

MARIANA ESTOCHI SILVA

**Efeito do ácido zoledrônico no periodonto de sustentação
de camundongos fêmeas senescentes e jovens
ovariectomizadas**

**Araçatub
a 2025**

MARIANA ESTOCHI SILVA

**Efeito do ácido zoledrônico no periodonto de sustentação
de camundongos fêmeas senescentes e jovens
ovariectomizadas**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel
em Odontologia.

Orientadora: Prof. Assoc. Mariza Akemi
Matsumoto

Araçatuba

2025

Dedico este trabalho a todas as pessoas que fizeram parte desta jornada. À minha família, pelo apoio incondicional; aos amigos, pela presença acolhedora; aos professores, pelas lições que ultrapassaram os livros; e aos pacientes, que me ensinaram mais do que imaginam.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. . Alberto Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor Prof. Tit. Luciano Tavares Ângelo Cintra.

À Pró Reitoria de Pesquisa (PROPe), processo nº 7433, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

A Deus, que me deu a vida e fez dela um caminho pleno de significados. À Nossa Senhora Aparecida, que com ternura materna guiou meus passos, velou meus sonhos e acalmou meus medos.

Aos meus pais, Maria Soeli Estochi Rocha Silva e Gelson Rocha Silva, por sonharem meus sonhos comigo e por jamais medirem esforços para torná-los realidade. Este trabalho é reflexo do amor, da coragem e da fé que vocês plantaram em mim.

Aos meus irmãos, João e Pedro, por serem presença constante, apoio silencioso e amor incondicional em todos os momentos.

A todos os professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que transformam vidas com o amor que colocam em cada aula, meu mais sincero agradecimento. À Prof^a. Dr^a. Mariza Akemi Matsumoto, minha eterna orientadora, obrigada por me acolher com tanto carinho e por me ensinar, além da ciência, sobre valores que levarei para a vida. Seu exemplo de dedicação e sabedoria me inspira profundamente. Carregarei comigo tudo o que aprendi ao seu lado, tanto na pesquisa quanto como ser humano.

Às mulheres, pesquisadoras e professoras, as quais admiro e me inspiro e que tenho a honra de comporem a banca examinadora deste trabalho, Prof^a. Dr^a. Alaíde Gonçalves e futura doutora Ana Carolina Zucon Bacelar.

À Me. Ana Carolina Zucon Bacelar, minha referência na área científica, pela paciência e pela excelência em ensinar, cuja presença foi fundamental ao longo de toda esta trajetória. Sua generosidade, apoio e dedicação tornaram possível a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão e reconhecimento.

Ao meu grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Básicas: Ana Carolina Bacelar, Ana Júlia Moreno, Juliana Meira, Nataira Momesso, Danilo Leite, Caio Jesus, Ana Carolyna Becher, Gabriella Avante, Arthur Ataíde, Isabella e Reginaldo por todo apoio e amizade construída.

Às minhas amigas, Sabrina Bento Timóteo, Viviam Del Priore, Isabella Biazus e Marina Dutra, que foram abrigo nos dias difíceis e festa nos dias felizes. Sem a amizade, o acolhimento e a lealdade que encontrei em cada uma, eu não teria chegado até aqui com o coração tão cheio de gratidão.

Aos demais amigos que fizeram a jornada acadêmica ser imensamente prazerosa.

"Cuidar do outro é, antes de tudo, um gesto de humanidade."
– **Leonardo Boff**

SILVA, M. E. Efeito do ácido zoledrônico no periodonto de sustentação de camundongos fêmeas senescentes e jovens ovariectomizadas. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar as características dos tecidos do periodonto de inserção de camundongos fêmeas em condições de falência ovariana por senescência ou por ovariectomia (OVX), com e sem tratamento com bifosfonato de alta potência. Dessa forma, 30 camundongos fêmeas C57Bl/6J de 4, 6 e 18 meses de idade e com o peso variando entre 25 e 28 gramas, foram divididas em seis grupos: Controle (CT) – animais com 6 meses, sem tratamento, CT+ZL- tratados com ácido zoledrônico (ZL), OVX- animais com 4 meses submetidas a ovariectomia, OVX+ZL- submetidas a OVX e tratadas com ZL, ID- animais com 18 meses, senescentes, ID+ZL- senescentes tratadas com ZL. Para todos os animais que foram tratados com ZL, utilizou-se a dose de 500 ug/kg, 1x por semana durante 8 semanas consecutivas iniciando após a confirmação do diestro permanente. Os animais tratados com ZL foram submetidos à eutanásia dois dias após a última aplicação. Após a eutanásia, as mandíbulas foram coletadas para análise dos tecidos periodontais de sustentação dos molares por meio de análise histológica descritiva a partir dos cortes histológicos corados com HE, e por meio de análise qualitativa e quantitativa da matriz colagenosa em microscópio de luz polarizada dos cortes histológicos corados com Picrosirius red. Os dados quantitativos foram submetidos aos testes não paramétricos One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn's considerando $p < 0,05$. A análise histológica revelou atividade osteoclástica mais intensa nos animais OVX e ID. Quando medicados com ZL, os animais idosos apresentaram aumento significativo de fibras do espectro verde em comparação com os controle no ligamento periodontal, além de menor celularidade. Deste modo, concluiu-se que a falência ovariana pelo procedimento de OVX ou pelo envelhecimento natural dos animais influenciou os aspectos histológicos dos tecidos do periodonto de inserção, principalmente com relação à presença mais evidente de células osteoclásticas e espaço ligamentar delgado nestes animais. A terapia com ZL influenciou de forma mais importante os animais ID, cujo ligamento periodontal mostrou-se pouco celularizado e com aumento de fibras colágenas menores e menos organizadas, identificadas pela análise de birrefringência.

Palavras-chave: Insuficiência ovariana primária. Ácido Zoledrônico. Periodonto

SILVA, M. E. **Zoledronic Acid effect on the Supporting Periodontium of Senescent and Ovariectomized Young Female Mice**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the characteristics of the supporting periodontium in female mice under ovarian failure caused by senescence or by ovariectomy (OVX), treated or not with high potency bisphosphonate. Thirty female C57Bl/6J mice, 4, 6, and 18 months of age, weigh from 25 to 28 grams were divided into six groups: Control (CT) – 4-months old mice, no treatment, CT+ZL- treated with zoledronic acid (ZL), OVX - 4-months old ovariectomized mice, OVX+ZL – OVX treated with ZL, ID – 18 months-old mice, ID+ZL – old mice treated with ZL. All the animals treated with ZL received 500 ug/kg of the drug, once a week during 8 consecutive weeks, beginning after permanente diestrus was confirmed. Animals treated with ZL were euthanized two days after the last dose. The mandibles were removed for the analysis of the periodontal tissues of the molars using descriptive histological analysis from the histological slices stained with HE, and for qualitative and quantitative analysis of the collagenous matrix under polarized microscopy of the histological slices stained with Picrosirius-red. Quantitative data was treated using non-parametric tests, One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis, followed by Dunn's for multiple comparisons, considering $p < 0.05$. Histology revealed intense osteoclastic activity in OVX and ID animals. When the animals were treated with ZL, the ID showed a significant increase in the green spectra fibers in comparison with the control, in the periodontal ligament, accompanied with a poor cell contingent. From this, it was concluded that the ovarian failure by OVX and by natural senescence influenced the histological aspects of the supporting periodontium, mainly in relation to the presence of the osteoclasts and the thin periodontal ligament space, Therapy with ZL has a more intense effect on the ID animals, whose periodontal ligament was poor cellularized and with an increase of shorter and less organized collagen fibers, identified by the birefringence analysis.

Keywords: Primary Ovarian Insufficiency. Zoledronic Acid. Periodontium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise histopatológica descritiva - prancha.....	23
Figura 2 - Análise histopatológica descritiva do grupo CT	24
Figura 3 - Análise histopatológica descritiva do grupo CT+ZL.....	25
Figura 4 - Análise histopatológica descritiva do grupo OVX	26
Figura 5 - Análise histopatológica descritiva do grupo OVX+ZL	27
Figura 6 - Análise histopatológica descritiva do grupo ID	28
Figura 7 - Análise histopatológica descritiva do grupo ID+ZL	28
Figura 8 - Análise de birrefringência- prancha.....	31
Figura 9 - Análise de birrefringência.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Padrão histológico observado nos tecidos do periodonto de sustentação de cada um dos grupos analisados	30
---	----

LISTA DE SIGLAS

CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CT	Controle
C	Cementoblastos
D	Dentina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HE	Hematoxilina e eosina
ID	Idoso
LP	Ligamento periodontal
OMs	Osteonecroses dos maxilares relacionadas ao uso de medicamentos
OVX	Ovariectomia
PS	Picrosirius red
ZL	Ácido zoledrônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	PROPOSIÇÃO.....	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Delineamento experimental.....	19
3.2	Tratamento farmacológico com Ácido Zoledrônico	19
3.3	Procedimento cirúrgico de OVX.....	19
3.4	Citologia vaginal.....	20
3.5	Eutanásia e coleta das espécimes	20
3.6	Procedimentos histotécnicos.....	20
3.7	Análise estatística.....	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Análise histopatológica	23
4.2	Análise de birrefringência	30
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXO	

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela baixa densidade mineral e deterioração da microarquitetura óssea, acometendo principalmente mulheres entre a terceira e quarta décadas de vida e/ou na fase pós-menopausa, de modo que tal condição aumenta o risco de fraturas ósseas devido à fragilidade existente (Lane et al, 2000).

Os bifosfonatos nitrogenados (BFs) compõem uma classe de medicamentos antirreabsortivos ósseos classicamente indicados para o tratamento de osteoporose, podendo variar na sua potência e via de administração, tais como alendronato de sódio e risedronato, ambos administrados por via oral, ou o mais potente, o ácido zoledrônico (ZL), administrado por via intravenosa nos casos de osteoporose severa (Compston et al., 2017). Sabe-se que os BFs são mantidos no osso por algum tempo após cessar seu uso e continuam a ter efeitos benéficos por períodos variados, dependendo da escolha (Compston et al., 2019). As recomendações de tratamento são de 5 anos para os BFs orais e de 3 anos para os intravenosos (Compston et al., 2017), sendo que após esse período se a densidade mineral óssea estiver estável e não apresentar riscos de queda ou fraturas durante o período de tratamento, a droga poderá então ser interrompida (Compston et al., 2019). Como o ZL se mostra mais efetivo que os demais BFs (Berenson et al., 2001) e altamente eficaz para a osteoporose pós-menopausa grave em mulheres idosas (Van Poznak et al., 2011), é então considerado de primeira escolha para o tratamento nestas condições (Hamdy, 2010).

Enquanto o uso de BFs parece ter efeitos benéficos sobre esqueleto como um todo, seus efeitos nos ossos da mandíbula e maxilas podem também levar a importantes comorbidades aos pacientes que o utilizam cronicamente, como o desenvolvimento das osteonecroses dos maxilares relacionadas ao uso de medicamentos (OMs) (Ruggiero et al., 2014). Apesar do risco de OMs nestas condições ser estimado em 0,0001% a 0,01% superior à incidência na população geral ($<0,001\%$) (Khan et al., 2014), os pacientes não estão isentos do aparecimento da doença quando submetidos a procedimentos odontológicos invasivos como extrações dentárias (Khan et al., 2017). Além disso, tais dados epidemiológicos ainda continuam em evolução,

uma vez que as OMs consistem em uma classe de patologias clínicas ainda pouco diagnosticada fora dos ambientes acadêmicos.

Acredita-se que com o uso dessas medicações, a resposta inflamatória inicial no local cirúrgico torna-se comprometida, afetando a capacidade de resposta, bem como o reparo adequado do tecido ósseo (Hoefert et al., 2015). Diante deste quadro, há um crescente interesse na comunidade científica sobre o entendimento dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento das OMs. Para tanto, modelos em pequenos roedores tem sido amplamente utilizados a fim de se investigar os possíveis fatores de risco e mecanismos envolvidos, com atenção ao processo de envelhecimento e interferências hormonais, relacionados principalmente ao sexo feminino (Bigueti et al., 2019; Mahmoud et al., 2021).

Deste modo, a osteoporose experimental por meio do procedimento de ovariectomia (OVX) tem sido considerada como padrão-ouro para avaliar os efeitos da privação dos hormônios sexuais femininos em modelos animais, a fim de levar o animal à estropausa (Koebele; Bimonte-Nelson, 2016). Resultados interessantes foram observados por Arioka et al. (2019) após análise dos tecidos periodontais de inserção de camundongos fêmeas osteoporóticas induzidas por OVX, revelando alterações comparáveis ao processo natural de envelhecimento, como atrofia do ligamento periodontal e redução de células osteoprogenitoras. No entanto, informações sobre as alterações no periodonto de inserção decorrentes da falência ovariana por envelhecimento e por OVX sob administração de BFs ainda são escassas, sendo a maioria delas oriundas de pesquisas em ratos machos (Okamoto et al., 2021; Sousa et al., 2021).

Deste modo, propõe-se o presente estudo, a fim de se analisar as características dos tecidos que compõem o periodonto de inserção em camundongos fêmeas idosas e jovens submetidas à OVX e tratadas com bifosfonato de alta potência, e assim, contribuir para o entendimento de uma possível relação das condições histopatológicas do periodonto de inserção com o favorecimento ao desenvolvimento da OM experimental.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Analisar os efeitos do ácido zoledrônico nos tecidos periodontais de sustentação de camundongos fêmeas idosas e jovens submetidas à ovariectomia.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas 30 camundongos fêmeas C57Bl/6J, com idades de 4, 6 e 18 meses e peso variando entre 25 e 28 gramas, mantidas sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão, recebendo água e ração sem restrição e distribuídas em 6 grupos: Controle (C) – animais com 6 meses de idade sem tratamento e C+ZL – tratados com ácido zoledrônico (ZL), OVX – animais submetidos à OVX com 4 meses de idade e OVX+ZL – submetidos à OVX e tratados com ZL, ID – animais idosas com 18 meses de idade e ID+ZL – animais idosas tratadas com ZL. Os grupos C e C+ZL consistiram de camundongos 6 meses a fim de se parear as idades dos animais dos grupos OVX e OVX+ZL no momento da eutanásia. O presente projeto foi encaminhado e aceito pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA # 451-2022) da FOA/UNESP, seguindo-se as normas vigentes pelo CONCEA (ANEXO A).

3.2 Tratamento farmacológico com ácido zoledrônico

Para tratamento com ácido zoledrônico (ZL), foi utilizada a formulação laboratorial da Sigma Aldrich (#SML0223) diluído em solução fisiológica, administrado na dosagem de 500ug/Kg/semana, via IP, durante 4 semanas antes da exodontia do incisivo superior direito e até o final dos períodos experimentais. A dose que foi utilizada já apresenta estudo piloto com resultados satisfatórios para a linhagem de escolha (Biguetti et al., 2019).

3.2 Procedimento cirúrgico de OVX

Os animais do grupo OVX foram submetidos à sedação por meio de injeção intramuscular do anestésico Ketamina a 1% com dose de 50 mg/kg (Francotar ® , Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Cloridrato de Xilazina a 2% com dose de 5 mg/kg (Virbaxyl 2% ® , Virbac Ltda., São Paulo, Brasil), a dosagem recomendada pelo fabricante. Em seguida, foi realizada tricotomia bilateral a coluna lombar, e antissepsia da região a ser incisada PVPI 10%, associado ao PVPI tópico. Após a degermação, os animais receberam anestesia local por meio técnica terminal

infiltrativa subcutânea e intramuscular com cloridrato de mepivacaína 2% com adrenalina 1:100.000 (0.3 ml/Kg, Scandicaine 2% ® com adrenalina 1:100.000, Septodont, França), utilizada também para auxiliar na hemostasia do campo operatório. A técnica de escolha para a cirurgia seguiram o protocolo estabelecido na literatura atual (Souza et al., 2019). Os animais foram submetidos à eutanásia após 56 dias do procedimento de OVX.

3.4 Citologia vaginal

A fim de se confirmar a condição de diestro nos animais dos grupos OVX e ID, foi realizada a citologia vaginal durante 10 dias consecutivos para análise do ciclo estral. No grupo OVX, a coleta foi iniciada após 20 dias do procedimento cirúrgico. Para tanto, foi inserido aproximadamente 0,1ml de solução salina em uma pipeta de 10 microlitros. A ponta da pipeta foi inserida no orifício vaginal a uma profundidade de aproximadamente 1-2 mm, em seguida, a solução salina liberada na vagina e retirada 2 ou 3 vezes (será descartada a cada animal e posteriormente lavadas em água destilada). Após a lavagem, uma pequena gota da amostra será então colocada uniformemente na lâmina histológica em uma camada fina e deixada para secar ao ar, e corada com azul de toluidina análise (Cora et al., 2015).

3.5 Eutanásia e coleta das espécimes

As eutanásias ocorreram após finalizada a análise do ciclo estral, constatando-se a condição de diestro persistente, sendo submetidas à eutanásia por meio sobredosagem anestésica, seguida de decapitação com guilhotina para pequenos animais, seguindo-se as normas vigentes pelo CONCEA. Constatada a morte dos animais, as mandíbulas foram coletadas e imersas em frascos individuais contendo formalina a 10% tamponada por 48 horas, lavados em água corrente por 12 horas e imersas em solução de EDTA 10% para desmineralização.

3.6 Procedimentos histotécnicos

As mandíbulas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em solução EDTA a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 30 dias aproximadamente, até que não apresentaram resistência ao corte com

navalha. As amostras foram novamente lavadas em água corrente, e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido sagital seguindo o longo eixo dos dentes molares, utilizando-se micrótomo Leica RM. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius-red.

3.7 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos por meio da análise de birrefringência da região ligamento periodontal foram submetidos aos testes não paramétricos One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn's considerando-se $p < 0,05$.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise histopatológica

As análises histológicas foram realizadas considerando os terços médios das raízes dos molares inferiores, especificamente entre o segundo e o terceiro molar. Considerando cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 1 a 7 e Tabela 1.

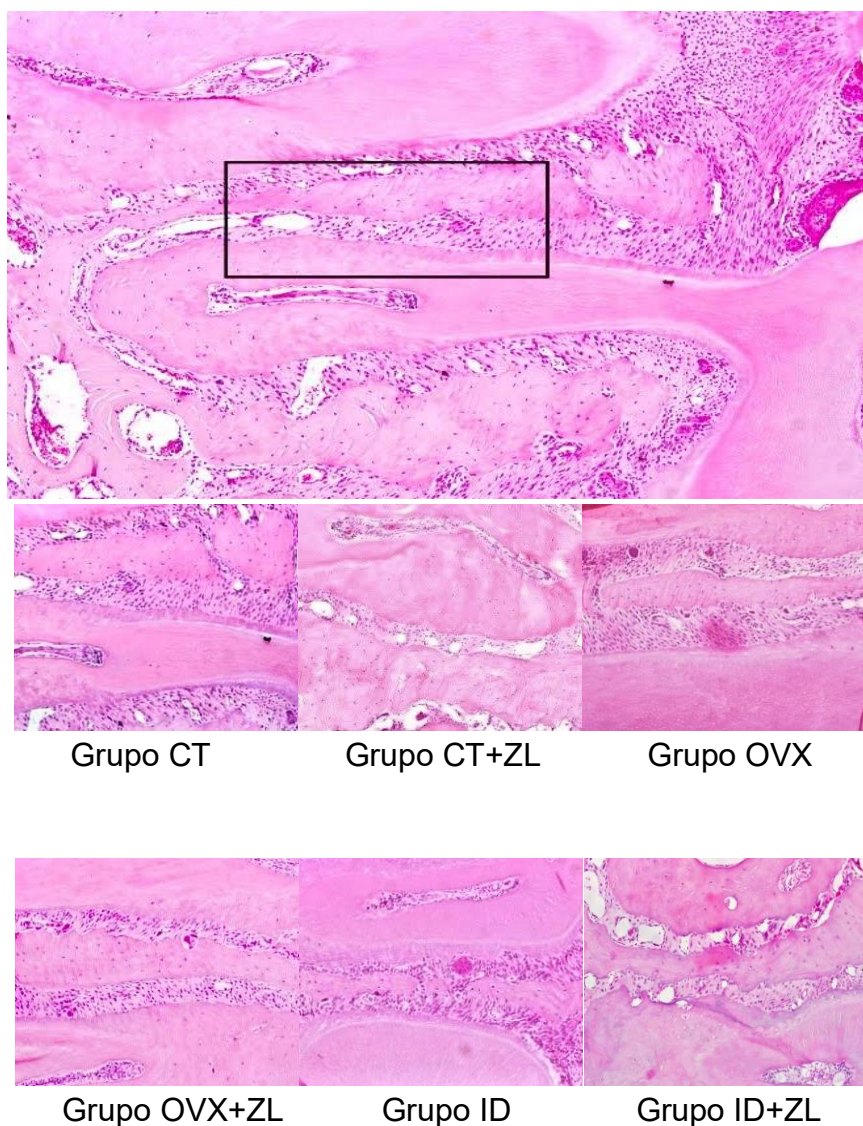


Figura 1: Representação da região de interesse (destaque no retângulo) para a descrição histopatológica dos grupos a serem estudados (HE; aumento original 20x).

GRUPO CT

Analisando a região de interesse deste grupo, observa-se a porção radicular do dente molar inferior, onde é possível distinguir a dentina e o cimento, cuja espessura varia gradualmente até chegar no cimento acelular, com a presença de cementoblastos em sua superfície. Nota-se o ligamento periodontal com numerosos fibroblastos e suas fibras periodontais, responsáveis pela ligação deste tecido ao osso alveolar propriamente dito, bem como vasos sanguíneos. Além disso, no osso alveolar há uma estrutura organizada, com osteócitos, fibras de Sharpey e osteoblastos na porção mais superficial (Figura 2).

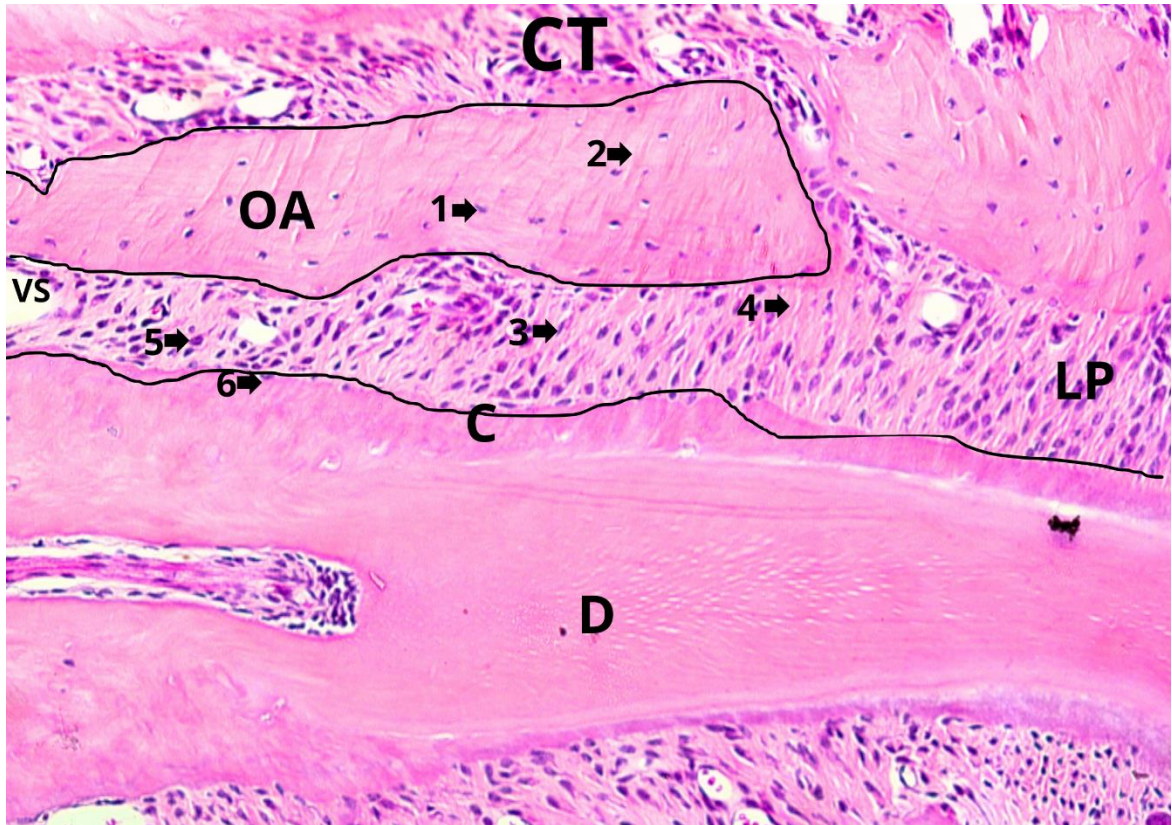


Figura 2- Região lateral da raiz de molar (aumento de 20x). Porção óssea (OA) com osteócitos (1), fibras de Sharpey (2). Ligamento periodontal (LP) com fibroblastos (3), fibras periodontais (4), osteoblastos (5). Região de cimento (C) com cementoblastos (6), porção dentinária (D), e vasos sanguíneos (VS) (HE; aumento original 20x).

GRUPO CT + ZL

Na região de interesse observa-se a presença da dentina e do cimento, assim como, de osso alveolar com seus osteócitos e fibras de Sharpey. Adjacente ao osso alveolar, nota-se o ligamento periodontal delgado, permeado por fibroblastos e apresentando osteoblastos adjacentes ao osso, fibras oblíquas periodontais do ligamento, além de muitos vasos sanguíneos (Figura 3).

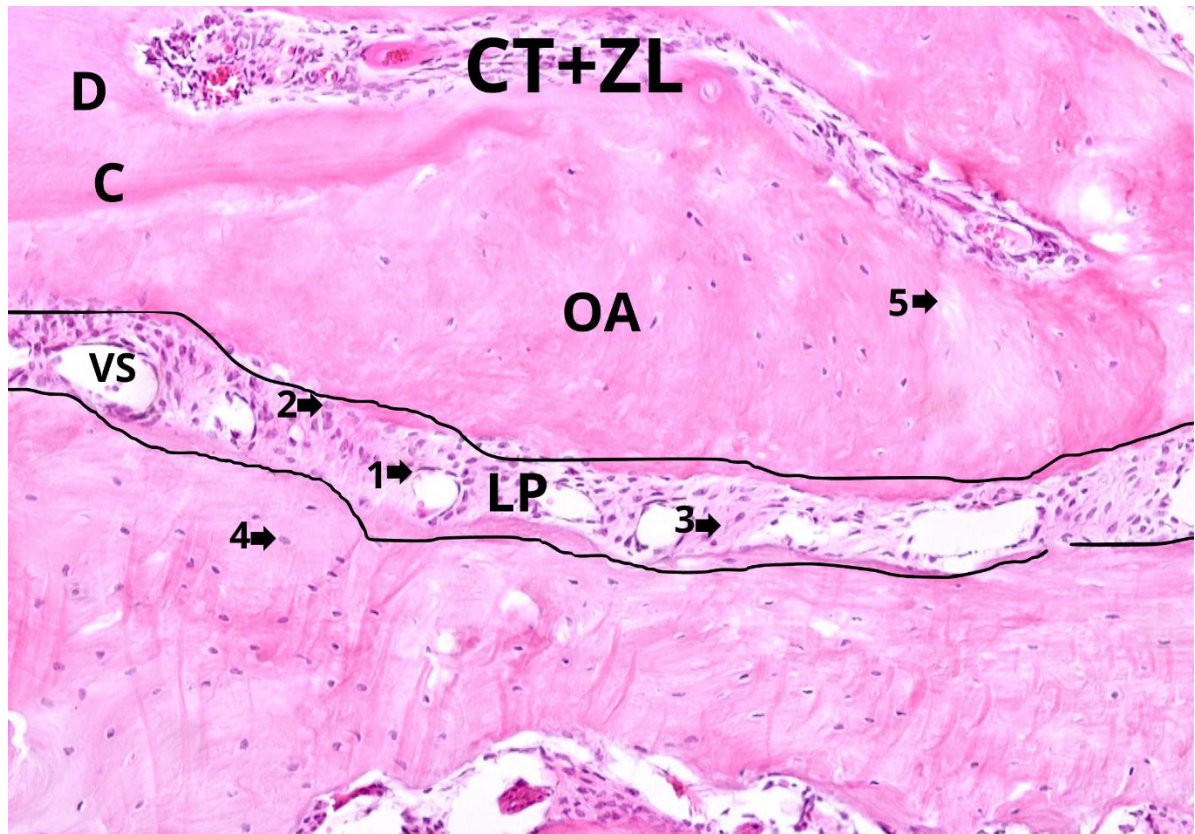


Figura 3: Região lateral de raiz de molar (aumento de 20x). Porção radicular com região de dentina (D), cimento (C). Ligamento periodontal (LP) com fibroblastos (1), osteoblastos (2) e fibras do ligamento (3). No osso alveolar (OA), osteócitos (4) e fibras de Sharpey (5) (HE; aumento original 20x)

GRUPO OVX

Neste grupo, a porção radicular com deposição de dentina e cemento acelular. Há a presença de cementoblastos por toda a sua extensão. Logo acima, o ligamento periodontal possui muitos fibroblastos, fibras oblíquas e osteoblastos em sua porção próxima ao osso. Destaca-se também a presença de osteoclastos, indicando a presença de reabsorção óssea, e algumas ilhotas correspondentes aos restos epiteliais de Malassez. Na parte óssea, há osteócitos e fibras de Sharpey (Figura 4).

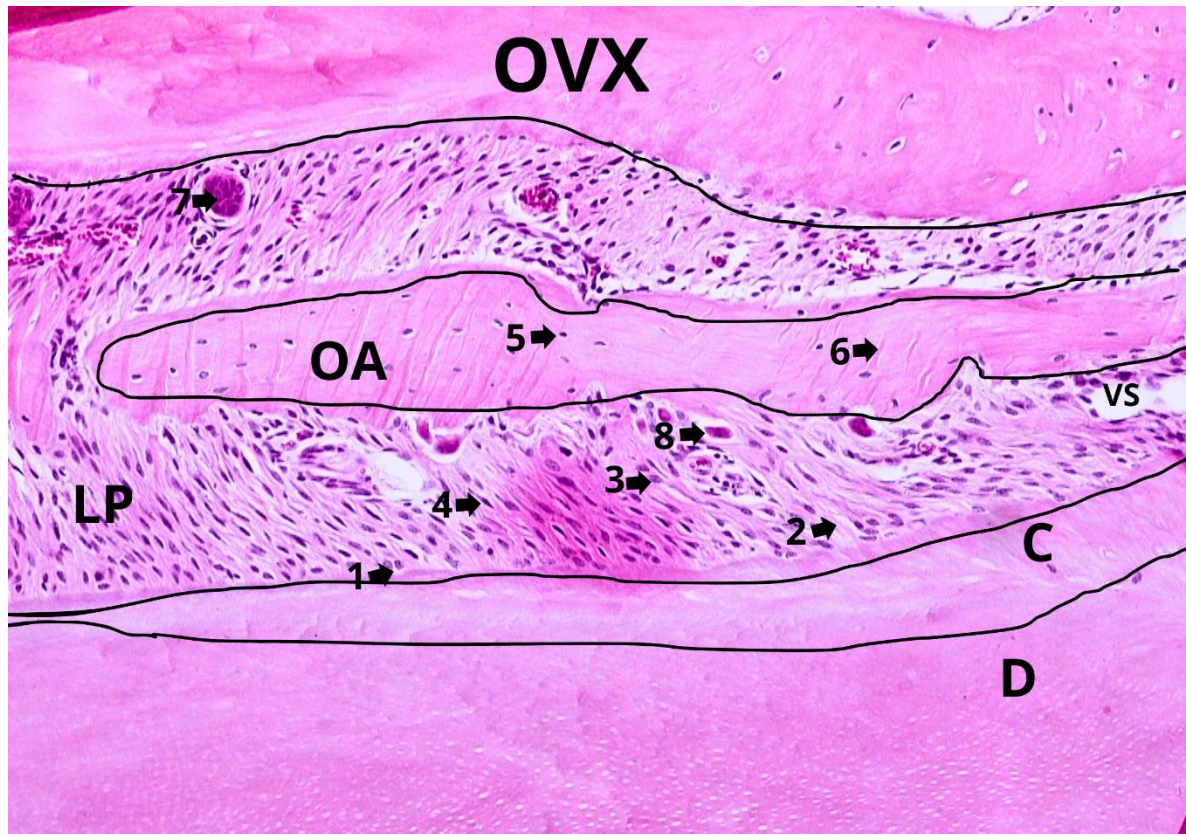


Figura 4: Região lateral de raiz de molar (aumento de 20x). Porção dentinária (D) e cementária (C) com cementoblastos (1). Ligamento periodontal (LP) com fibras (2), osteoblastos (3), fibroblastos (4) e osteoclastos (8). Porção óssea (OA) com osteócitos (5) e fibras de Sharpey (6). Restos Epiteliais de Malassez (7) (HE; aumento original 20x).

GRUPO OVX + ZL

Ao analisar a região de interesse dos animais pertencentes ao grupo OVX + ZL, observa-se a porção de dentina e cimento regulares, com cementoblastos. Logo abaixo, o ligamento periodontal mostra-se delgado e rico em células. Há fibroblastos, osteoblastos e fibras oblíquas do ligamento periodontal, presentes em sua estrutura e também numerosos vasos sanguíneos. No osso alveolar, estão presentes em sua matriz osteócitos e fibras de Sharpey. Observam-se osteoclastos ativos aderidos às superfícies mineralizadas, e não aderidos de formato arredondado (Figura 5).

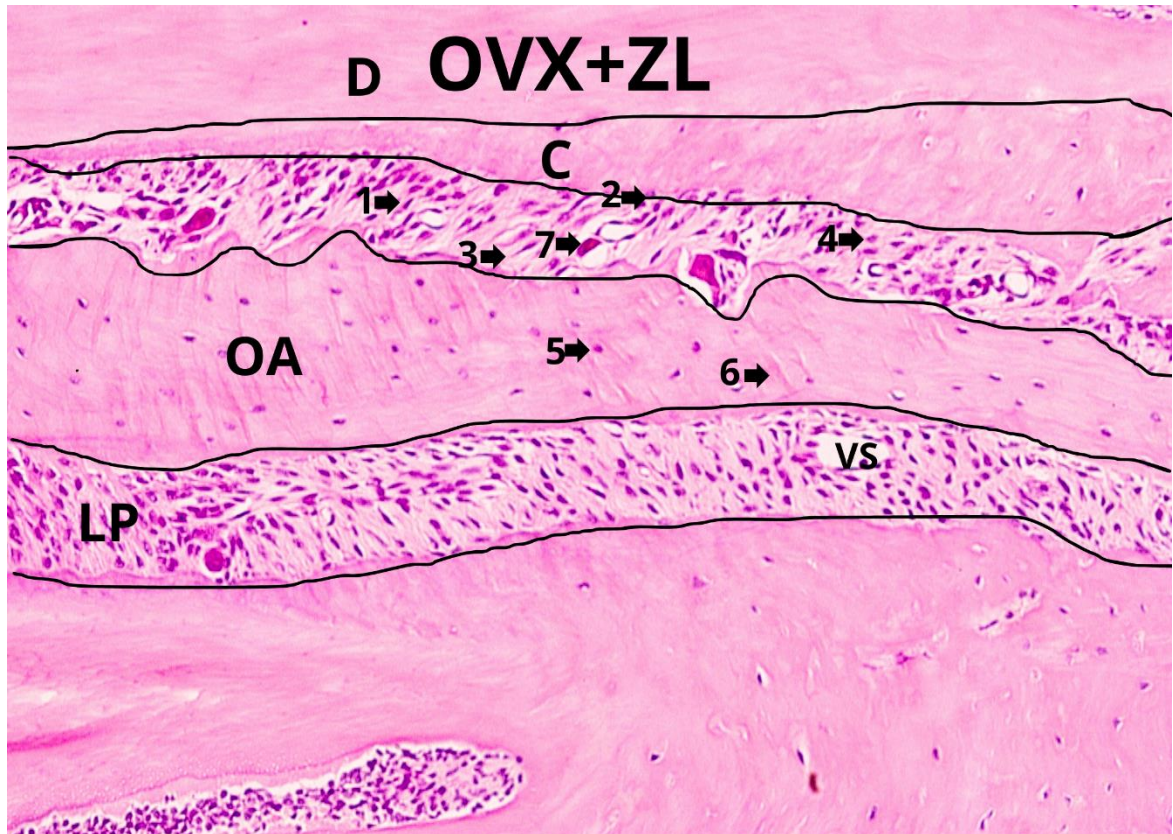


Figura 5: Região lateral de raiz de molar (aumento de 20x). Porção de dentina (D) e cimento (C) com cementoblastos (2). Ligamento periodontal (LP) com fibroblastos (1), fibras (3), osteoblastos (4) e osteoclastos (7). Osso alveolar (OA) com osteócitos (5) e fibras de Sharpey (6) (HE; aumento original 20x).

GRUPO ID

Na região do periodonto lateral à raiz do dente, observamos que este se encontra com a dentina e o cimento devidamente formados. Observa-se delgado espaço periodontal, com atividade osteoclástica. Também é possível ver restos epiteliais de Malassez (Figura 6).

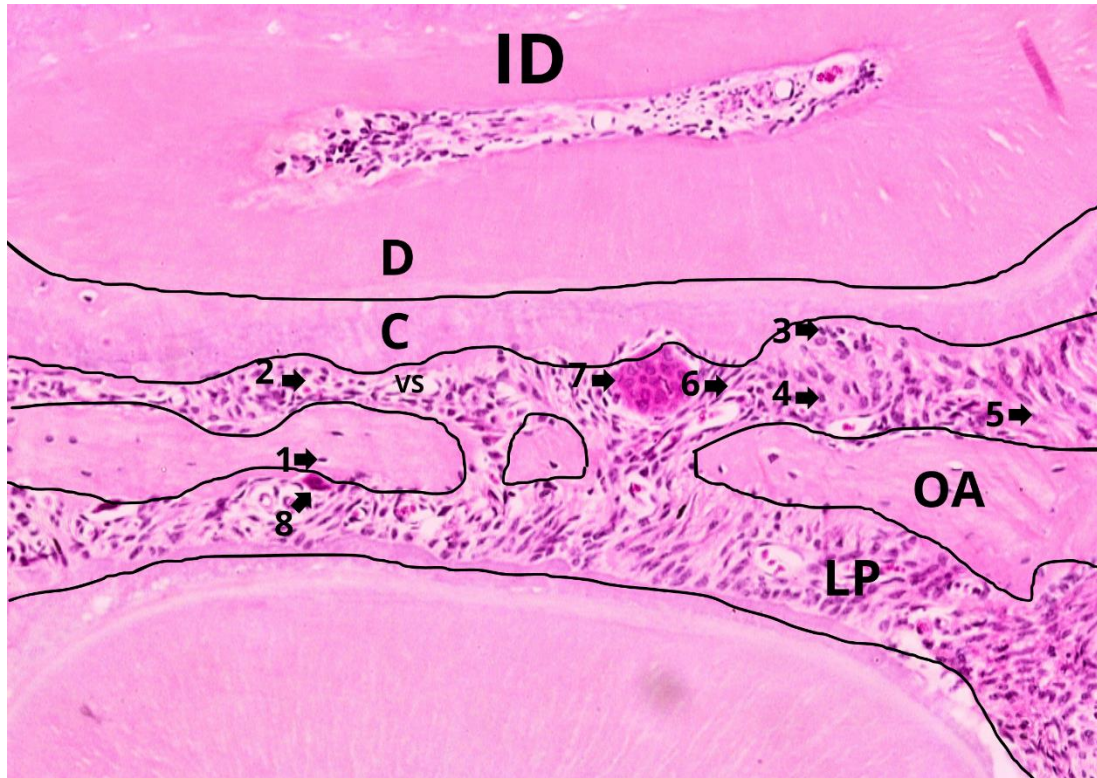


Figura 6: Região lateral de raiz de molar (aumento de 20x). Porção de dentina (D) e cimento (C) com cementoblastos (3). Ligamento periodontal (LP) com osteoblastos (4), fibroblastos (6), fibras do ligamento (5), restos epiteliais de Malassez (7) e osteoclastos (8). Osso alveolar (OA) com osteócitos (1) e fibras de Sharpey (2) (HE; aumento original 20x).

GRUPO ID + ZL

Na região de interesse, correspondente ao periodonto lateral à raiz do dente, observa-se dentina e cimento, há cementoblastos pela sua extensão. No ligamento periodontal, percebe-se maior escassez celular em tecido conjuntivo onde predomina material colagenoso com estreitamento da sua estrutura, com a presença de numerosos vasos sanguíneos. O osso alveolar está íntegro e dentro da normalidade, há a presença de osteócitos e fibras de Sharpey (Figura 7).

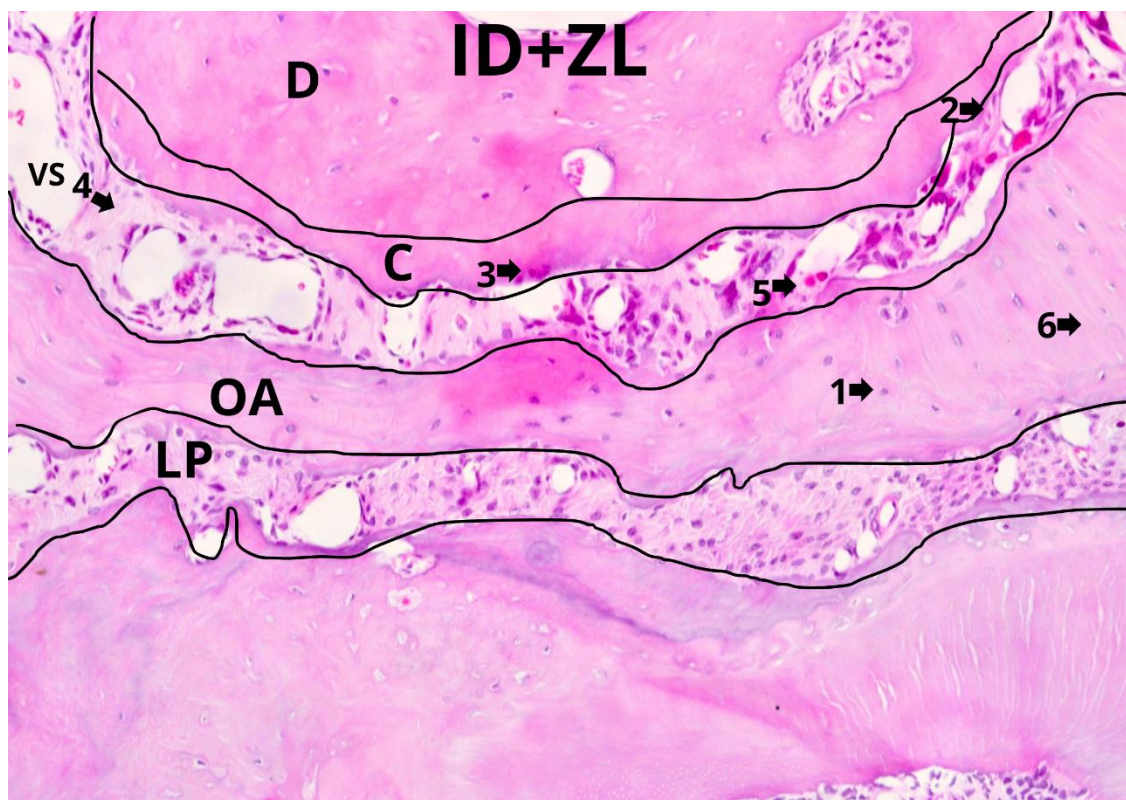


Figura 7: Região lateral da raiz de molar (aumento de 20x). Porção de dentina (D) e cimento (C) com cementoblastos (3). Ligamento periodontal (LP) com a presença de células, fibroblastos (2), osteoblastos (5), fibras do ligamento (4) e vasos sanguíneos (VS). No osso alveolar (OA), há osteócitos (1) e fibras de Sharpey (6) (HE; aumento original 20x).

Tabela 1 – Padrão histológico observado nos tecidos do periodonto de sustentação de cada um dos grupos analisados.

Grupos experimentais	Padrão Histológico
CT	Dentina radicular revestida por cimento do tipo acelular. Ligamento periodontal organizado, constituído por tecido conjuntivo frouxo rico em fibroblastos que se alinham em direção às fibras colágenas. Presença de restos epiteliais de Malassez, discreta atividade osteoclástica.
CT+ZL	Dentina radicular revestida por cimento do tipo acelular. Ligamento periodontal delgado, organizado e constituído por

	tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos que se alinham em direção às fibras colágenas. Presença de restos epiteliais de Malassez, discreta atividade osteoclástica.
OVX	Dentina radicular revestida por cimento do tipo acelular. Ligamento periodontal organizado, constituído por tecido conjuntivo frouxo rico em fibroblastos que se alinham em direção às fibras colágenas. Presença de restos epiteliais de Malassez, intensa atividade osteoclástica.
OVX+ZL	Dentina radicular revestida por cimento do tipo celular. Ligamento periodontal organizado, constituído por tecido conjuntivo frouxo rico em fibroblastos que se alinham em direção às fibras colágenas. Presença de restos epiteliais de Malassez, intensa atividade osteoclástica. Também se observam osteoclastos não aderidos à superfície óssea de conformação arredondada.
ID	Dentina radicular revestida por cimento do tipo celular. Delgado ligamento periodontal organizado, constituído por tecido conjuntivo frouxo rico em fibroblastos que se alinham em direção às fibras colágenas. Presença de restos epiteliais de Malassez, intensa atividade osteoclástica.
ID+ZL	Dentina radicular revestida irregularmente por cimento do tipo acelular. Ligamento periodontal constituído por tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos dispostos aleatoriamente. A matriz colagenosa mostra-se mais evidente e o tecido ósseo pouco celularizado.

4.2 Análise de birrefringência

Foi utilizada a análise de birrefringência a fim de analisar a quantidade e qualidade das fibras colágenas da região do ligamento periodontal lateral à raiz do dente. A partir dos dados analisados, o grupo OVX apresentou aumento significativo de fibras vermelhas em comparação com o grupo ID. Com relação às fibras verdes, o grupo ID+ZL exibiu aumento significativo de fibras verdes em comparação com o grupo CT+ZL (Figura 8).

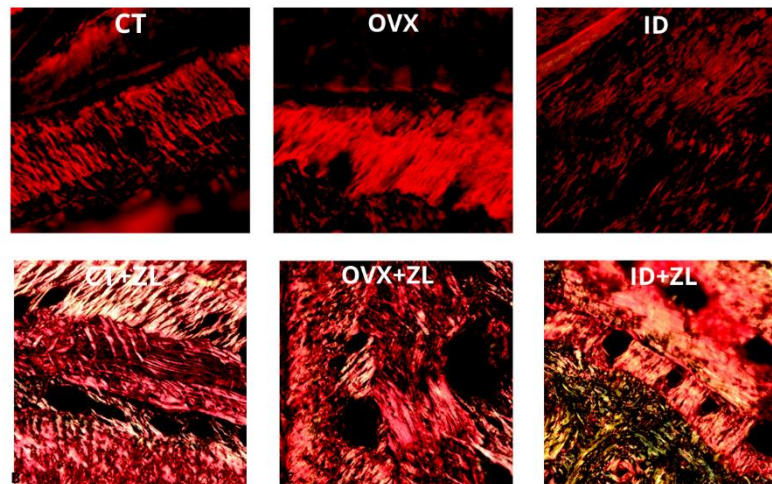


Figura 8: Região lateral da raiz de molares inferiores. Fibras do ligamento periodontal entre o segundo e terceiro molar, coradas em Picrosirius-red (PS; aumento original 40x).

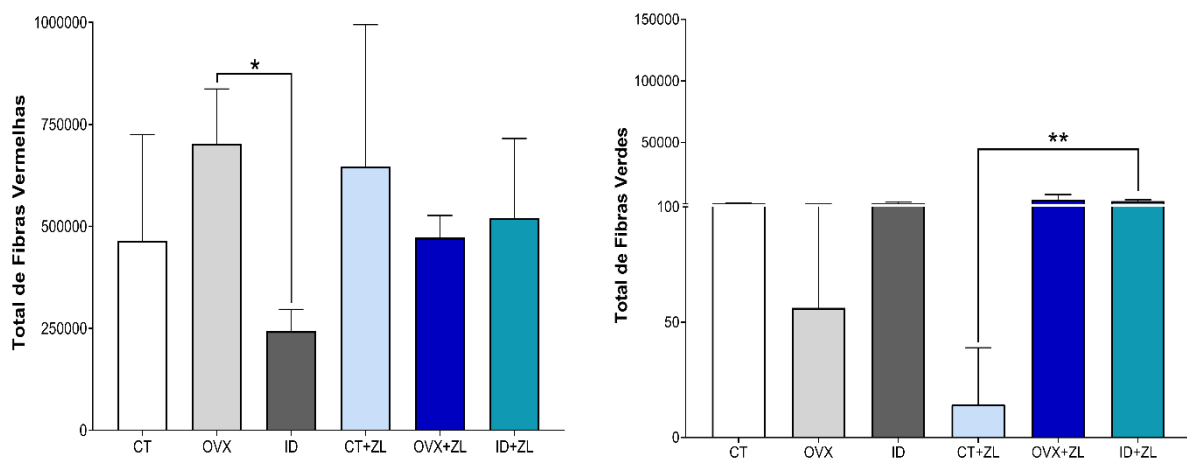


Figura 9 – Resultados estatísticos da região do ligamento periodonta da região lateral da raiz de molar. Teste não paramétrico One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn's. Os resultados são apresentados como média e DP de pixels² para cada cor na análise de birrefringência. O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). (Picrosirius-red, aumento original 40x).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi proposto a fim de investigar os efeitos do ZL sobre os tecidos que compõem o periodonto de inserção, em camundongos fêmeas de linhagem C57Bl/6J, em condições de falência ovariana diferentes, por senescência e por ovariectomia, considerando-se a influência da depleção estrogênica sobre o metabolismo geral no sexo feminino e a alta incidência de desenvolvimento de doenças osteolíticas, como a osteoporose, necessitando de terapias antirreabsortivas como o uso dos BFs, entre eles, o ZL, que demonstrou ser um medicamento muito eficaz na prevenção do risco de fraturas em mulheres no período pós-menopausa (Hamdy, 2010). Apesar disso, notou-se escassez de estudos sobre este tema na literatura pertinente (Okamoto et al., 2013).

O modelo animal de escolha apresenta diversas vantagens, entre elas a semelhança com o genoma humano em mais de 90%, disponibilidade de uma série de ferramentas genéticas/moleculares eficientes (Blake et al., 2021), o pequeno tamanho do animal que facilita o uso de quantidades reduzidas de medicamentos e períodos experimentais reduzidos, tornando-o um modelo custo-eficiente. Além disso, há evidências sobre as respostas inflamatórias e imunológicas a respeito deste modelo animal (Biguetti et al., 2018).

No presente estudo, foram utilizados dois tipos diferentes de modelo de falência ovariana: camundongos jovens que passaram por OVX (4 meses) e animais idosas naturalmente envelhecidas (18 meses). A falência ovariana causada pelo procedimento de OVX é um dos modelos mais utilizados em roedores a fim de se avaliar a condição óssea pós-menopausa (SÓ et al., 2021). No entanto, este procedimento é realizado em animais ainda jovens, quando o organismo ainda não carrega as alterações decorrentes do envelhecimento fisiológico. Nas mulheres, a menopausa ocorre por volta dos 50 anos de idade, o que basicamente corresponde aos 18 meses de idade dos camundongos fêmeas consideradas utilizadas no presente estudo, quando elas já começam a apresentar alterações em praticamente todos os biomarcadores relacionados ao envelhecimento. A fim de se confirmar a falência ovariana em ambos os modelos, realizou-se a análise do ciclo estral por 10 dias consecutivos para a constatação do diestro persistente e a instalação do estado de estropausa.

Os resultados obtidos na análise histopatológica descritiva sugeriram que os grupos tratados com o ZL apresentavam maior estreitamento do espaço do ligamento periodontal e escassez de células. Essa percepção vai diretamente de acordo com Okamoto et al. (2013),

os quais observaram o afinamento do ligamento periodontal sob a alta dose do ZL. Ademais, notou que os BFs são armazenados na matriz óssea por longos períodos por não serem metabolizáveis, o que significa que o ZL pode afetar continuamente o espaço periodontal, quando usado em dosagem mais alta. Apesar da estrutura do ligamento ser devidamente regulada durante a vida, fatores como o estresse mecânico e o uso de medicamentos podem influenciar na espessura do ligamento (Okamoto et al., 2013). A respeito da carência de células, foi observado previamente que os BFs induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem causar danos oxidativos, nesse caso, nos fibroblastos do ligamento periodontal e afetar a supressão do crescimento e migração celular. Em estudo de Taniguchi et al. (2019), observou-se que o ZL induziu EROs nos fibroblastos gengivais, nas células precursoras de osteoclastos e nos osteoclastos maduros.

Considerando-se a análise qualitativa e quantitativa do conteúdo colagenoso do ligamento periodontal, observou-se um aumento significativo de fibras do espectro vermelho nos animais OVX em comparação com os animais ID. Esta condição pode ser decorrente do fato de que os animais submetidos à OVX apresentam queda abrupta dos níveis de estrogênio e conseqüentes alterações decorrentes da fase pós-menopausa, enquanto os animais que envelhecem naturalmente passam pelas fases que antecedem a pós-menopausa, podendo se adaptar às alterações hormonais. Além disso, sabe-se que a fase da estropausa dos roedores difere de modo importante da fase de menopausa nas mulheres, visto que camundongos idosos não sofrem depleção natural dos folículos ovarianos na estropausa, ao contrário dos humanos. (Koebele, 2016; Wright, 2008; Bigueti et al, 2019.) Ademais, há também importantes diferenças hormonais: Nas mulheres após a menopausa, observa-se uma queda acentuada nos níveis de 17β -estradiol e progesterona, acompanhada de elevação dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Já em camundongos idosos, embora haja uma desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, os níveis circulantes de 17β -estradiol permanecem em concentrações moderadas. Dos 9 aos 12 meses de idade, as fêmeas de camundongos apresentam ciclos estrais irregulares e alterações hormonais, entrando na estropausa em vez da menopausa verdadeira, como observado em humanos (Liu et al., 2015). Considerando o espectro verde das fibras, o grupo ID+ZL exibiu aumento significativo em comparação com o CT+ZL, revelando fibras mais delgadas e desorganizadas, justificado também pelo envelhecimento fisiológico que diminui a atividade celular e, conseqüentemente a renovação tecidual, somado à medicação com ZL que altera a remodelação do tecido ósseo alveolar. Sabe-se

que em períodos de reparo do ligamento periodontal há um aumento na quantidade de colágeno do tipo III que ao decorrer do tempo passa a ser substituído por colágeno do tipo I (de Sousa et al., 2021).

Deste modo, a partir dos resultados obtidos e dentro das limitações do presente trabalho, pode-se considerar que a administração do ZL em camundongos idosos afetam de modo negativo os tecidos periodontais de sustentação, alterando negativamente sua capacidade de remodelação.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

A falência ovariana pelo procedimento de OVX ou pelo envelhecimento natural dos animais do grupo ID influenciou os aspectos histológicos dos tecidos do periodonto de inserção, principalmente com relação à presença mais evidente de células osteoclásticas e espaço ligamentar delgado nestes animais. A terapia com ZL influenciou de forma mais importante os animais ID, cujo ligamento periodontal mostrou-se pouco celularizado e com aumento de fibras colágenas menores e menos organizadas, identificadas pela análise de birrefringência.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGGAWAL, P.; SAXENA, S. Stromal differences in odontogenic cysts of a common histopathogenesis but with different biological behavior: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. *Indian Journal of Cancer*, v. 48, n. 2, p. 211–215, abr./jun. 2011.
- ARIOKA, M. et al. Osteoporotic changes in the periodontium impair alveolar bone healing. *Journal of Dental Research*, v. 98, n. 4, p. 450–458, abr. 2019.
- BLAKE, J. A.; BALDARELLI, R.; KADIN, J. A.; RICHARDSON, J. E.; SMITH, C. L.; BULT, C. J.; MOUSE GENOME DATABASE GROUP. Mouse Genome Database (MGD): knowledgebase for mouse-human comparative biology. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D981–D987, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1083>
- BERENSON, J. R. et al. A phase I dose-ranging trial of monthly infusions of zoledronic acid for the treatment of osteolytic bone metastases. *Clinical Cancer Research*, v. 7, n. 3, p. 478–485, mar. 2001.
- BIGUETTI, C. C. et al. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *Journal of Applied Oral Science*, v. 26, p. e20170601, 11 jun. 2018.
- BIGUETTI, C. C. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. *PLOS ONE*, v. 14, n. 6, p. e0214173, 14 jun. 2019.
- COMPSTON, J. et al. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Archives of Osteoporosis*, v. 12, n. 1, p. 43, dez. 2017.
- COMPSTON, J. E.; McCLUNG, M. R.; LESLIE, W. D. Osteoporosis. *The Lancet*, v. 393, n. 10169, p. 364–376, 26 jan. 2019.
- CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, v. 43, n. 6, p. 776–793, ago. 2015.
- DE SOUSA, F. R. N. et al. The effect of high concentration of zoledronic acid on tooth induced movement and its repercussion on root, periodontal ligament and alveolar bone tissues in rats. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 7672, 7 abr. 2021.
- HAMDY, R. C. Zoledronic acid: clinical utility and patient considerations in osteoporosis and low bone mass. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 4, p. 321–335, 18 nov. 2010.
- HOEFERT, S. et al. Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases. *Clinical Oral Investigations*, v. 19, n. 2, p. 497–508, mar. 2015.
- KHAN, A. A. et al. Case-based review of osteonecrosis of the jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the International Task Force on ONJ. *Journal of Clinical Densitometry*, v. 20, n. 1, p. 8–24, jan./mar. 2017.
- KHAN, A. A. et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 30, n. 1, p. 3–23, jan. 2015.
- KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: the utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*, v. 87, p. 5–17, maio 2016.
- LANE, J. M.; RUSSELL, L.; KHAN, S. N. Osteoporosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 372, p. 139–150, mar. 2000.
- LIU, W.; WANG, L. Y.; XING, X. X.; FAN, G. W. Conditions and possible mechanisms of VCD-induced ovarian failure. *Alternatives to Laboratory Animals*, v. 43, n. 6, p. 385–392, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/026119291504300606>.

MAHMOUD, R. H. et al. Alveolar socket healing in 5-lipoxygenase knockout aged female mice treated or not with high dose of zoledronic acid. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 19535, 1 out. 2021.

OKAMOTO, Y. et al. High-dose zoledronic acid narrows the periodontal space in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 42, n. 5, p. 627–631, maio 2013.

RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw – 2014 update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 72, n. 10, p. 1938–1956, out. 2014.

SÓ, B. B. et al. Effects of osteoporosis on alveolar bone repair after tooth extraction: a systematic review of preclinical studies. *Archives of Oral Biology*, v. 125, p. 105054, maio 2021.

SOUZA, V. R. et al. Description of ovariectomy protocol in mice. *Methods in Molecular Biology*, v. 1916, p. 303–309, 2019.

TANIGUCHI, N. et al. Bisphosphonate-induced reactive oxygen species inhibit proliferation and migration of oral fibroblasts: a pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Periodontology*, v. 91, n. 7, p. 947–955, jul. 2020.

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. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 9, p. 1221–1227, 20 mar. 2011.

WRIGHT, L. E. et al. Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 23, n. 8, p. 1296-1303, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1359/jbmr.080309>.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA



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

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito do bifosfonato de alta potência no periodonto de sustentação de camundongos fêmeas senescentes e jovens submetidas à ovariectomia"**, Processo FOA nº 451-2022, sob responsabilidade de Mariza Akemi Matsumoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 23 de Maio de 2023.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 20 de Junho de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Julho de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of high potency bisphosphonate on periodontal tissues of senescent female mice and young female mice submitted to ovariectomy"**, Protocol FOA nº 451-2022, under the supervision of Mariza Akemi Matsumoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 23, 2023.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 20, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 20, 2024.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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