes da fresagem e instalação do implante de titânio, sob a ação do medicamento antirreabsortivo e, portanto, com a atividade de remodelação óssea severamente prejudicada. Assim, os resultados encontrados nesta área poderiam ser supervalorizados e induzir ao pensamento equivocado de que as alterações verificadas no tecido ósseo esponjoso seriam desprezíveis, quando, na verdade, este último deve ser o nosso principal alvo de atenção, por tratar-se de um tecido que se formou após a instalação da estrutura de titânio. Em virtude disso, mínimos eventos que tenham ocorrido em um tecido recém-formado podem apresentar maior significado clínico do que grandes eventos observados em tecidos mais antigos, nos quais tais ocorrências já são normalmente esperadas.

Vale ressaltar que para a análise histopatológica descritiva, além dos tecidos compreendidos na ROI previamente descrita, foram também observadas as características microscópicas dos demais tecidos adjacentes.

FIGURA 6 - Esquema representativo da ROI para as análises microscópicas.



Abreviações e símbolos: *co*, região cortical da tíbia; *es*, espira do implante; *HE*, fotomicrografia de lâmina histológica corada pela hematoxilina-eosina; *impl*, implante de titânio; *me*, região medular da tíbia; *retângulo vermelho*, demarcação da ROI para as análises microscópicas; *to*, trabéculas ósseas. FONTE: O Autor (2019).

3.4.3.1 *Análise histopatológica*

Para a análise histopatológica, as fotomicrografias previamente adquiridas das lâminas histológicas submetidas à coloração pela HE foram analisadas seguindo os parâmetros abaixo descritos:

a. padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo, levando-se em consideração: regularidade das trabéculas ósseas; existência de lacunas preenchidas por osteócitos, lacunas contendo remanescentes celulares ou mesmo desprovidas de tais células; presença ou ausência de sequestros ósseos.

b. padrão de celularidade e estruturação do tecido conjuntivo, levando-se em consideração: presença ou ausência de fibroblastos; quantidade relativa de fibroblastos; características da matriz extracelular, incluindo existência, organização e quantidade relativa de fibras colágenas; presença ou ausência de vasos sanguíneos; presença ou ausência de células inflamatórias.

c. natureza e intensidade do processo inflamatório local, levando-se em consideração: presença ou ausência de células inflamatórias; quantidade relativa de células inflamatórias; natureza das células inflamatórias existentes.

Todos os parâmetros avaliados e os seus respectivos subitens foram baseados naqueles utilizados por Ervolino et al. (2019), Matheus et al. (2018), Statkiewicz et al. (2018) e Toro et al. (2019) em suas análises histopatológicas.

3.4.3.2 *Análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar*

As fotomicrografias previamente adquiridas das lâminas histológicas submetidas à coloração pela HE foram analisadas através do *software* ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health, Bethesda/MD, EUA). Para a análise histométrica da PTO-T, com o auxílio da ferramenta *Polygon selections*, foi mensurada primeiramente toda a área da ROI, correspondente, portanto, a 100% da área a ser analisada. Na sequência, utilizando-se a mesma ferramenta, foi mensurada apenas a área correspondente ao tecido ósseo compreendido dentro da ROI, à qual foi atribuída a devida taxa percentual.

Para a análise histométrica da PTO-NV, admitiu-se primeiramente a área de tecido ósseo total anteriormente mensurada como 100% da área a ser analisada e, em seguida,

também com o auxílio da ferramenta *Polygon selections*, dentro desta mesma região foi mensurada apenas a área correspondente ao tecido ósseo não vital, ou seja, aquela em que as lacunas encontravam-se desprovidas de osteócitos ou com remanescentes de tais células, à qual foi atribuída a devida taxa percentual. Os resultados de ambas as análises foram expressos em porcentagem (%), sob a forma de média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

3.4.3.3 Análise histométrica do contato osso/implante (COI)

As fotomicrografias previamente adquiridas das lâminas histológicas preparadas por desgaste foram analisadas através do *software* ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health). Para a análise histométrica do COI, com o auxílio da ferramenta *Segmented Line*, primeiramente foi realizada uma medida linear do perímetro das duas espiras do implante contidas na ROI analisada, correspondente, portanto, à taxa de 100%. Em seguida, também com o auxílio da ferramenta *Segmented Line*, foram realizadas medidas lineares apenas da região de tecido ósseo que se apresentava em íntimo contato com a superfície de tais espiras, à qual foi atribuída a devida taxa percentual. Os resultados foram expressos em %, sob a forma de média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

3.4.3.4 Análise imunoistoquímica

As fotomicrografias previamente adquiridas das lâminas histológicas submetidas à reação imunoistoquímica foram analisadas através do *software* ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health). As células imunorreativas para BMP2/4 e OCN, chamadas BMP2/4-positivas e OCN-positivas, respectivamente, foram consideradas como aquelas que se apresentavam com uma coloração marrom-escura confinada ao seu citoplasma. As células imunorreativas para RUNX2, chamadas RUNX2-positivas, foram consideradas como aquelas que se apresentavam com uma coloração marrom-escura confinada ao seu núcleo. Por fim, as células imunorreativas para TRAP, chamadas TRAP-positivas, foram consideradas como aquelas que se apresentavam multinucleadas e com uma coloração marrom-escura confinada ao seu citoplasma.

Com o auxílio da ferramenta *Polygon selections*, primeiramente foi mensurada a área total da ROI para cada uma das análises. Em seguida, as células BMP2/4-positivas, RUNX2-positivas, OCN-positivas ou TRAP-positivas foram quantificadas nesta região e os resultados

foram expressos em células por mm^2 ($\text{cél}/\text{mm}^2$), sob a forma de média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

3.4.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do *software* BioEstat 5.3® (Instituto de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Tefé/AM, BRA). Para a verificação da normalidade de distribuição das amostras, os dados foram submetidos ao teste estatístico de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi aplicado o teste estatístico paramétrico T-Student ou o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes, com o intuito de se verificar a possível existência de diferença significativa entre os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica), entre os grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica) e, por fim, entre os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica) nas diferentes avaliações. Para as análises dos dados provenientes de um mesmo grupo, porém em períodos diferentes, utilizou-se o teste estatístico paramétrico T-Student para amostras relacionadas. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS



4 RESULTADOS

4.1 CONDIÇÃO GERAL DE SAÚDE DOS ANIMAIS E EXAME CLÍNICO DAS TÍBIAS E DA REGIÃO PERI-IMPLANTAR

Do total de animais que faziam parte do presente estudo em sua fase inicial (n=40), 36 foram efetivamente incluídos neste trabalho e possibilitaram a coleta de dados para serem analisados. Um animal morreu ao longo do período experimental, imediatamente após os procedimentos cirúrgicos para a instalação do implante de titânio nas tíbias. Outras amostras, por sua vez, foram descartadas devido a fraturas ósseas ou à perda do implante que havia sido instalado. Porém, quando a tíbia contralateral apresentava-se em condições adequadas para a devida avaliação, esta foi utilizada normalmente. Desta forma, as ratas que foram incluídas neste estudo apresentaram boas condições gerais de saúde, as quais se mantiveram constantes durante todo o período experimental. Tais animais toleraram muito bem os protocolos medicamentosos empregados, tanto o oncológico quanto o osteoporótico, bem como os procedimentos de anestesia geral e instalação dos implantes de titânio em ambas as tíbias.

Ao exame clínico pré-operatório de inspeção visual das tíbias não foram constatadas lesões pré-existentes ou alterações significativas na região em que seriam instalados os implantes. Entretanto, um achado clínico que merece especial atenção é o fato de que as tíbias dos animais pertencentes aos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST apresentaram maior resistência à fresagem e friabilidade aumentada quando comparadas aos demais grupos, fatores que levaram à ocorrência de fraturas ósseas e a um travamento de menor intensidade em alguns espécimes durante o momento de instalação do implante de titânio.

Ao exame clínico de inspeção visual das tíbias e da região peri-implantar no momento da coleta das amostras após a eutanásia não foram constatadas alterações significativas. Os implantes apresentavam-se clinicamente osseointegrados, com suas plataformas ao nível do tecido ósseo, e a ferida cirúrgica mostrava-se completamente reparada.

4.1.1 Peso corporal dos animais

Experimento I - dosagem oncológica: Os animais do grupo ZOL-ONC apresentaram maior peso corporal no início, na oitava e na décima sexta semana do período experimental em relação aos animais do grupo VEI-ONC, entretanto, nas semanas subsequentes tais diferenças já não eram observadas. Ao final do experimento, o peso corporal dos animais dos

grupos VEI-ONC e ZOL-ONC mostrou-se maior do que o peso corporal destes mesmos animais no início do período experimental. Não houve diferença entre VEI-ONC e ZOL-ONC ao término do período experimental, bem como entre as médias finais dos pesos de ambos os grupos (FIGURA 7A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: Não houve diferença no peso corporal dos animais entre os grupos VEI-OST e ZOL-OST ao longo do período experimental, bem como entre as médias finais dos pesos de ambos os grupos. Ao final do experimento, o peso corporal dos animais dos grupos VEI-OST e ZOL-OST mostrou-se maior do que o peso corporal destes mesmos animais no início do período experimental (FIGURA 7B).

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: A partir da oitava semana do experimento até o seu término, os animais do grupo ZOL-OST apresentaram maior peso corporal em relação aos animais do grupo ZOL-ONC. A média final dos pesos dos animais do grupo ZOL-OST também se mostrou maior em relação à do grupo ZOL-ONC (FIGURA 7C).

4.2 ANÁLISES MICROTOMOGRÁFICAS

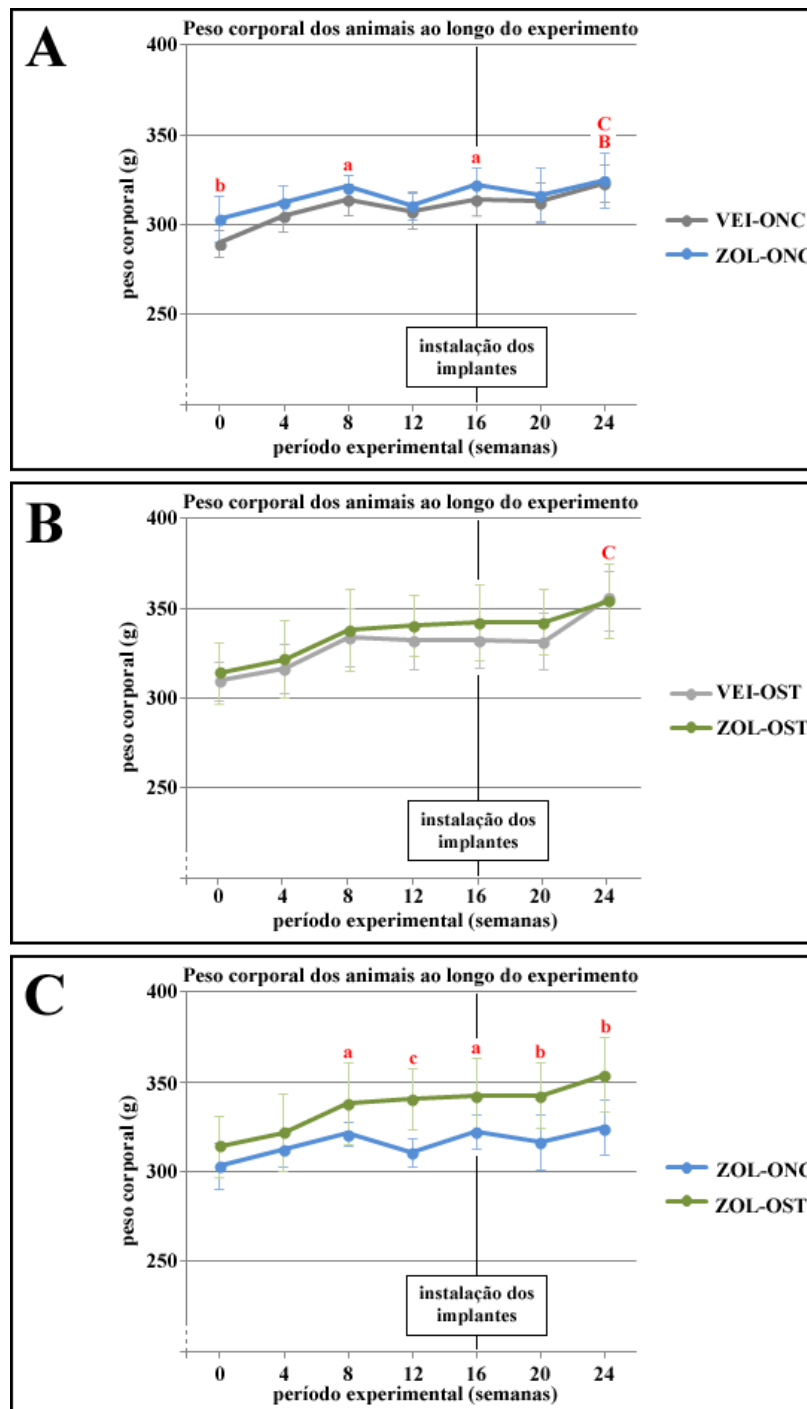
Experimento I - dosagem oncológica: O grupo ZOL-ONC apresentou maior porcentagem de volume ósseo e menor porosidade total em relação ao grupo VEI-ONC. Não houve diferença entre os grupos para os demais parâmetros avaliados (espessura, número e separação de trabéculas ósseas) (FIGURA 8A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: O grupo ZOL-OST apresentou menor espessura de trabéculas ósseas, porém, maior número de trabéculas ósseas em relação ao grupo VEI-OST. Não houve diferença entre os grupos para os demais parâmetros avaliados (porcentagem de volume ósseo, separação de trabéculas ósseas e porosidade total) (FIGURA 8B).

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: O grupo ZOL-OST apresentou menor porcentagem de volume ósseo, menor espessura de trabéculas ósseas e maior porosidade total em relação ao grupo ZOL-ONC. Não houve diferença entre os grupos para os demais parâmetros avaliados (número e separação de trabéculas ósseas) (FIGURA 8C).

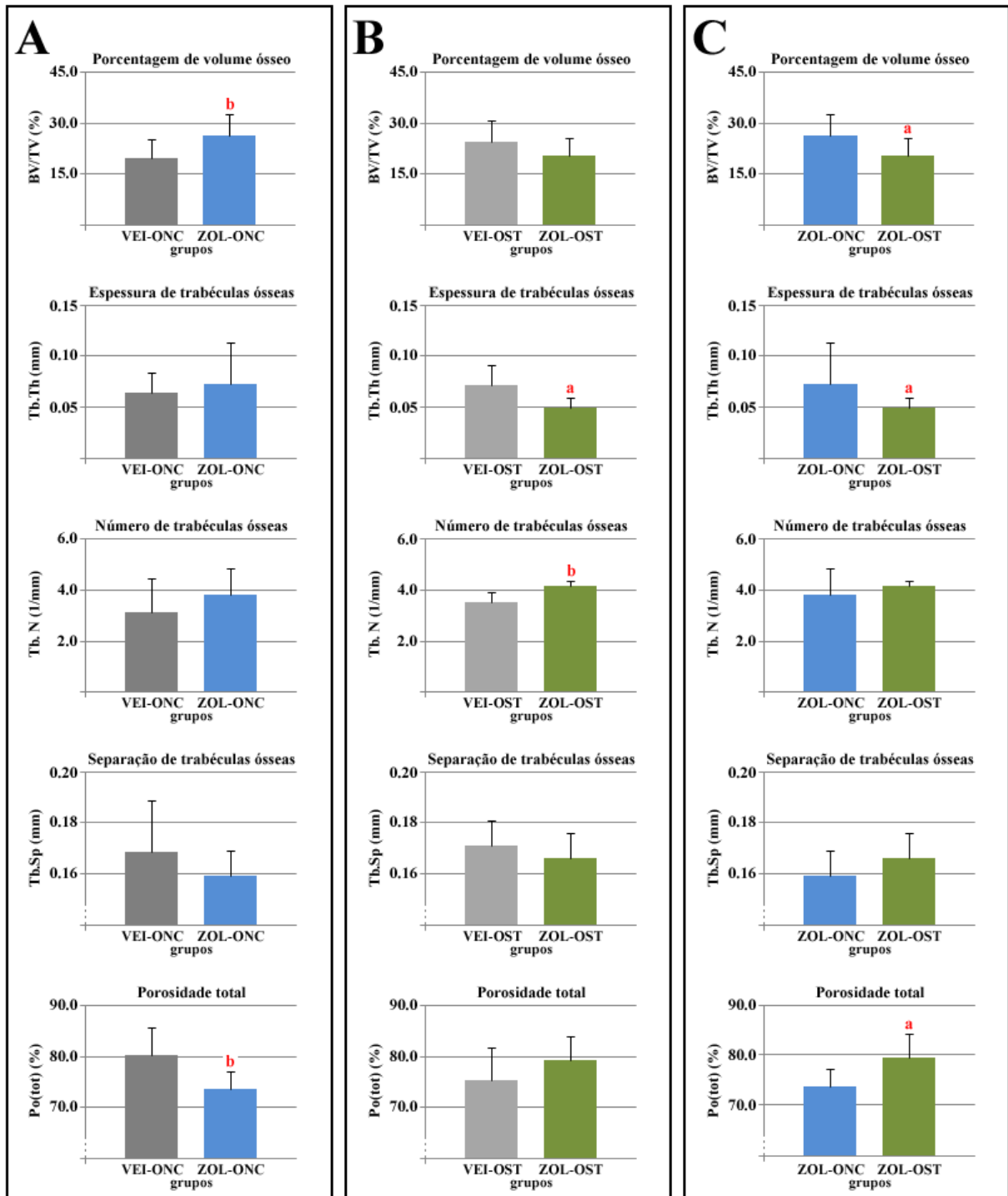
A FIGURA 9 apresenta o aspecto microtomográfico da região óssea tibial em que foi instalado o implante de titânio. Em ZOL-ONC destacam-se: maior densidade óssea e menor porosidade neste tecido, bem como maior quantidade de tecido ósseo peri-implantar ao redor das espiras do implante em comparação aos demais grupos.

FIGURA 7 - Peso corporal dos animais dos diferentes grupos ao longo de todo o período experimental.



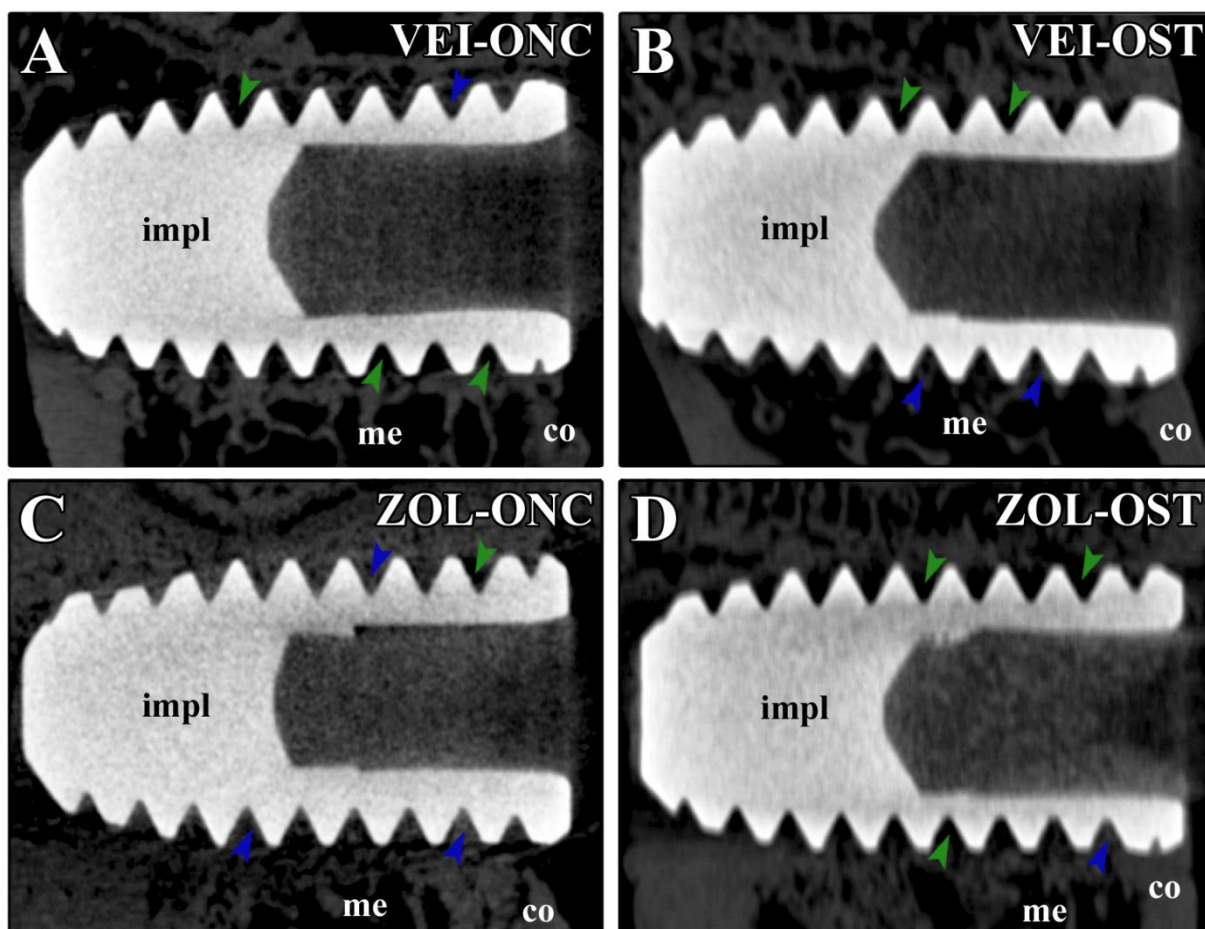
Descrição: (A) Gráfico apresentando o peso corporal dos animais dos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (B) Gráfico apresentando o peso corporal dos animais dos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); (C) Gráfico apresentando o peso corporal dos animais dos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica). Abreviação e símbolos: *a*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos na mesma semana do experimento; *b*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos na mesma semana do experimento; *B*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre ZOL-ONC no início e ZOL-ONC ao final do experimento; *c*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os grupos na mesma semana do experimento; *C*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre VEI-ONC no início e VEI-ONC ao final do experimento (A), diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre VEI-OST no início e VEI-OST ao final do experimento (B) e diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre ZOL-OST no início e ZOL-OST ao final do experimento (B); g, gramas. FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 8 - Resultados das análises microtomográficas para os diferentes parâmetros avaliados nos grupos experimentais.



Descrição: (A) Gráficos apresentando os resultados obtidos para os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (B) Gráficos apresentando os resultados obtidos para os grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); (C) Gráficos apresentando os resultados obtidos para os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica). Abreviações e símbolos: %, porcentagem; a, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos; b, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos; BV/TV, bone volume/tissue volume, porcentagem de volume ósseo; mm, milímetros; Po(tot), total porosity, porosidade total; Tb.N, trabecular number, número de trabéculas ósseas; Tb.Sp, trabecular separation, separação de trabéculas ósseas; Tb.Th, trabecular thickness, espessura de trabéculas ósseas. FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 9 - Aspecto microtomográfico da metáfise proximal da tíbia esquerda na região em que foi instalado o implante de titânio.



Descrição: (A, C) Espécimes representativos dos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (B, D) Espécimes representativos dos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica). Abreviações e símbolos: *co*, região cortical da tíbia; *impl*, implante de titânio; *me*, região medular da tíbia; *setas azuis*, áreas microtomográficas hiperdensas condizentes com um maior volume de tecido ósseo peri-implantar; *setas verdes*, áreas microtomográficas hipodensas condizentes com a ausência e/ou menor volume de tecido ósseo peri-implantar. *Slice* tomográfica longitudinal em relação ao longo eixo do implante; visualização no plano de corte sagital (eixos Z-Y). FONTE: O Autor (2019).

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

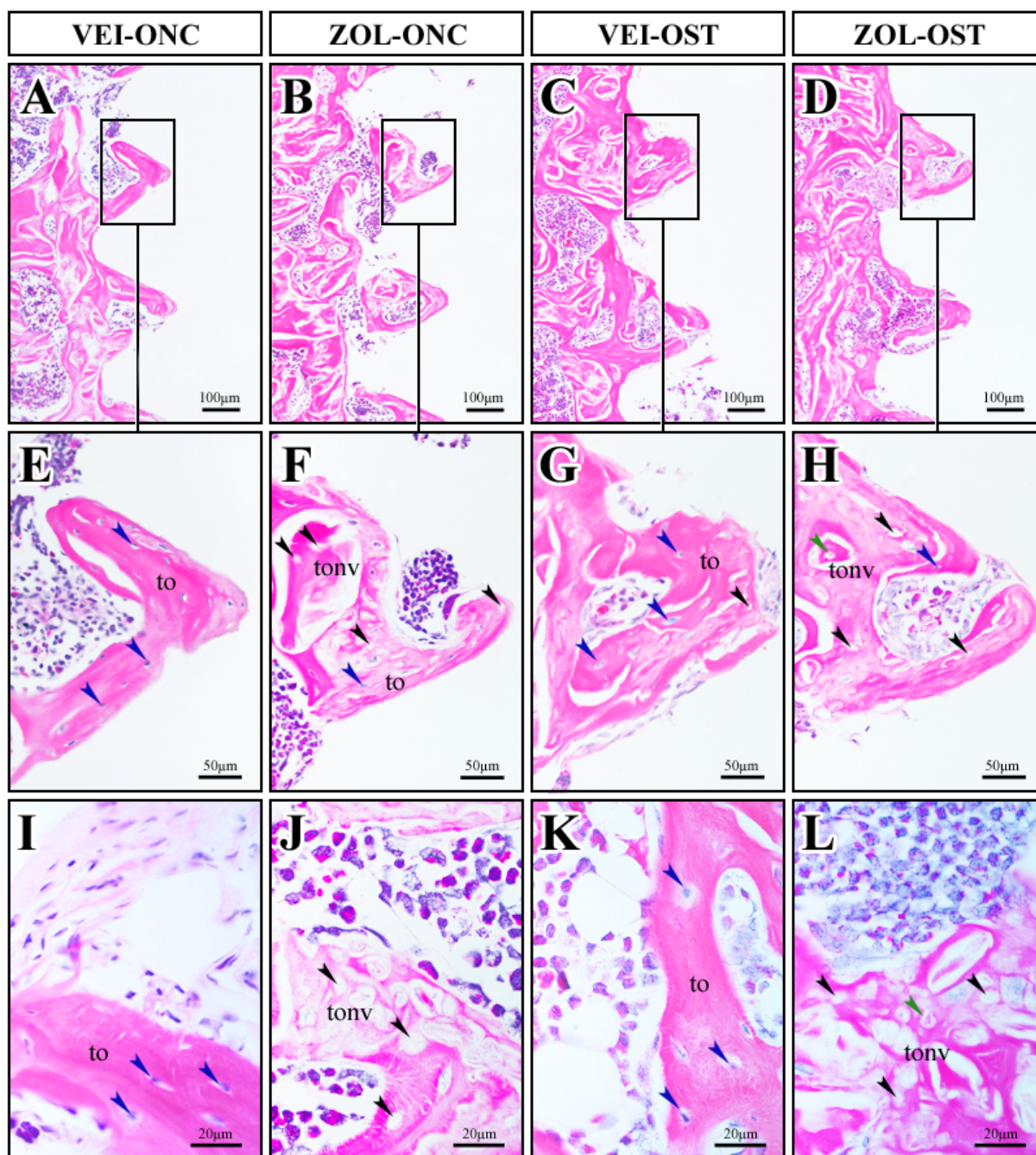
Experimento I - dosagem oncológica: Na maioria dos espécimes do grupo ZOL-ONC foram observadas extensas áreas de tecido ósseo peri-implantar não vital, caracterizado por lacunas desprovidas de osteócitos e/ou lacunas preenchidas por remanescentes de tais células. Ademais, tais características também foram observadas no tecido ósseo da região cortical e das trabéculas mais profundamente situadas na região medular da tíbia (FIGURA 10B, 10F, 10J). O tecido conjuntivo peri-implantar nos espécimes do grupo ZOL-ONC apresentou de pequena a moderada quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, pequena quantidade de vasos sanguíneos, e infiltrado inflamatório local de moderado a intenso,

constituído principalmente por linfócitos, eosinófilos e, em alguns casos, neutrófilos. Alguns espécimes deste grupo ainda apresentaram tecido conjuntivo desestruturado, com poucos fibroblastos e componentes da matriz extracelular severamente desorganizados. Em VEI-ONC, quase a totalidade dos espécimes apresentou tecido ósseo peri-implantar vital e com trabéculas ósseas regulares, enquanto que o tecido conjuntivo adjacente exibiu características histológicas semelhantes às encontradas em ZOL-ONC, porém, raras eram as células inflamatórias (FIGURA 10A, 10E, 10I).

Experimento II - dosagem osteoporótica: No tecido ósseo peri-implantar, assim como no tecido ósseo das regiões cortical e medular da tíbia dos espécimes do grupo ZOL-OST, foram observadas extensas áreas de tecido ósseo não vital (FIGURA 10D, 10H, 10L). Neste grupo, o tecido conjuntivo peri-implantar apresentou de pequena a moderada quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, pequena quantidade de vasos sanguíneos, e infiltrado inflamatório local com oscilação de pequena a grande quantidade de células inflamatórias, sendo estas linfócitos, eosinófilos e, em alguns casos, neutrófilos. VEI-OST apresentou tecido ósseo peri-implantar quase que completamente constituído por tecido ósseo vital e com trabéculas ósseas regulares (FIGURA 10C, 10G, 10K). O tecido conjuntivo peri-implantar deste grupo também exibiu características semelhantes às encontradas em ZOL-OST no que diz respeito tanto à quantidade de fibroblastos e células inflamatórias, quanto à quantidade e estruturação dos componentes da sua matriz extracelular.

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: Ambos os grupos apresentaram extensas áreas de tecido ósseo peri-implantar constituídas por tecido ósseo não vital, à semelhança de algumas áreas da região cortical e das trabéculas mais profundamente situadas na região medular tibial (FIGURA 10B, 10D, 10F, 10H, 10J, 10L). Em relação ao tecido conjuntivo peri-implantar, ZOL-ONC apresentou desestruturação tecidual severa em alguns espécimes e processo inflamatório local que variou de moderado a intenso, enquanto que ZOL-OST não apresentou desorganização tecidual desta magnitude e a intensidade do processo inflamatório local oscilou de baixa a intensa.

FIGURA 10 - Aspecto histopatológico dos tecidos peri-implantares nos diferentes grupos experimentais.



Descrição: (A, E, I) Fotomicrografias evidenciando as regiões de tecido ósseo e tecido conjuntivo peri-implantares no grupo VEI-ONC; (B, F, J) Fotomicrografias evidenciando as regiões de tecido ósseo e tecido conjuntivo peri-implantares no grupo ZOL-ONC; (A, B, E, F, I, J) Fotomicrografias representativas do aspecto histopatológico dos tecidos peri-implantares nos grupos do Experimento I - dosagem oncológica; (C, G, K) Fotomicrografias evidenciando as regiões de tecido ósseo e tecido conjuntivo peri-implantares no grupo VEI-OST; (D, H, L) Fotomicrografias evidenciando as regiões de tecido ósseo e tecido conjuntivo peri-implantares no grupo ZOL-OST; (C, D, G, H, K, L) Fotomicrografias representativas do aspecto histopatológico dos tecidos peri-implantares nos grupos do Experimento II - dosagem osteoporótica. Abreviações e símbolos: *setas azuis*, exemplos de osteócitos; *setas pretas*, exemplos de lacunas desprovidas de osteócitos; *setas verdes*, exemplos de lacunas contendo remanescentes de osteócitos; *to*, tecido ósseo; *tonv*, tecido ósseo não vital. Coloração: HE. Aumentos originais: 100x (A, B, C, D); 400x (E, F, G, H); 1000x (I, J, K, L). Barras de escala: 100µm (A, B, C, D); 50µm (E, F, G, H); 20µm (I, J, K, L). FONTE: O Autor (2019).

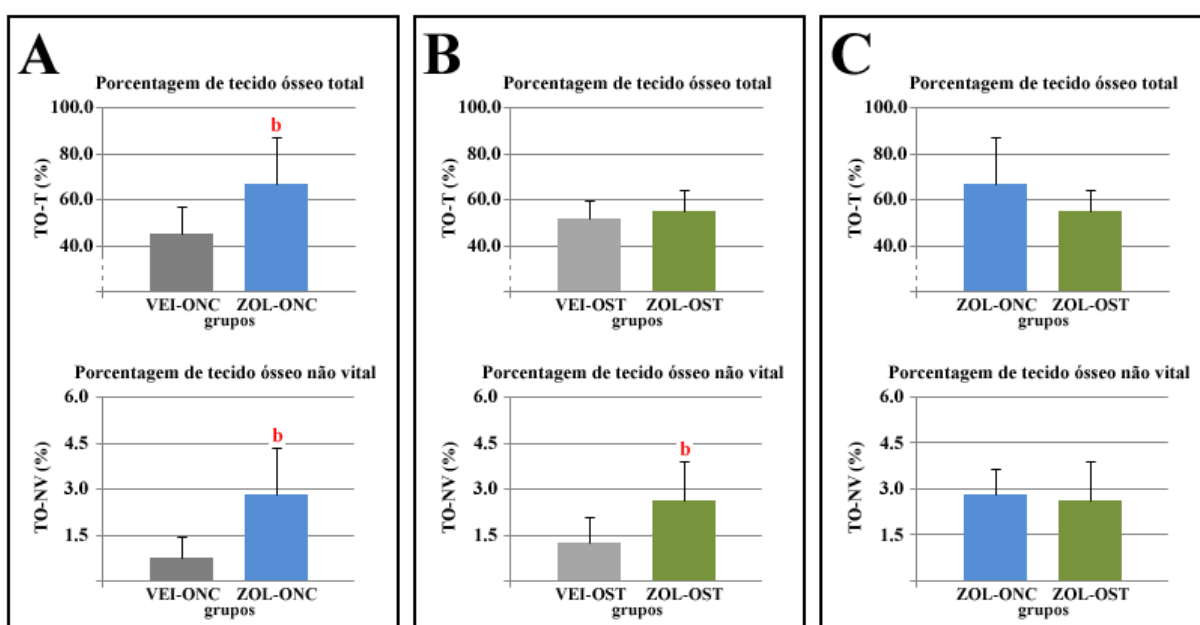
4.4 PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO TOTAL (PTO-T) E PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO NÃO VITAL (PTO-NV) NA REGIÃO PERI-IMPLANTAR

Experimento I - dosagem oncológica: O grupo ZOL-ONC apresentou maior PTO-T e maior PTO-NV em relação ao grupo VEI-ONC (FIGURA 11A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: Não houve diferença entre os grupos VEI-OST e ZOL-OST para a PTO-T, entretanto, o grupo ZOL-OST apresentou maior PTO-NV em relação ao grupo VEI-OST (FIGURA 11B).

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: Não houve diferença entre os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST, tanto para a PTO-T, quanto para a PTO-NV (FIGURA 11C).

FIGURA 11 - Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.



Descrição: (A) Gráficos apresentando a PTO-T e a PTO-NV para os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (B) Gráficos apresentando a PTO-T e PTO-NV para os grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); (C) Gráficos apresentando a PTO-T e a PTO-NV para os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica). Abreviações e símbolos: %, porcentagem; *b*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos; *TO-T*, tecido ósseo total; *TO-NV*, tecido ósseo não vital. FONTE: O Autor (2019).

4.5 CONTATO OSSO/IMPLANTE (COI)

O COI foi caracterizado como as regiões em que o tecido ósseo peri-implantar encontrava-se diretamente relacionado às espiras do implante de titânio, sem a existência de espaço entre ambos. Em contrapartida, a ausência de contato entre as espiras do implante e o

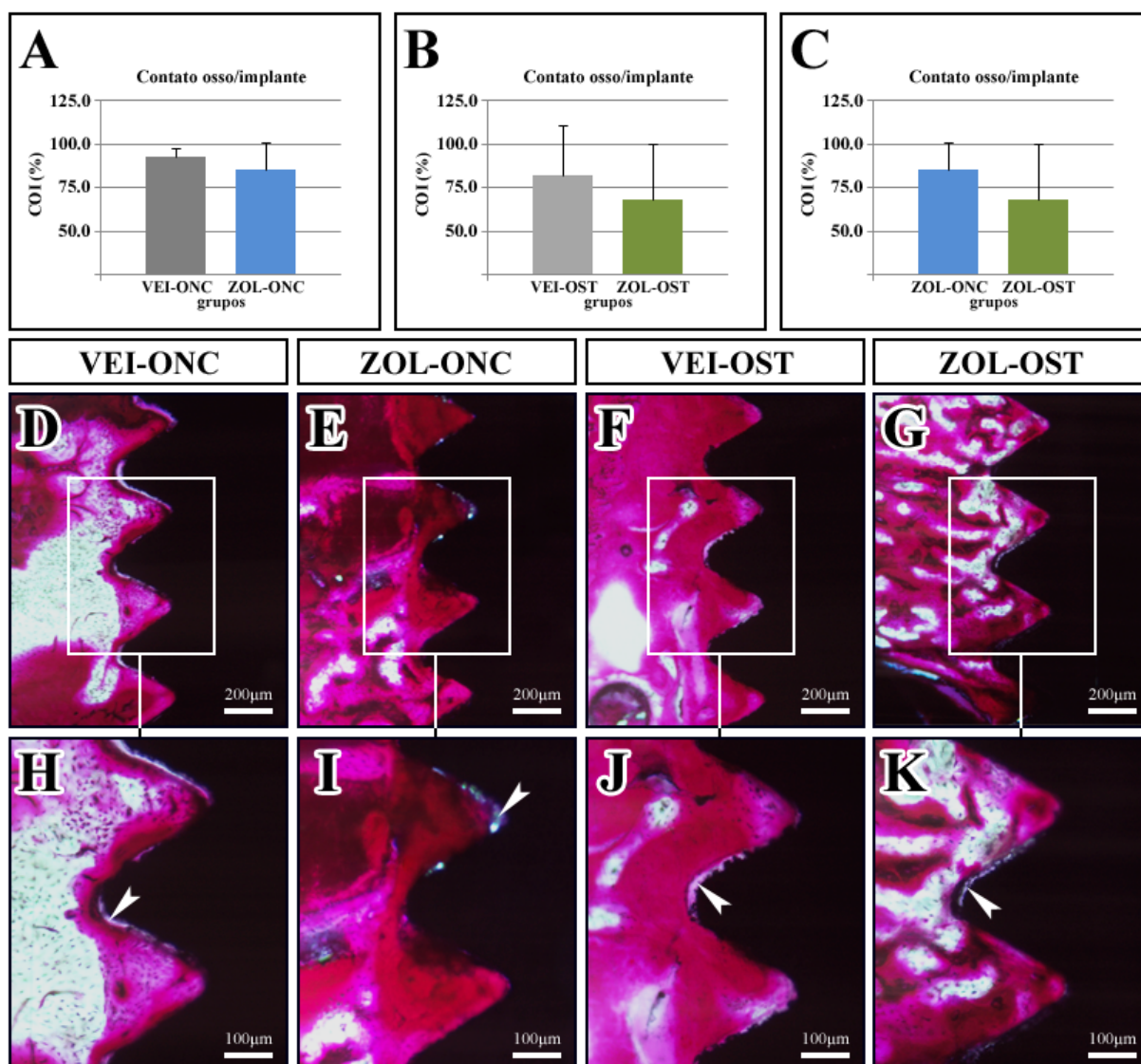
tecido ósseo adjacente apresentou-se como áreas translúcidas entre tais estruturas, as quais não excederam, em média, 35% do perímetro analisado (FIGURA 12D, 12E, 12F, 12G, 12H, 12I, 12J, 12K).

Experimento I - dosagem oncológica: Não houve diferença na porcentagem de COI entre os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (FIGURA 12A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: Não houve diferença na porcentagem de COI entre os grupos VEI-OST e ZOL-OST (FIGURA 12B).

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: Não houve diferença na porcentagem de COI entre os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (FIGURA 12C).

FIGURA 12 - Contato osso/implante (COI) nos diferentes grupos experimentais.



Descrição: (A) Gráficos apresentando o COI para os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (B) Gráficos apresentando o COI para os grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); (C) Gráficos apresentando o COI para os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica); (D, E, H, I) Fotomicrografias de lâminas histológicas preparadas por desgaste evidenciando a região de contato entre as espiras do implante de titânio e o tecido ósseo adjacente nos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (F, G, J, K) Fotomicrografias de lâminas histológicas preparadas por desgaste evidenciando a região de contato entre as espiras do implante de titânio e o tecido ósseo adjacente nos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica). Abreviação e símbolos: %, porcentagem; *COI*, contato osso/implante; *setas brancas*, ausência de contato entre as espiras do implante de titânio e o tecido ósseo adjacente. Coloração: fucsina básica (acrescida ao etanol durante o processo de desidratação das amostras). Aumentos originais: 50x (D, E, F, G); 100x (H, I, J, K). Barras de escala: 200µm (D, E, F, G); 100µm (H, I, J, K). FONTE: O Autor (2019).

4.6 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

4.6.1 Imunomarcção para BMP2/4 nos tecidos peri-implantares

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de BMP2/4 mostrou alta especificidade na identificação desta proteína, a qual foi devidamente comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. A imunomarcção para BMP2/4 estava presente em osteoblastos e em células do estroma próximas ao tecido ósseo peri-implantar (FIGURA 13D, 13E, 13F, 13G).

Experimento I - dosagem oncológica: Não houve diferença no número de células BMP2/4-positivas por mm² entre os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (FIGURA 13A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: Não houve diferença no número de células BMP2/4-positivas por mm² entre os grupos VEI-OST e ZOL-OST (FIGURA 13B).

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: Não houve diferença no número de células BMP2/4-positivas por mm² entre os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (FIGURA 13C).

4.6.2 Imunomarcção para RUNX2 nos tecidos peri-implantares

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de RUNX2 mostrou alta especificidade na identificação deste fator de transcrição, a qual foi devidamente comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. A imunomarcção para RUNX2 estava presente em células próximas ao tecido ósseo peri-implantar (FIGURA 14D, 14E, 14F, 14G).

Experimento I - dosagem oncológica: O grupo ZOL-ONC apresentou menor quantidade de células RUNX2-positivas por mm² em relação ao grupo VEI-ONC (FIGURA 14A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: O grupo ZOL-OST apresentou menor quantidade de células RUNX2-positivas por mm² em relação ao grupo VEI-OST (FIGURA 14B).

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: Não houve diferença no número de células RUNX2-positivas por mm² entre os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (FIGURA 14C).

4.6.3 Imunomarcção para OCN nos tecidos peri-implantares

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de OCN mostrou alta especificidade na identificação desta proteína, a qual foi devidamente comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. A imunomarcção para OCN estava presente em osteoblastos e, em menor intensidade, na matriz extracelular do tecido ósseo peri-implantar (FIGURA 15D, 15E, 15F, 15G).

Experimento I - dosagem oncológica: O grupo ZOL-ONC apresentou menor quantidade de células OCN-positivas por mm² em relação ao grupo VEI-ONC (FIGURA 15A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: O grupo ZOL-OST apresentou menor quantidade de células OCN-positivas por mm² em relação ao grupo VEI-OST (FIGURA 15B).

Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: Não houve diferença no número de células OCN-positivas por mm² entre os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (FIGURA 15C).

4.6.4 Imunomarcção para TRAP nos tecidos peri-implantares

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de TRAP mostrou alta especificidade na identificação desta proteína, a qual foi devidamente comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. A imunomarcção para TRAP estava presente em osteoclastos e, embora algumas células mononucleadas tenham sido imunomarcadas, foram consideradas na presente análise apenas as células multinucleadas com imunorreatividade, devido à maior efetividade reabsortiva destas últimas.

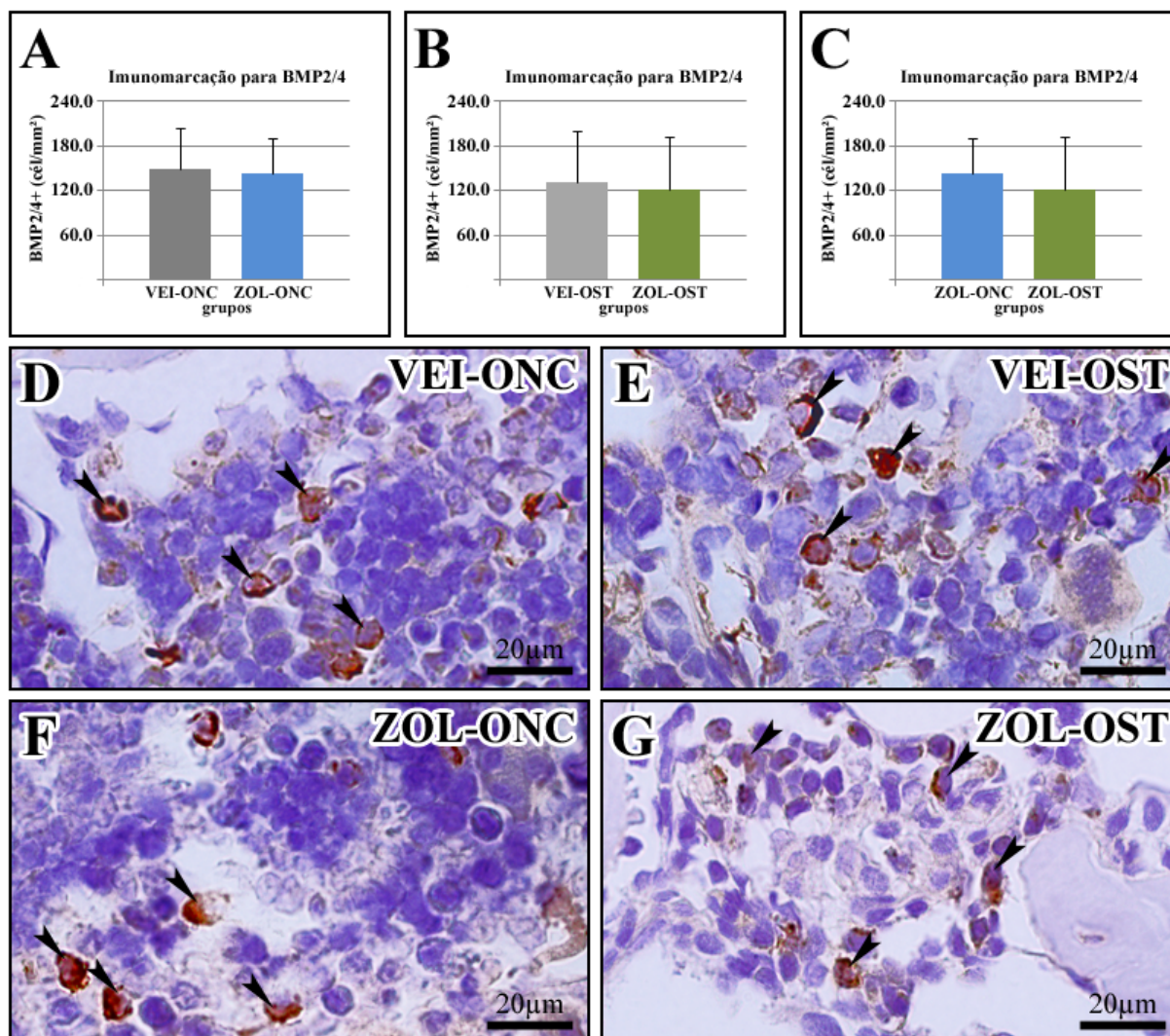
Nos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST, os osteoclastos TRAP-positivos apresentavam-se hipernucleados, arredondados e relativamente distantes da matriz óssea, isto é, desacoplados. Estas alterações são, de modo geral, características da inatividade destas células (FIGURA 16F, 16G). Nos grupos VEI-ONC e VEI-OST, os osteoclastos TRAP-positivos apresentavam-se, em sua maioria, acoplados ou próximos à matriz óssea, polarizados, com quantidade de núcleos e morfologia normais, ou seja, condizentes com um aspecto de atividade celular (FIGURA 16D, 16E).

Experimento I - dosagem oncológica: Não houve diferença no número de células TRAP-positivas por mm² entre os grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (FIGURA 16A).

Experimento II - dosagem osteoporótica: Não houve diferença no número de células TRAP-positivas por mm² entre os grupos VEI-OST e ZOL-OST (FIGURA 16B).

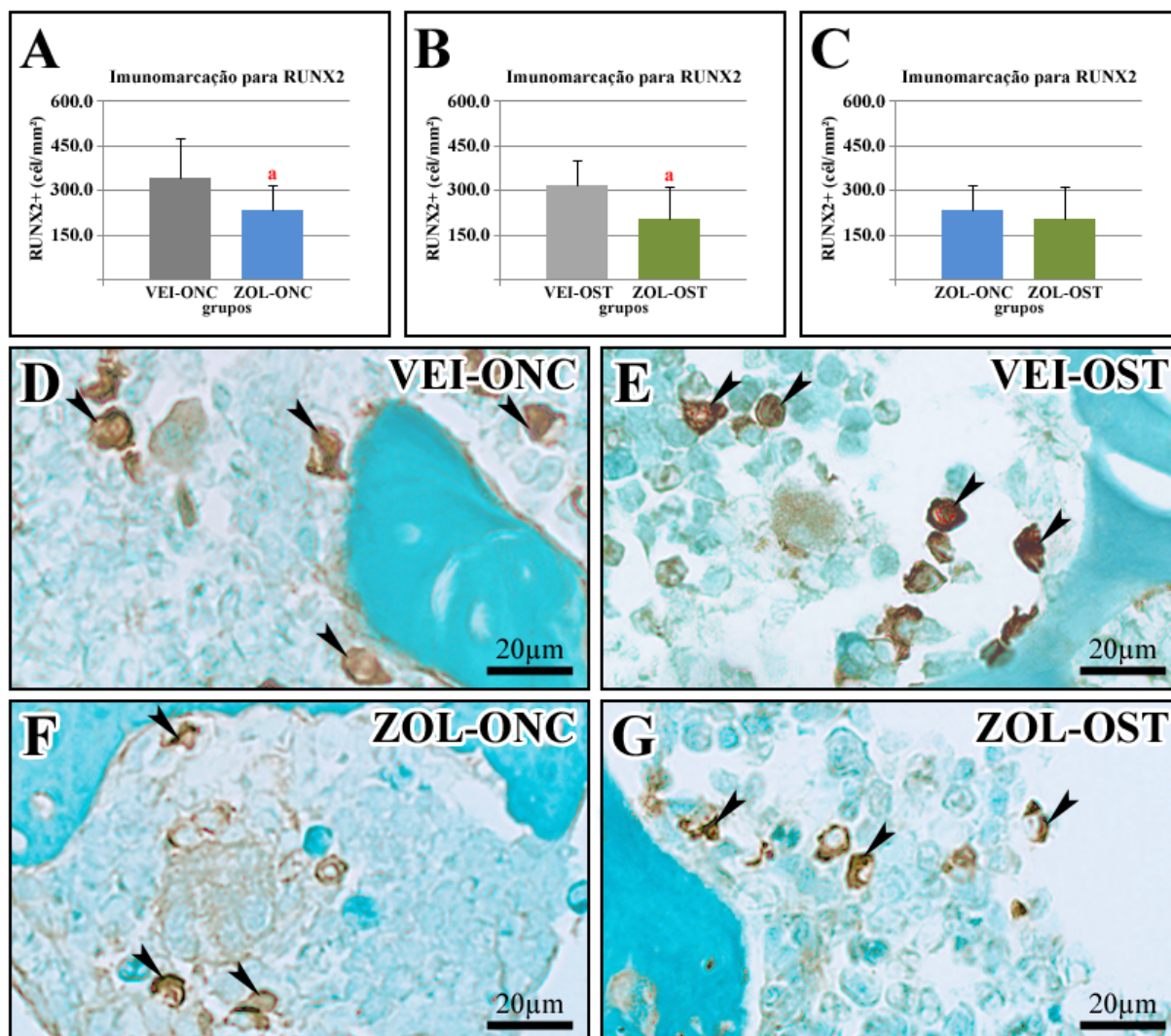
Dosagem oncológica X dosagem osteoporótica: Não houve diferença no número de células TRAP-positivas por mm² entre os grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (FIGURA 16C).

FIGURA 13 - Padrão de imunomarcção para BMP2/4 nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais.



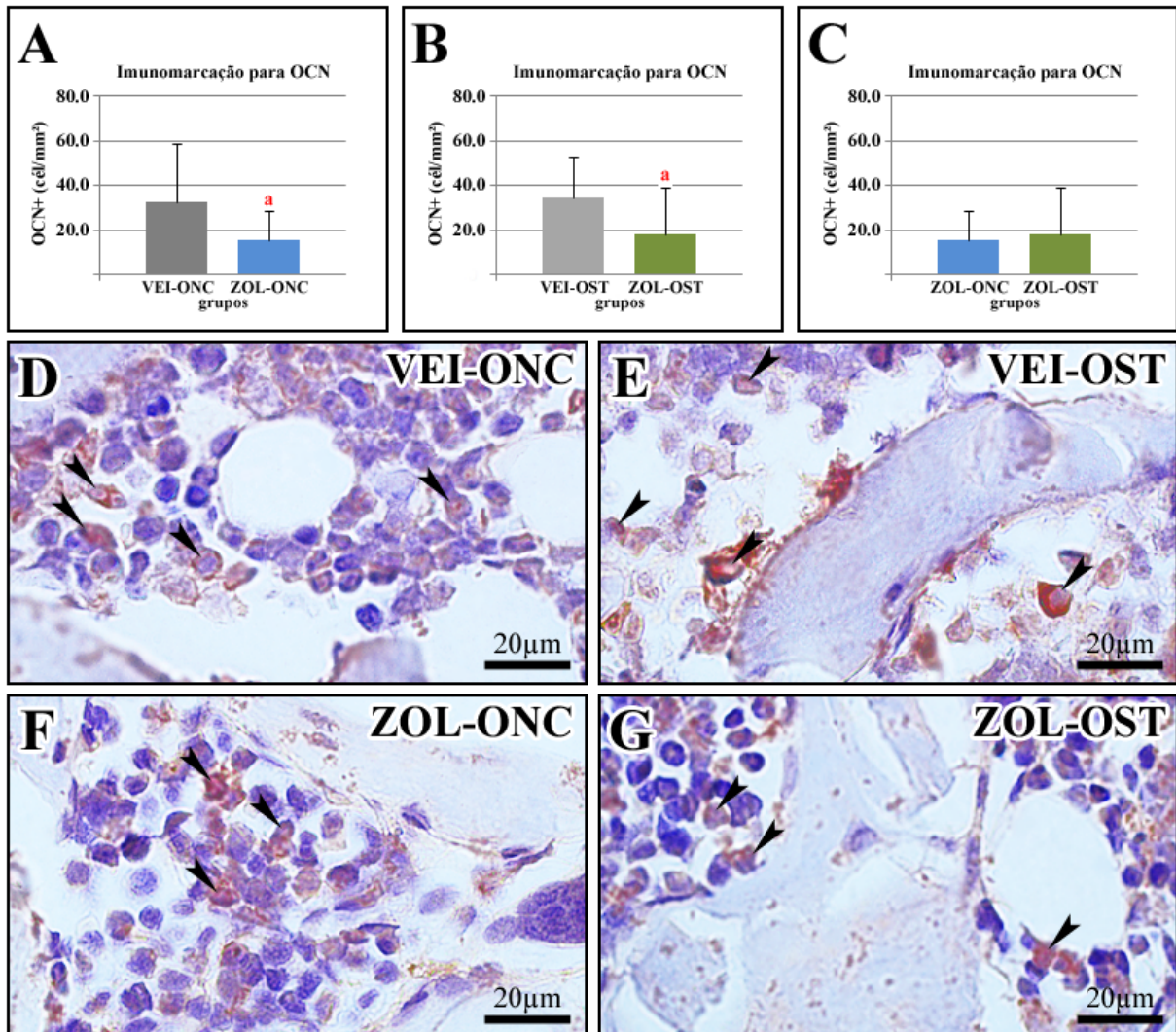
Descrição: (A) Gráfico apresentando a quantidade de células BMP2/4-positivas por mm² nos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (B) Gráfico apresentando a quantidade de células BMP2/4-positivas por mm² nos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); (C) Gráfico apresentando a quantidade de células BMP2/4-positivas por mm² nos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica); (D, F) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células BMP2/4-positivas nos espécimes dos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (E, G) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células BMP2/4-positivas nos espécimes dos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica). Abreviações e símbolos: *BMP2/4+*, células BMP2/4-positivas; *cél/mm²*, células por milímetro quadrado; *setas pretas*, exemplos de células BMP2/4-positivas imunomarcadas. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20µm. FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 14 - Padrão de imunomarcção para RUNX2 nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais.



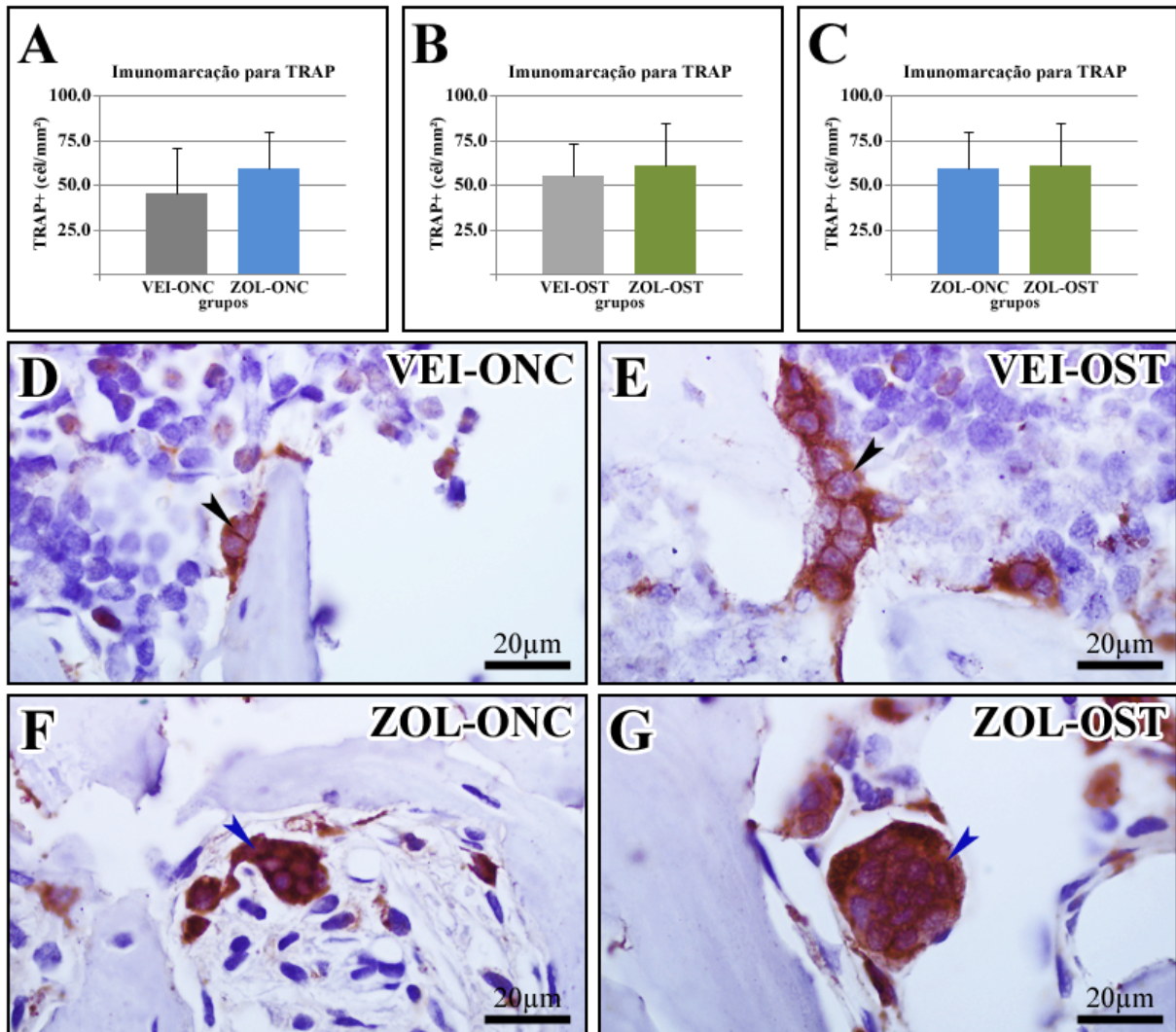
Descrição: (A) Gráfico apresentando a quantidade de células RUNX2-positivas por mm² nos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (B) Gráfico apresentando a quantidade de células RUNX2-positivas por mm² nos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); (C) Gráfico apresentando a quantidade de células RUNX2-positivas por mm² nos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica); (D, F) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células RUNX2-positivas nos espécimes dos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); (E, G) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células RUNX2-positivas nos espécimes dos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica). Abreviações e símbolos: *a*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos; *cél/mm²*, células por milímetro quadrado; *RUNX2+*, células RUNX2-positivas; *setas pretas*, exemplos de células RUNX2-positivas imunomarcadas. Contra-coloração: *fast-green*. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20µm. FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 15 - Padrão de imunomarcção para OCN nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais.



Descrição: **(A)** Gráfico apresentando a quantidade de células OCN-positivas por mm² nos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); **(B)** Gráfico apresentando a quantidade de células OCN-positivas por mm² nos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); **(C)** Gráfico apresentando a quantidade de células OCN-positivas por mm² nos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica); **(D, F)** Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células OCN-positivas nos espécimes dos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); **(E, G)** Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células OCN-positivas nos espécimes dos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica). Abreviações e símbolos: *a*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos; *cél/mm²*, células por milímetro quadrado; *OCN+*, células OCN-positivas; *setas pretas*, exemplos de células OCN-positivas imunomarcadas. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20µm. FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 16 - Padrão de imunomarcção para TRAP nos tecidos peri-implantares dos diferentes grupos experimentais.



Descrição: **(A)** Gráfico apresentando a quantidade de células TRAP-positivas por mm^2 nos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); **(B)** Gráfico apresentando a quantidade de células TRAP-positivas por mm^2 nos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica); **(C)** Gráfico apresentando a quantidade de células TRAP-positivas por mm^2 nos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST (dosagem oncológica X dosagem osteoporótica); **(D, F)** Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células TRAP-positivas nos espécimes dos grupos VEI-ONC e ZOL-ONC (Experimento I - dosagem oncológica); **(E, G)** Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção das células TRAP-positivas nos espécimes dos grupos VEI-OST e ZOL-OST (Experimento II - dosagem osteoporótica). Abreviações e símbolos: *cél/mm²*, células por milímetro quadrado; *setas azuis*, exemplos de osteoclastos arredondados, hipernucleados e desacoplados da matriz óssea, exibindo características de inatividade; *setas pretas*, exemplos de osteoclastos acoplados à matriz óssea e exibindo características de células em atividade; *TRAP+*, células TRAP-positivas. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 μm . FONTE: O Autor (2019).

DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

Com o inquestionável aumento na expectativa de vida da população, torna-se cada vez mais frequente a utilização de medicamentos para o tratamento e controle de doenças próprias da senilidade. Desordens metabólicas, como a osteoporose, e alguns tipos de neoplasias malignas osteotrópicas são exemplares clássicos de alterações que acometem predominantemente pacientes com idade avançada e requerem um rigoroso controle de progressão e/ou tratamento eficiente através da administração de fármacos específicos, como os BPs, por exemplo (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008). Os BPs mais potentes, como o zoledronato, são medicamentos que atuam ao nível do tecido ósseo, impedindo o processo de reabsorção óssea pela inibição da via do mevalonato nos osteoclastos, a qual é de extrema importância para que tais células concluam seu processo de diferenciação, desempenhem efetivamente a sua função reabsortiva e não entrem em apoptose de forma prematura (COXON; ROGERS, 2003; DUNFORD et al., 2001; EBETINO et al., 2011; ORY et al., 2008; ROGERS et al., 2011). Entretanto, assim como qualquer outra droga com finalidade terapêutica, a utilização de BPs pode levar ao desencadeamento de efeitos adversos e, especialmente dentro da odontologia, destaca-se a ocorrência da ONM-M, condição de etiopatogenia ainda pouco compreendida e de difícil prevenção e tratamento (RUSSELL, 2011). Diante das atuais pesquisas científicas e evidências clínicas, procedimentos odontológicos invasivos devem ser considerados como o principal fator de risco local para o desencadeamento da ONM-M (MARX et al., 2005; OTTO et al., 2011; WALTER et al., 2016).

Assim, frente ao significativo aumento na busca pela instalação de implantes dentários osseointegráveis, levando-se em consideração que os pacientes submetidos a este tipo de reabilitação oral normalmente são idosos, que podem ter feito uso e/ou estarem sob terapia atual com BPs, e que tal cirurgia deve ser encarada como um procedimento odontológico invasivo, o presente estudo objetivou analisar o processo de reparo peri-implantar na tíbia de ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato e avaliar a existência de correlação entre tal processo e a ocorrência de lesões osteonecroticas. Em síntese, foi possível observar que o tratamento com zoledronato, tanto na dosagem oncológica, quanto na osteoporótica, não interferiu negativamente na osseointegração dos implantes de titânio e na quantidade de tecido ósseo peri-implantar neoformado, porém ocasionou o surgimento de numerosas áreas de tecido ósseo não vital e focos de inflamação, principalmente observadas no tratamento com a dosagem oncológica. De posse destes resultados e partindo-se do

princípio de que implantes instalados em tíbia não estão submetidos à carga funcional da mastigação e à contaminação a que tais estruturas estariam sujeitas quando localizadas na cavidade bucal, ainda assim as alterações teciduais encontradas foram significativas, o que possibilita concluir que a instalação de implantes osseointegráveis deve ser vista com grande cautela nestas condições, pois pode constituir-se em um importante fator de risco local para o desencadeamento da ONM-M.

O modelo experimental empregado neste estudo buscou reunir os principais fatores de risco para o desencadeamento da ONM-M já descritos na literatura (MARX et al., 2005; OTTO et al., 2011), ou seja, foram utilizadas fêmeas, com idade relativamente avançada ao término do experimento, que receberam tratamento medicamentoso com zoledronato por via parenteral, IP neste caso, e foram submetidas ao procedimento cirúrgico. As doses de zoledronato consistiram em uma adaptação para o rato dos protocolos atualmente utilizados para a complementação da terapia oncológica e para o tratamento osteoporótico em humanos, à semelhança de estudos experimentais prévios (ERVOLINO et al., 2019; HAO et al., 2015; KHAJURIA et al., 2017; OLEJNIK et al., 2016; SILVA et al., 2015; STATKIEVICZ et al., 2018; TORO et al., 2019; TÜRKER et al., 2016). No presente estudo, os implantes foram instalados nas tíbias dos animais, tendo em vista que este é um modelo experimental clássico para a avaliação do reparo peri-implantar, especificamente da osseointegração, em razão da previsibilidade do curso de reparação tecidual e da similaridade estrutural e taxa de remodelação que o tecido ósseo desta região, especialmente o esponjoso, apresenta com o tecido ósseo alveolar (GLOSSEL et al., 2010). Além disso, Wen et al. (2011) demonstraram que ossos do esqueleto apendicular, como a tíbia, apresentam níveis de absorção e liberação de BPs semelhantes aos ossos maxilares e da mandíbula, o que valida o local escolhido para a instalação dos implantes de titânio e o coloca como uma alternativa viável, eficiente e adequada para estes estudos diante das dificuldades técnicas pertinentes à execução de tal procedimento na cavidade bucal. Todavia, como qualquer outro modelo experimental animal, algumas limitações podem ser pontuadas, incluindo a origem embrionária do tecido ósseo tibial, a qual difere em relação à das maxilas e da mandíbula, além do metabolismo de roedores ser inúmeras vezes mais acelerado do que o de seres humanos (GONG et al., 2017; MATHEUS et al., 2018).

Durante todo o período experimental, as condições gerais de saúde dos animais se mantiveram estáveis. Ao final, não houve diferença no peso corporal médio das ratas entre os grupos de um mesmo experimento, semelhante aos resultados observados por Statkiewicz et al. (2018). As análises microtomográficas dos parâmetros que permitem avaliar a

microarquitetura e a estruturação do tecido ósseo, assim como a análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total na região peri-implantar revelaram que o zoledronato foi capaz de aumentar a quantidade de tecido ósseo ao redor das espiras do implante quando administrado na dosagem oncológica, enquanto que na dosagem osteoporótica o medicamento não afetou a quantidade deste tecido. Tais achados justificam a similaridade na porcentagem de osseointegração observada entre os diferentes grupos experimentais, revelada pela análise do contato osso/implante. De modo semelhante, alguns estudos realizados nos últimos anos têm sugerido que drogas com atividade antirreabsortiva favorecem o processo de osseointegração por serem capazes de aumentar o volume ósseo e, conseqüentemente, diminuir a porosidade óssea total (AYAN et al., 2012; LI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017; QI et al., 2012; ZHANG et al., 2018). Além disso, a maior neoformação óssea observada em espécimes do grupo ZOL-ONC corrobora com os achados de Gong et al. (2017), os quais suportam que os BPs potentes apresentam um efeito inicial sítio-específico durante o processo de reparo ósseo pós-injúrias, ou seja, elevadas doses de zoledronato, como acontece na posologia oncológica, em alguns territórios específicos, além de inibirem o processo de reabsorção óssea, favorecem a sua neoformação em momento anterior a uma diminuição dose-dependente, por serem capazes de favorecer a proliferação e o processo de diferenciação das células mesenquimais destas regiões. Em outras situações, doses mais brandas destes fármacos parecem não influenciar diretamente na diferenciação celular e atividade osteoblástica, porém continuam a impedir o processo reabsortivo. Oliveira et al. (2015), em um estudo experimental, utilizaram baixas doses de zoledronato, associadas ou não à dexametasona, e não observaram diferenças significativas na porcentagem de tecido ósseo peri-implantar entre os grupos tratados com a droga e o grupo controle, à semelhança dos resultados obtidos no presente estudo para a dosagem osteoporótica. Em contraposição a todos estes achados, Mardas et al. (2011) reportaram que a administração de BPs afetou negativamente o processo de osseointegração de implantes de titânio em calvárias de coelhos com osteoporose induzida.

Embora a ONM-M tenha sido caracterizada clinicamente por Ruggiero et al. (2014) como uma área de exposição óssea na região maxilofacial, alguns estágios de evolução da doença foram propostos pelos mesmos autores. Um estágio 0 da ONM-M precede a manifestação clínica da doença, no qual podem ser evidenciados sinais clínicos e/ou radiográficos e/ou histopatológicos de necrose óssea. Tais informações podem ser transpostas ao presente estudo, mesmo que este tenha sido realizado em tíbias. A análise histopatológica efetuada demonstrou inúmeras áreas de tecido ósseo não vital, constituídas por lacunas

desprovidas de osteócitos e/ou mesmo com remanescentes de tais células (MARTELLI et al., 2017), nos espécimes tratados com zoledronato em ambos os experimentos. Tais achados são comumente observados em indivíduos submetidos ao tratamento com drogas antirreabsortivas, ainda que de menor potência relativa (CARMAGNOLA et al., 2013; CÓRDOVA et al., 2016; DE ANTONI et al., 2018; DE BARROS SILVA et al., 2016; YAMAMOTO-SILVA et al., 2013). Um estudo idealizado por Park et al. (2013) demonstrou que ratos tratados com alendronato apresentaram numerosas áreas de tecido ósseo não vital ao redor de implantes de titânio instalados em maxila pós-exodontia. Estas alterações são atribuídas à ação inibitória destes fármacos sobre os osteoclastos, os quais são essenciais para que haja a degradação das áreas contendo lacunas vazias existentes no início do processo de reparação tecidual, permitindo a sua posterior substituição por novos osteoblastos e, finalmente, por osteócitos, em consequência da neoformação da matriz óssea circundante (FUTAMI et al., 2000; PARK et al., 2013). Estudos em outros modelos experimentais ainda fortaleceram tais dados ao demonstrarem que lacunas vazias não são reabsorvidas durante o processo de reparação tecidual devido à supressão da remodelação óssea induzida pelos BPs (BI et al., 2010; KIKUIRI et al., 2010).

Ademais, estudos *in vitro* (BASSO et al., 2013; HUANG et al., 2016; MANZANO-MORENO et al., 2018; NAIDU et al., 2008) têm demonstrado que o zoledronato exerce potente efeito citotóxico sobre pré-osteoblastos e osteoblastos. BMP2/4 é um dos principais fatores de crescimento que induzem a diferenciação de osteoblastos (SALAZAR; GAMER; ROSEN, 2016), enquanto que RUNX2 é um fator de transcrição que denota a diferenciação de osteoblastos, sendo expresso, portanto, principalmente em pré-osteoblastos (VIMALRAJ et al., 2015). Por sua vez, OCN e fosfatase alcalina (ALP, *Alkaline phosphatase*) são os principais responsáveis pela biomineralização da matriz óssea (CHING et al., 2017). Huang et al. (2016) e Manzano-Moreno et al. (2018) apontaram que a expressão gênica de colágeno tipo I, proteína morfogenética óssea 2, RUNX2, ALP e OCN sofre redução dose-dependente em osteoblastos tratados com zoledronato. Corroborando com estes achados, no presente estudo observou-se menor quantidade de células RUNX2-positivas e OCN-positivas nos animais tratados com zoledronato, tanto na dosagem oncológica, quanto na osteoporótica, o que evidencia o elevado efeito citotóxico deste fármaco sobre as células da linhagem osteoblástica, principalmente ao final do processo de osseointegração. No entanto, em função da observação em uma fase mais tardia da remodelação óssea, a quantidade de células BMP2/4-positivas não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, conservando o nível basal de expressão, necessário para a manutenção da integridade tecidual.

Soma-se a isso o fato de que o referido efeito citotóxico acarretado por tais dosagens de BPs sobre as células da linhagem osteoblástica pode ser estendido aos osteócitos, os quais, em condições de normalidade, encontram-se interligados e conectados aos osteoblastos periféricos através de inúmeras projeções citoplasmáticas contidas nos canaliculos do tecido ósseo (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; UBAIDUS et al., 2009). Assim, além de uma possível citotoxicidade direta, alterações importantes nesta dinâmica celular são capazes de acarretar a severa atrofia dos osteócitos (TSUBOI et al., 2016) ou até mesmo a sua morte (AGUIRRE et al., 2012), culminando com o acúmulo de lacunas vazias que, como já mencionado anteriormente, não serão efetivamente reabsorvidas. Todavia, alguns autores relatam que os BPs exercem efeitos positivos e anti-apoptóticos sobre osteoblastos e osteócitos (FROMIGUÉ; BODY, 2002; KOCH et al., 2011; MARUOTTI et al., 2012; PLOTKIN; MANOLAGAS; BELLIDO, 2006), porém, achados tão contraditórios parecem ser resultado das mais variadas dosagens e dos diferentes protocolos de administração da droga a que tais células são expostas, ou seja, até determinada concentração os efeitos podem ser positivos, mas ultrapassado tal limite, e quanto maior a concentração do fármaco, as consequências negativas tornam-se evidentes. Desta forma, ao relacionar os dados encontrados aos achados histopatológicos e imageológicos do presente estudo, pode-se inferir que após o estímulo inicial sítio-específico de doses mais elevadas de zoledronato sobre as células precursoras do tecido ósseo peri-implantar, favorecendo a sua neoformação em dado momento (GONG et al., 2017), um posterior efeito negativo desta droga sobre pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos, associado à supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos e, conseqüentemente, da remodelação óssea, seja capaz de provocar o surgimento de numerosas áreas de tecido ósseo não vital nesta região e predispor ao surgimento das lesões osteonecróticas.

Além das alterações observadas no tecido ósseo peri-implantar, da região cortical e das trabéculas mais profundamente situadas na porção medular da tíbia, o tecido conjuntivo adjacente também exibiu importantes características histopatológicas, as quais não ficaram restritas, porém se apresentaram mais exacerbadas nos grupos tratados com zoledronato, com destaque ainda maior para o tratamento com a dosagem oncológica. Nestas ocasiões, o tecido conjuntivo peri-implantar apresentava-se relativamente desestruturado, com matriz extracelular fibrilar pouco evidente e desorganizada, fibroblastos esparsos e processo inflamatório de moderado a intenso, à semelhança dos resultados descritos por Statkiewicz et al. (2018) e Weber et al. (2017). Ensaio *in vitro* (PABST et al., 2012; SARACINO et al., 2012; SCHEPER et al., 2009; WALTER et al., 2011) reportaram que os BPs também atuam

negativamente sobre as principais células estruturais dos tecidos epitelial e conjuntivo, ou seja, queratinócitos e fibroblastos, respectivamente. Nestes estudos, os autores demonstraram a capacidade que tais medicamentos apresentam em diminuir a proliferação celular e aumentar a apoptose das referidas células, o que explica nossos achados histopatológicos no tecido conjuntivo. Além disso, sabe-se que o processo inflamatório é crucial para a reparação tecidual, porém, quando em níveis exacerbados, pode exercer efeitos contrários e, conseqüentemente, favorecer o desencadeamento de lesões semelhantes à ONM-M. Reforçando os nossos resultados, outros autores descreveram a presença de intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo marginal de lesões osteonecróticas induzidas por BPs (STATKIEVICZ et al., 2018; YANG, H. et al., 2015). Alguns estudos ainda verificaram correlação entre a ONM-M e elevados níveis das principais citocinas com atividade pró-inflamatória, ou seja, TNF α (*Tumoral necrosis factor α* , fator de necrose tumoral α), IL1 β (*Interleukin 1 β* , interleucina 1 β) e IL6 (*Interleukin 6*, interleucina 6) (MORITA et al., 2017; STATKIEVICZ et al., 2018).

Como anteriormente mencionado, o mecanismo de ação do zoledronato apresenta como principal célula-alvo o osteoclasto, célula gigante multinucleada, pertencente ao sistema mononuclear fagocitário, a qual é responsável diretamente pelo processo de reabsorção óssea (KIMMEL, 2007). TRAP é uma enzima produzida por osteoclastos, secretada na matriz extracelular através de vesículas durante o processo reabsortivo, sendo considerada, portanto, um importante biomarcador histoquímico e imunoistoquímico destas células (HAYMAN, 2008). Embora alguns estudos tenham evidenciado uma drástica redução na expressão de TRAP em amostras de tecido ósseo de pacientes acometidos pela ONM-M (GROSS et al., 2017), em células da medula óssea derivadas de macrófagos que foram isoladas de camundongos e tratadas com zoledronato (NAGAOKA et al., 2015), e no plasma sanguíneo de ratos tratados com zoledronato e submetidos à extração dentária (KIM et al., 2016), no presente estudo não houve diferença na quantidade de células TRAP-positivas entre os grupos experimentais, à semelhança do que foi descrito por Mada et al. (2017). Este resultado pode ser explicado devido ao tamanho da ROI analisada, a qual apresentou pequena quantidade de osteoclastos, mesmo em condições de normalidade. Soma-se a isso o fato de que em uma fase mais tardia da remodelação óssea, a atividade reabsortiva já não é tão intensa como no início do processo. Entretanto, do ponto de vista morfológico, as células TRAP-positivas evidenciadas nos grupos ZOL-ONC e ZOL-OST exibiam aspecto de inatividade, encontrando-se distantes da matriz óssea, arredondadas e hipernucleadas, o que comprova a efetividade da terapia medicamentosa utilizada nestes animais.

De modo consagrado, a ocorrência ou não da osseointegração é o fator determinante para a definição de sucesso ou insucesso na implantodontia (OGLE, 2015; OUANOUNOU; HASSANPOUR; GLOGAUER, 2016; RITTEL; DOROGOY; SHEMTOV-YONA, 2018). Porém, apenas análises quantitativas do tecido ósseo peri-implantar e do contato osso/implante não são capazes de oferecer respostas efetivas sobre a qualidade e, por consequência, sobre a durabilidade da osseointegração avaliada. Apesar de serem primariamente utilizados para o tratamento de distúrbios ósseos severos, como proposto neste estudo, alguns autores têm empregado os BPs, incluindo o próprio zoledronato, com a finalidade de melhorar o processo de osseointegração de implantes dentários, através de sua aplicação tópica no sítio de implantação ou até mesmo de sua administração sistêmica em baixas concentrações. Tais estudos têm demonstrado que esta utilização clínica resulta em maior quantidade e/ou maior volume de tecido ósseo peri-implantar, favorecendo a fixação dos implantes de titânio ao osso em que foram inseridos (ABTAHI et al., 2013; ABUMOUSSA et al., 2018; AYAN et al., 2012; DUNDAR et al., 2017; KELLESARIAN et al., 2017; YAMAN et al., 2012). Estas informações corroboram com os achados provenientes das análises microtomográficas e histométrica da quantidade de tecido ósseo total peri-implantar efetuadas no presente estudo, principalmente em relação ao tratamento com a dosagem oncológica de zoledronato. Contudo, tão importantes quanto os dados quantitativos são as variáveis qualitativas que as outras análises possibilitaram. É notável o fato de que grandes quantidades de tecido ósseo não vital, juntamente com focos de inflamação ao redor da estrutura de titânio submetida à carga funcional e à contaminação inerente do meio bucal, irão culminar com a perda precoce da osseointegração, além de predispor à ocorrência da ONM-M, o que fatalmente caracterizará o insucesso do tratamento reabilitador, como sugerido por Vohra et al. (2014). Assim, cirurgiões-dentistas e pesquisadores devem estar atentos ao fato de que, no que diz respeito aos implantes osseointegráveis, quantidade e qualidade são características que necessitam estar interligadas com o intuito de garantir o bem-estar e a longevidade dos tratamentos oferecidos aos pacientes.

Por fim, vários pesquisadores têm proposto um modelo experimental de osseointegração após a instalação da osteoporose induzida pela ovariectomia bilateral em ratas (DIKICIER et al., 2014; DIKICIER et al., 2017; YING et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Na maioria destes estudos, pôde-se verificar que a aplicação tópica de BPs no sítio de implantação, ou mesmo a sua administração sistêmica, foi capaz de melhorar significativamente o processo de osseointegração dos implantes de titânio e as características morfológicas das trabéculas ósseas peri-implantares, sem que os aspectos celulares,

estruturais e a vitalidade deste tecido fossem levados em consideração (DIKICIER et al., 2014; DIKICIER et al., 2017). Em nosso estudo, porém, nenhuma desordem sistêmica foi induzida, pois o objetivo desta pesquisa não consistiu em verificar a eficácia do tratamento com zoledronato sobre tais distúrbios metabólicos, visto que a efetividade dos BPs para a finalidade com que são empregados é algo já consolidado e que, inclusive, justifica o risco de seus efeitos adversos (HABIB, 2017; ROSINI et al., 2015; RUGGIERO, 2011). Este foi o primeiro estudo envolvendo a administração de BPs e a instalação de implantes de titânio osseointegráveis realizado por nosso grupo de pesquisa e, por este motivo, buscou avaliar o efeito genuíno do zoledronato sobre os tecidos peri-implantares sem a interferência de fatores externos, como desordens sistêmicas ou contaminação microbiana, pois resultados significativos nestas condições são capazes inferir que a sua associação a outros elementos agravantes tenderia à ocorrência de consequências ainda mais desfavoráveis. Diante do atual contexto e findada esta etapa inicial da pesquisa, novos estudos, agora mais direcionados, se fazem necessários com o intuito de orientar com maior segurança as futuras investigações clínicas, além de elucidar e estabelecer, efetivamente, os mecanismos etiopatológicos e os principais fatores de risco associados ao desencadeamento da ONM-M.

CONCLUSÃO



6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos para o modelo experimental utilizado no presente estudo, pode-se concluir que:

- o tratamento com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato não afeta negativamente a osseointegração dos implantes de titânio e a quantidade de tecido ósseo neoformado durante o processo de reparo peri-implantar.
- o zoledronato ocasiona o surgimento de extensas áreas de tecido ósseo não vital na região peri-implantar e adjacências, além de focos de inflamação no tecido conjuntivo desta região, porém, tais aspectos mostram-se mais exacerbados no tratamento com a dosagem oncológica, o que indica um efeito dose-dependente deste fármaco.
- o tratamento com potentes drogas antirreabsortivas, como o zoledronato, na dosagem oncológica ou até mesmo na dosagem osteoporótica, está relacionado com a ocorrência de lesões osteonecroticas, o que sugere que a instalação de implantes osseointegráveis deva ser vista com grande cautela em tais condições, pois pode constituir-se em um importante fator de risco local para o desencadeamento da ONM-M.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ABE, K. et al. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. **Int. J. Mol. Med.**, v. 29, n. 6, p. 1007-1015, 2012.
- ABTAHI, J. et al. Effect of local vs. systemic bisphosphonate delivery on dental implant fixation in a model of osteonecrosis of the jaw. **J. Dent. Res.**, v. 92, n. 3, p. 279-283, 2013.
- ABUMOUSSA, S. et al. Local delivery of a zoledronate solution improves osseointegration of titanium implants in a rat distal femur model. **J. Orthop. Res.**, v. 36, n. 12, p. 3294-3298, 2018.
- AGAÇAYAK, K. S. et al. Experimental investigation of relationship between trauma and bisphosphonate-related osteonecrosis. **Niger. J. Clin. Pract.**, v. 17, n. 5, p. 559-564, 2014.
- AGHALOO, T. L. et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 8, p. 1871-1882, 2011.
- AGUIRRE, J. I. et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 27, n. 10, p. 2130-2143, 2012.
- ALLEN, M. R.; BURR, D. B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 67, n. 5, p. 61-70, 2009.
- ANAVI-LEV, K. et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: clinic-pathological investigation and histomorphometric analysis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 115, n. 5, p. 660-666, 2013.
- ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012.
- ATA-ALI, J. et al. What is the impact of bisphosphonate therapy upon dental implant survival? A systematic review and meta-analysis. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 27, n. 2, p. e38-46, 2016.
- AYAN, M. et al. The effect of systemically administered zoledronic acid on the osseointegration of dental implants. **Oral Dis.**, v. 18, n. 8, p. 802-808, 2012.
- BARBA-RECREO, P. et al. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 42, n. 6, p. 744-750, 2014.
- BARBA-RECREO, P. et al. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 43, n. 7, p. 1161-1168, 2015.

- BASSO, F. G. et al. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. **Gerontology**, v. 59, n. 6, p. 534-541, 2013.
- BI, Y. et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 177, n. 1, p. 280-290, 2010.
- BIENZ, M.; SAAD, F. Management of bone metastases in prostate cancer: a review. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care**, v. 9, n. 3, p. 261-267, 2015.
- BOSSHARDT, D. D.; CHAPPUIS, V.; BUSER, D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. **Periodontol.** 2000, v. 73, n. 1, p. 22-40, 2017.
- BRÅNEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 16, p. 1-132, 1977.
- BRINK, J.; MERAW, S. J.; SARMENT, D. P. Influence of implant diameter on surrounding bone. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 18, n. 5, p. 563-568, 2007.
- BUSER, D.; SENNERBY, L.; BRUYN, H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. **Periodontol.** 2000, v. 73, n. 1, p. 7-21, 2017.
- ÇANKAYA, M. et al. 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.**, v. 42, n. 9, p. 1134-1139, 2013.
- CARMAGNOLA, D. et al. Histological findings on jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates (BONJ) or with radiotherapy (ORN) in humans. **Acta Odontol. Scand.**, v. 71, n. 6, p. 1410-1417, 2013.
- CHADHA, G. K. et al. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. **J. Oral Implantol.**, v. 39, n. 4, p. 510-520, 2013.
- CHING, H. S. et al. Expression of odontogenic and osteogenic markers in DPSCs and SHED: a review. **Curr. Stem Cell Res. Ther.**, v. 12, n. 1, p. 71-19, 2017.
- CÓRDOVA, L. A. et al. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 44, n. 9, p. 1387-1394, 2016.
- COXON, F. P.; ROGERS, M. J. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. **Calcif. Tissue Int.**, v. 72, n. 1, p. 80-84, 2003.
- DAYISOYLU, E. H. et al. The effects of adjunctive parathyroid hormone injection on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an animal study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 42, n. 11, p. 1475-1480, 2013.

- DAYISOYLU, E. H. et al. Does an alkaline environment prevent the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? An experimental study in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 117, n. 3, p. 329-334, 2014.
- DE ANTONI, C. C. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw, osteoradionecrosis, and osteomyelitis: A comparative histopathological study. **Braz. Oral Res.**, v. 32, p. e23, 2018.
- DE BARROS SILVA, P. G. et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Dis.**, v. 22, n. 7, 649-657, 2016.
- DE FREITAS, N. R. et al. Bisphosphonate treatment and dental implants: a systematic review. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 21, n. 5, p. e644-651, 2016.
- DIKICIER, E. et al. Effect of systemic administered zoledronic acid on osseointegration of a titanium implant in ovariectomized rats. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 42, n. 7, p. 1106-1111, 2014.
- DIKICIER, S. et al. Radiodensitometric study for evaluation of bone mineral density around dental implants after zoledronic acid treatment in ovariectomized rats. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 22, n. 3, p. e377-382, 2017.
- DODSON, T. B. The frequency of medication-related osteonecrosis of the jaw and its associated risk factors. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v. 27, n. 4, p. 509-516, 2015.
- DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc.**, v. 83, n. 9, p. 1032-1045, 2008.
- DUNDAR, S. et al. Effects of local and systemic zoledronic acid application on titanium implant osseointegration: and experimental study conducted on two surface types. **J. Craniofac. Surg.**, v. 28, n. 4, p. 935-938, 2017.
- DUNFORD, J. E. et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 296, n. 2, p. 235-242, 2001.
- EBETINO, F. H. et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 20-33, 2011.
- ERVOLINO, E. et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**, v. 120, p. 101-113, 2019.
- FAVERANI, L. P. et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. **Clin. Oral Investig.**, v. 22, n. 1, p. 255-265, 2018.
- FERLITO, S.; LIARDO, C.; PUZZO S. Bisphosphonates and dental implants: a case report and a brief review of literature. **Minerva Stomatol.**, v. 60, n. 1-2, p. 75-81, 2011.

- FERNÁNDEZ-BARRERA, M. A. et al. Contribution of prosthetic treatment considerations for dental extractions of permanent teeth. **J. Am. Coll. Dent.**, v. 82, n. 2, p. 25-30, 2016.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 421746, 2015.
- FRANCHI, M. et al. Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants. **Biomaterials**, v. 25, n. 12, p. 2239-2246, 2004.
- FROMIGUÉ, O.; BODY, J. J. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. **J. Endocrinol. Invest.**, v.25, p. 539-546, 2002.
- FUTAMI, T. et al. Tissue response to titanium implants in the rat maxilla: ultrastructural and histochemical observations of the bone-titanium interface. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 2, p. 287-298, 2000.
- GARCIA, V. G. et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 49, n. 5, p. 584–594, 2014.
- GLOSSEL, B. et al. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 25, n. 3, p. 516-524, 2010.
- GOMEZ FONT, R.; MARTINEZ GARCIA, M. L.; OLMOS MARTINEZ, J. M. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 13, n. 5, p. e318-324, 2008.
- GONG, X. et al. Skeletal site-specific effects of zoledronate on in vivo bone remodeling and in vitro BMSCs osteogenic activity. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 36129, 2017.
- GROSS, C. et al. Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. **J. Transl. Med.**, v. 15, n. 1, p. 128, 2017.
- HABIB, Z. A. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis: a review of skeletal safety concerns. **Expert. Rev. Endocrinol. Metab.**, v. 12, n. 1, p. 59-71, 2017.
- HAO, Y. et al. Zoledronic acid suppresses callus remodeling but enhances callus strength in an osteoporotic rat model of fracture healing. **Bone**, v. 81, p. 702-711, 2015.
- HAYMAN, A. R. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. **Autoimmunity**, v. 41, n. 3, p. 218-223, 2008.
- HUANG, X. et al. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. **Mol. Med. Rep.**, v. 13, n. 1, p. 613-622, 2016.
- INSUA, A. et al. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegrations and peri-implant bone loss. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 105, n. 7, p. 2075-2089, 2017.

- JACOBSEN, C. et al. Osteopathology induced by bisphosphonates and dental implants: clinical observations. **Clin. Oral Investig.**, v. 17, n. 1, p. 167-175, 2013.
- JANG, H. W.; KIM, J. W.; CHA, I. H. Development of animal model for bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 37, n. 1, p. 18, 2015.
- JUNQUERA, L.; GALLEGO, L.; PELAZ, A. Multiple myeloma and bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible associated with dental implants. **Case Rep. Dent.**, v. 2011, p. 568246, 2011.
- KAJIZONO, M. et al. Incidence and risk factors of osteonecrosis of the jaw in advanced cancer patients after treatment with zoledronic acid or denosumab: a retrospective cohort study. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 38, n. 12, 1850-1855, 2015.
- KATZ, J.; ORDOVEZA, P. A. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) associated with a once-yearly IV infusion of zoledronic acid (Reclast) 5 mg: two cases and review of the literature. **Quintessence Int.**, v. 45, n. 8, p. 685-690, 2014.
- KELLESARIAN, S. V. et al. Effect of local zoledronate delivery on osseointegration: a systematic review of preclinical studies. **Acta Odontol. Scand.**, v. 75, n. 7, p. 530-541, 2017.
- KHAJURIA, D. K. et al. Novel therapeutic intervention for osteoporosis prepared with strontium hydroxyapatite and zoledronic acid: in vitro and pharmacodynamic evaluation. **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.**, v. 71, p. 698-708, 2017.
- KIKUIRI, T. et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 25, n. 7, p. 1668-1679, 2010.
- KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PloS Biol.**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.
- KIM, I. et al. The effect of systemically administered bisphosphonates on bony healing after tooth extraction and osseointegration of dental implants in the rabbit maxilla. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 28, n. 5, p. 1194-1200, 2013.
- KIM, J. W. et al. Biomarkers for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 18, n. 2, p. 281-291, 2016.
- KIM, S. G. et al. Retrospective Evaluation of treatment planning for dental implant. **J. Am. Coll. Dent.**, v. 82, n. 2, p. 25-30, 2015.
- KIMMEL, D. B. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates - Review. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 11, p. 1022-1033, 2007.
- KOCH, F. P. et al. Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner - a quantitative in vitro gene expression analysis of Dlx5, Runx2, OCN, MSX1 and MSX2. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 39, p. 562-569, 2011.

- LAZAROVICI, T. S. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 68, n. 4, p. 790-796, 2010.
- LI, J. P. et al. Early healing of hydroxyapatite-coated implants in grafted bone of zoledronate acid-treated osteoporotic rabbits. **Periodontol.**, v. 85, n. 2, p. 308-316, 2014.
- LUCKMAN, S. P. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. **J. Bone Miner. Res.**, v. 13, n. 4, p. 581-589, 1998.
- LUNGU A. E. et al. Observational study of the bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. **Clujul Med.**, v. 91, n. 2, p. 209-215, 2018.
- MADA, E. Y. et al. Effects of green tea and bisphosphonate association on dental socket repair of rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 75, p. 1-7, 2017.
- MANZANO-MORENO, F. J. et al. Bisphosphonate modulation of the gene expression of different markers involved in osteoblast physiology: possible implications in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Int. J. Med. Sci.**, v. 15, n. 4, p. 359-367, 2018.
- MARDAS, N. et al. The effect of SLActive surface in guided bone formation in osteoporotic-like conditions. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 22, n. 4, p. 406-415, 2011.
- MARTELLI, S. J. R. et al. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imacionological and histomorphometrical study in vivo: **J. Oral Pathol. Med.**, v. 46, n. 8, p. 632-636, 2017.
- MARUOTTI, N. et al. Bisphosphonates: effects on osteoblast. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 68, n. 7, p. 1013-1018, 2012.
- MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 9, p. 115-117, 2003.
- MARX, R. E. et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 63, n. 11, p. 1567-1575, 2005.
- MATHEUS, H. R. et al. Cisplatin chemotherapy impairs the peri-implant bone repair around titanium implants: an in vivo study in rats. **J. Clin. Periodontol.**, v. 45, n. 2, p. 241-252, 2018.
- MATTHEOS, N. et al. Dental implant placement with bone augmentation in a patient who received intravenous bisphosphonate treatment for osteoporosis. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 79, p. d2, 2013.
- MERGONI, G. et al. The effect of laser therapy on the expression of osteocalcin and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone. **Support. Care Cancer**, v. 24, n. 2, p. 807-813, 2016.

- MIGLIACCIO, S.; BRAMA, M.; SPERA, G. The differential effects of bisphosphonates, SERMS (selective estrogen receptor modulators), and parathyroid hormone on bone remodeling in osteoporosis. **Clin. Interv. Aging.**, v. 2, n. 1, p. 55-64, 2007.
- MIGLIORATI, C. A. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 22, p. 4253-4254, 2003.
- MINIELLO, T. G. et al. Osteonecrosis related to once-yearly zoledronic acid treatment in an osteoporotic patient after dental implant. **Braz. Dent. J.**, v. 26, n. 1, p. 86-88, 2015.
- MORITA, M. et al. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 46322, 2017.
- NAGAOKA, Y. et al. Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition. **J. Dent. Res.**, v. 94, n. 4, p. 594-601, 2015.
- NAIDU, A. et al. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 106, n. 1, p. 5-13, 2008.
- NGUYEN, C. T.; DRISCOLL, C. F.; COLETTI, D. P. Reconstruction of a maxillectomy patient with an osteocutaneous flap and implant-retained fixed dental prosthesis: a clinical report. **J. Prosthet. Dent.**, v. 105, n. 5, p. 292-295, 2011.
- NOCITI JÚNIOR, F. H. et al. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 9, p. 982-987, 2002.
- OGLE, O. E. Implant surface material, design, and osseointegration. **Dent. Clin. North Am.**, v. 59, n. 2, p. 505-520, 2015.
- O'HALLORAN, M.; BOYD, N. M.; SMITH, A. Denosumab and osteonecrosis of the jaws - the pharmacology, pathogenesis and a report of two cases. **Aust. Dent. J.**, v. 59, n. 4, 516-519, 2014.
- OLEJNIK, C. Doses effects of zoledronic acid on mineral apatite and collagen quality of newly-formed bone in the rat's calvaria defect. **Bone**, v. 89, p. 32-39, 2016.
- OLIVEIRA, D. et al. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 25, n. 1, p. 42-52, 2017.
- OLIVEIRA, M. A. et al. The effects of zoledronic acid and dexamethasone on osseointegration of endosseous implants: histological and histomorphometrical evaluation in rats. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 26, n. 4, p. e17-21, 2015.
- ORY, S. et al. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 87, n. 8-9, p. 469-477, 2008.
- OTTO, S. et al. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: A case report. **J. Med. Case Rep.**, v. 5, p. 477, 2011.

- OUANOUNOU, A.; HASSANPOUR, S.; GLOGAUER, M. The influence of systemic medications on osseointegration of dental implants. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 82, p. g7, 2016.
- PABST, A. M. et al. The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes--in vitro study. **Clin. Oral Investig.**, v. 16, n. 1, p. 87-93, 2012.
- PACHECO, V. N. et al. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats - a blind randomized controlled trial. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 96, n. 4, p. 255-260, 2015.
- PALIN, L. P. et al. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 26, p. e20170470, 2018.
- PARK, R. et al. Effect of alendronate on bone remodeling around implant in the rat. **J. Adv. Prosthodont.**, v. 5, n. 4, p. 374-381, 2013.
- PLOTKIN, L. I.; MANOLAGAS, S. C.; BELLIDO, T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. **Bone**, v. 39, n. 3, p. 443-452, 2006.
- PREIDL, H. M. et al. Osteonecrosis of the jaw in a Crohn's disease patient following a course of bisphosphonate and adalimumab therapy: a case report. **BMC Gastroenterol.**, v. 14, p. 6, 2014.
- QI, M. et al. Effect of zoledronate acid treatment on osseointegration and fixation of implants in autologous iliac bone grafts in ovariectomized rabbits. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 119-127, 2012.
- REID, I. R.; BOLLAND, M. J.; GREY, A. B. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? **Bone**, v. 41, n. 3, p. 318-320, 2007.
- RITTEL, D.; DOROGOY, A.; SHEMTOV-YONA, K. Modeling the effect of osseointegration on dental implant pullout and torque removal tests. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 20, n. 5, p. 683-691, 2018.
- ROGERS, M. J. et al. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 34-41, 2011.
- ROSELLA, D. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. **J. Int. Soc. Prev. Community Dent.**, v. 6, n. 2, p. 97-104, 2016.
- ROSINI, S. et al. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 19, n. 17, p. 3309-3317, 2015.
- RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws--2014 update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, 2014.
- RUGGIERO, S. L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1218, p. 38-46, 2011.

- RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 2-19, 2011.
- SALAZAR, V. S.; GAMER, L. W.; ROSEN, V. BMP signaling in skeletal development, disease and repair. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 12, n. 4, p. 203-21, 2016.
- SARACINO, S. et al. Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 41, n. 10, p. 788-792, 2012.
- SCHEPER, M. A. et al. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. **Br. J. Haematol.**, v. 144, n. 5, p. 667-676, 2009.
- SENEL, F. C. et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, n. 3, p. 385-391, 2010.
- SHIRAKI, M. et al. Safety, pharmacokinetics, and changes in bone metabolism associated with zoledronic acid treatment in japanese patients with primary osteoporosis. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 35, n. 6, p. 675-684, 2017.
- SIEBERT, T. et al. Immediate implant placement in a patient with osteoporosis undergoing bisphosphonate therapy: 1-year preliminary prospective study. **J. Oral Implantol.**, v. 41, p. 360-365, 2015.
- SILVA, P. G. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate related osteonecrosis. **Arch. Oral Biol.**, v. 60, n. 9, p. 1237-1245, 2015.
- SIROLLI, M. et al. Influence of piezosurgery on bone healing around titanium implants: a histological study in rats. **Braz. Dent. J.**, v. 27, n. 3, 278-283, 2016.
- SIVOLELLA, S. et al. Denosumab and anti-angiogenetic drug-related osteonecrosis of the jaw: an uncommon but potentially severe disease. **Anticancer Res.**, v. 33, n. 5, p. 1793-1797, 2013.
- STATKIEVICZ, C. et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 184, p. 7-17, 2018.
- SVERZUT, C. E. et al. Mandibular bisphosphonate-related osteonecrosis after dental implant rehabilitation: a case report. **Implant Dent.**, v. 21, n. 6, p. 449-453, 2012.
- TORO, L. F. et al. Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 22, 2019.
- TSUBOI, K. et al. Effects of drug discontinuation after short-term daily alendronate administration on osteoblasts and osteocytes in mice. **Histochem. Cell Biol.**, v. 146, n. 3, p. 337-350, 2016.

- TÜRKER, M. et al. Histological and biomechanical effects of zoledronate on fracture healing in an osteoporotic rat tibia model. **Eklem Hastalik Cerrahisi**, v. 27, n. 1, p. 9-15, 2016.
- UBAIDUS, S. et al. FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. **J. Electron. Microsc.** (Tokyo), v. 58, n. 6, p. 381-392, 2009.
- VAN POZNAK, C. H. et al. American Society of Clinical Oncology executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 9, p. 1221-1227, 2011.
- VIMALRAJ, S. et al. Runx-2: structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 78, p. 202-208, 2015.
- VOHRA, F. et al. Efficacy of systemic bisphosphonate delivery on osseointegration of implants under osteoporotic conditions: lessons from animal studies. **Arch. Oral Biol.**, v. 59, n. 9, p. 912-920, 2014.
- WALTER, C. et al. Dental implants in patients treated with antiresorptive medication – a systematic literature review. **Int. J. Implant Dent.**, v. 2, n. 1, p. 9, 2016.
- WALTER, C. et al. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. **Oral Dis.**, v. 17, n. 2, p. 194-199, 2011.
- WANG, J.; GOODGER, N. M.; POGREL, M. A. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 9, p. 1104-1107, 2003.
- WEBER, J. B. B. et al. Effect of low-level laser therapy on tissue repair after dental extraction in rats administered zoledronic acid and dexamethasone. **J. Biomed. Opt.**, v. 22, n. 5, p. 58001, 2017.
- WEN, D. et al. Anatomic site variability in rat skeletal uptake and desorption of fluorescently labeled bisphosphonate. **Oral Dis.**, v. 17, n. 4, p. 427-432, 2011.
- YAMACHIKA, E. et al. Treatment of Osteonecrosis of the Jaw. **J. Craniofac. Surg.**, v. 26, n. 7, p. e575-577, 2015.
- YAMAMOTO-SILVA, F. P. et al. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. **Microsc. Res. Tech.**, v. 76, n. 6, p. 633-640, 2013.
- YAMAN, F. et al. Effects of systemic zoledronic Acid administration on osseointegration of hydroxyapatite-coated and resorbable blast material surface implants in rabbit models. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 27, n. 6, p. 1443-1447, 2012.
- YAMASHITA, J.; MCCAULEY, L. K. Antiresorptives and osteonecrosis of the jaw. **J. Evid. Based Dent. Pract.**, v. 12, n. 3 Suppl, p. 233-247, 2012.
- YANG, H. et al. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 5, p. 5161-5167, 2015.

YANG, Y. et al. Effect of zoledronic acid on vertebral marrow adiposity in postmenopausal osteoporosis assessed by MR spectroscopy. **Skeletal Radiol.**, v. 44, n. 10, p. 1499-1505, 2015.

YING, G. et al. Effect of a local, one time, low-dose injection of zoledronic acid on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats. **Arch. Med. Sci.**, v. 12, n. 5, p. 941-949, 2016.

YOGUI, F. C. et al. A SERM increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model of osteoporosis. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 26, p. e20170329, 2018.

ZHANG, X. et al. Bis-enoxin blocks alveolar bone resorption in rats ovariectomy-induced osteoporosis. **Mol. Med. Rep.**, v. 17, n. 2, p. 3232-3238, 2018.

APÊNDICES




APÊNDICES

APÊNDICE A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP.

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
	CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA	
	CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals	
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do reparo ósseo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato", Processo FOA nº 00336-2017, sob responsabilidade de Edilson Ervolino apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de Abril de 2017.</p>		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2019.		
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2019.		
CERTIFICATE		
<p>We certify that the study entitled "Evaluation of peri-implant bone healing in rats treated with oncologic doses or osteoporotic doses of zoledronate", Protocol FOA nº 00336-2017, under the supervision of Edilson Ervolino presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 19, 2017.</p>		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2019.		
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 01, 2019.		
 Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		
<hr/> CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br		

APÊNDICE B - Diretrizes ARRIVE para pesquisa animal.



The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill², Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman³

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section / Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	Título
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	Resumo; Abstract
INTRODUCTION			
Background	3	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale.	1
		b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.	1
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	2
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	3.1
Study design	6	For each experiment, give brief details of the study design including:	
		a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.	3.1.5 3.1.5; 3.4.3 3.1; 3.1.5
Experimental procedures	7	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example:	
		a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used (including monitoring), surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s).	3.1.2; 3.1.3; 3.1.4
		b. When (e.g. time of day).	-
		c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze).	3.1.4
		d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).	3.1.3
Experimental animals	8	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).	3.1
		b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.	3.1

The ARRIVE guidelines. Originally published in PLoS Biology, June 2010

Housing and husbandry	9	Provide details of:	3.1
		a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free (SPF); type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish).	3.1
		b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment).	3.1.1; 3.4.1
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group.	3.1.5
		b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used.	3.1
		c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	-
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done.	3.1.5
		b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	-
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	3.4
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis.	3.4.4
		b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron).	3.4
		c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	3.4.4
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	4.1
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50% ²).	4.1
		b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	4.1
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	4
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group.	-
		b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	-
DISCUSSION			
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature.	5
		b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² .	5
		c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	5
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	5; 6
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	Agradecimientos
<p>References:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. <i>PLoS Biol</i> 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412 2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. <i>BMJ</i> 340:c332. 			

