



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

GUSTAVO ANTONIO CORREA MOMESSO

**Ação do ácido zoledrônico e terapia estrogênica
na regeneração óssea alveolar de ratas senis**

Araçatuba – SP

2014

GUSTAVO ANTONIO CORREA MOMESSO

**Ação do ácido zoledrônico e terapia estrogênica
na regeneração óssea alveolar de ratas senis**

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

Orientador: Prof. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles

Araçatuba – SP

2014

Aos **animais** utilizados neste estudo por serem imprescindíveis para a sua realização.

e

Aos meus pais, Idanir e Maria Luiza,

pois sem este apoio incondicional, nada disso seria possível de se concretizar.

A Deus, por ser uma pessoa privilegiada.

Aos meus pais, **Idanir Antonio Momesso Junior e Maria Luiza Correa Momesso**, fontes de amor infindável. Por, muitas vezes, abdicaram de seus sonhos para que pudessem concretizar meus anseios. Por serem fontes eternas de sabedoria e principais referências em minha vida. Sem o apoio, persistência e vontade de vocês, nada disso seria possível.

Ao meu irmão, **Idanir Antonio Momesso Neto**, por ser meu melhor amigo, em todos os momentos. Agradeço imensamente pelo apoio incondicional durante todo este percurso, e por ser esta pessoa a quem considero muito mais que um irmão.

A minha irmã, **Marília Gabriela Correa Momesso**, por todo apoio que me deu durante a graduação, pelo carinho e companheirismo, bem como pelo conhecimento passado nesses anos.

Aos **Familiares** que ajudaram, de alguma forma, a construir esse sonho, fica aqui minha gratidão.

A minha amada namorada, **Cecília Alves de Sousa**, que foi fiel companheira e esteve presente nos momentos mais importantes desta jornada e que, apesar de muitos momentos de ausência, foi compreensiva e sempre me apoiou em minhas decisões.

A minha querida orientadora, **Prof.^a Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles**, a quem devo gratidão eterna por acreditar em mim e pela oportunidade de poder ingressar no meio científico. Tenho profunda admiração por sua pessoa e, principalmente, pelo seu trabalho. Não houve momentos em que não se tinha tempo para sanar uma dúvida ou amenizar uma situação de dificuldade. Sua dedicação é algo contagiante e sua atenção especial para com o aluno é algo ímpar. O aprendizado que adquiri neste projeto transpassou as barreiras científicas e levarei seu exemplo para o resto de minha jornada profissional. Espero poder um dia ter um pouco da competência que pude observar na senhora durante estes dois anos de projeto.

Ao **Prof. Dr. Edílson Ervolino** por todo apoio que me proporcionou durante a execução deste projeto e pelo tempo que dedicou a nos ajudar, sempre muito

critérios e exigente, buscando a excelência. Agradeço profundamente sua atenção com ensinamentos e conselhos.

A Prof.ª Dra. Alessandra Marcondes Aranega pela amizade e confiança em minha pessoa. Agradeço profundamente as inúmeras oportunidades que a senhora pôde me proporcionar e por ter me introduzido no âmbito da Cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial me oferecendo o primeiro estágio na área, que sempre foi um grande sonho meu durante a graduação.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP na pessoa de **Prof.ª Dra. Ana Maria Pires Soubhia**, por me proporcionar toda a estrutura necessária para que pudesse desenvolver meus projetos profissionais e, por fim, me graduar em odontologia.

A Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) pelo incentivo de iniciar na carreira científica, através do auxílio financeiro concedido para que se concretizasse a realização deste projeto.

Aos Pós Graduandos e estagiários do laboratório de fisiologia, Ângela, Larissa, Monique, Leandro, Caril, Fernanda, Mayumi, Alexandre (Japa) e a todos do departamento pelos bons momentos de convivência e por estarem sempre dispostos a ajudar nos momentos de dificuldade.

Em especial,

A Camila Stringheta a quem devo muita gratidão, pois foi imprescindível para a execução deste projeto. Obrigado por, muitas vezes, ter abdicado de seu tempo para me ajudar em meu projeto sem nunca pedir nada em troca e sempre demonstrando alegria, compreensão e sabedoria. Aprendi muito com você como pessoa e como profissional durante a execução deste projeto e devo dizer que terá um futuro brilhante pela frente por sua incansável dedicação.

e

A Samuel Moraes pela grande amizade e harmoniosa convivência, sempre demonstrando vontade em ajudar desde o momento em que cheguei ao laboratório. Obrigado pelo suporte e apoio durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos Funcionários e Professores do departamento de ciências básicas pela convivência e suporte.

*A*os companheiros de república **Luis Felipe Pupim** e **Salmo Cortiglio** pela convivência durante três anos, contribuindo, de alguma forma, para a realização deste projeto.

Em especial,

A **Matheus Brasilino**, que demonstrou ser um grande amigo, sendo de suma importância durante esta jornada e concretização deste projeto.

*A*os grandes amigos que fiz em Araçatuba durante a graduação, **André H. Oliva** e **Luiz da Silveira Neto**, pois a amizade de vocês foi importante durante esta jornada. Obrigado pela convivência e suporte que contribuíram de forma relevante para a concretização deste projeto.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto, meu muito obrigado!

“O tempo é um tecido invisível em que se pode bordar tudo.”

Machado de Assis.

Momesso, G.A.C. **Ação do ácido zoledrônico e terapia estrogênica na regeneração óssea alveolar de ratas senis**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Resumo

Bifosfonatos, análogos de pirofosfonatos endógenos, são fármacos utilizados no tratamento de várias doenças ósseas metabólicas, como a osteoporose. A osteonecrose da mandíbula é complicação emergente da terapia com bifosfonatos e está associada com morbidade significativa. A hipótese deste estudo é que a reposição hormonal com estradiol em ratas senis (18 a 20 meses) acíclicas pudesse atenuar o desenvolvimento da osteonecrose de mandíbula depois de 8 semanas de tratamento com Ácido Zoledrônico e exodontia do primeiro molar inferior dos animais, sendo o objetivo avaliar a atuação do ZOL no processo de regeneração óssea alveolar de ratas Wistar senis submetidas ou não a terapia estrogênica. Foram realizadas análises bioquímicas para a verificação da concentração plasmática de fósforo, fosfatase alcalina; análise histológica e imunoistoquímica para avaliar o processo de reparo alveolar dos animais após 28 dias à extração do elemento dentário, através das lâminas histológicas e marcação das proteínas TRAP/RANKL/OPG. Os resultados obtidos em relação à dosagem plasmática evidenciou que não houve diferença significativa na concentração plasmática de cálcio e fósforo entre os grupos experimentais. Entretanto, a atividade enzimática da fosfatase alcalina foi menor no grupo de animais E2/NaCl. Os resultados referentes à análise histológica mostraram que os grupos OM/ZOL e E2/ZOL apresentaram osteonecrose com reparo alveolar deficiente e que o E2 não conseguiu amenizar a situação. Já os grupos OM/NaCl e E2/NaCl apresentaram boa neoformação óssea e reepitelização da mucosa alveolar, apresentando vitalidade óssea, diferentemente dos grupos tratados com Ácido Zoledrônico. Os resultados relacionados à marcação imunoistoquímica evidenciaram que no grupo OM/NaCl houve equilíbrio na marcação das

proteínas e que no grupo OM/ZOL houve supressão na marcação destas. Já os grupos que receberam estradiol (E_2 /ZOL e E_2 /NaCl) apresentaram aumento na expressão de OPG. Conclui-se que o ZOL é um potente antirreabsortivo e que mesmo com a concentração plasmática de estradiol satisfatória, é capaz de levar ao desenvolvimento de osteoncrose em organismos senis.

Palavras-chave: Ácido Zoledrônico, reparo alveolar, estrógeno, envelhecimento.

Momesso, G.A.C. **Zoledronic acid action and estrogen therapy on senile rats wound healing**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Abstract

Bisphosphonates, pyrophosphates endogenous analogs are drugs used to treat various metabolic bone diseases such as osteoporosis. Osteonecrosis of the jaw is emerging complication of bisphosphonate therapy and is associated with significant morbidity. Our hypothesis is that hormone replacement therapy with estradiol on acyclic senile rats (18-20 months) could attenuate the development of osteonecrosis of the jaw after 8 weeks of treatment with zoledronic acid and extraction of the lower first molar of animals with the aim to evaluate the performance of ZOL in the alveolar bone regeneration in Wistar rats submitted or not senile estrogen therapy process. Biochemical analyzes to verify the plasma concentration of phosphorus, alkaline phosphatase were performed; histology and immunohistochemistry to evaluate the process of alveolar repair of animals 28 days after the extraction of the tooth through the histological slides and marking of TRAP / RANKL / OPG protein analysis. The results obtained in relation to plasma level showed no significant difference in the plasma concentration of calcium and phosphorus between the experimental groups. However, the enzymatic activity of alkaline phosphatase was lower in the group of animals E2 / NaCl. The results of the histological analysis showed that the OM / ZOL and E2 / ZOL groups exhibited osteonecrosis with impaired alveolar repair and that E2 failed to ease the situation. Already OM / NaCl and E2 / NaCl groups exhibited good bone formation and epithelialization of the alveolar mucosa, presenting bone vitality, unlike the groups treated with zoledronic acid. The results related to the immunohistochemical staining showed that the OM / NaCl group there was a balance in marking proteins and that the OM / ZOL group, there was suppression in marking these. Already groups receiving estradiol (E2 / ZOL and E2 / NaCl) exhibited an increase in expression of OPG. We conclude that ZOL is a potent anti-resorptive and that

even with the plasma concentration of estradiol satisfactory, can lead to the development of osteoncrose in senile organisms.

Keywords: Zoledronic acid, wound healing, estrogen, aging.

Lista de figuras

- Figura 1** – Coleta de esfregaço vaginal----- 19
- Figura 2** – Procedimento de implante de pellets (17β – estradiol).----- 20
- Figura 3** – Procedimento cirúrgico de exodontia do primeiro molar inferior.----- 22
- Figura 4** – Gráficos referentes às concentrações plasmáticas de Cálcio, fósforo e fosfatase alcalina.----- 26
- Figura 5** – Cortes histológicos (H.E) referentes ao grupo experimental OM/NaCl. (Anexo I)
- Figura 6** – Cortes histológicos (H.E) referentes ao grupo experimental E_2 /NaCl. (Anexo I)
- Figura 7** – Cortes histológicos (H.E) referentes ao grupo experimental E_2 /ZOL. (Anexo I)
- Figura 8** – Cortes histológicos (H.E) referentes ao grupo experimental OM/ZOL. (Anexo I)
- Figura 9** – Cortes histológicos para análise imunoistoquímica.----- 29

Lista de Abreviaturas

BP's = Bifosfonatos
°C = Celsius
µL = microlitro
µg – Microgramas
E₂ = Estrógeno
ANOVA = Análise de Variância
C = Carbono
Cat.= catalogo
DAB = 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina
dL = Decilitro
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
EPM = Erro Padrão de Média
GL = Grau Gay Lussec
h = horas
HRP = peroxidase da raiz forte
i.m.= intramuscular
i.p. intraperitoneal
Kg = Kilograma
L = litro
M = Molar
mg = Miligrama
mL = Mililitro
mm = Milímetro
mmol = Milimol
MEC = Matriz extracelular
N^o = Número
nm = Nanômetro
NaCl = Cloreto de Sódio
O = Oxigênio
OMAB = Osteonecrose de mandíbula associada ao uso de bifosfonatos
OM = óleo de milho
OPG = Osteoprotegerina
P = Fosfato
PBS = Tampão fosfato salino
p.c.= peso corporal
pH = Potencial hidrogeniônico
p-nitrofenil = para-nitrofenil
p-nitrofenilfosfato = para-nitrofenilfosfato
R = Cadeia lateral
RANK = Receptor do fator ativador nuclear kappa-B
RANKL = Receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante
RPM = Rotação por Minuto
U/L = Unidade por Litro
ZOL = Ácido Zoledrônico

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Hipótese.....	18
3. Objetivo.....	18
4. Metodologia.....	18
5. Resultados.....	25
6. Discussão.....	29
7. Referências.....	34
8. Anexo I.....	39
9. Anexo II.....	41

Introdução

O processo de envelhecimento da população é cada vez mais frequente em todo o mundo. No Brasil, o número de idosos (60 anos de idade) em 2002 foi de 14 milhões e a estimativa para 2020 é que este índice alcançará 32 milhões (Lima-Costa, 2003). Entretanto, o aumento na longevidade não tem garantido bom estado de saúde, já que o número de doenças crônico-degenerativas nesta população tem sido mais frequente. Sabe-se que o envelhecimento possibilita maior desenvolvimento de condições patológicas no organismo do indivíduo, sendo o tecido ósseo um dos que mais são acometidos neste processo.

O tecido ósseo não é estático e requer contínua remodelação para que mantenha equilíbrio saudável e realize suas funções adequadamente, tais como suporte e regulação da homeostase mineral (LERNER, 2006). Este processo de remodelação óssea é modulado por citocinas, interleucinas, bem como pela concentração plasmática de estradiol. Quando algum destes moduladores encontra-se defasado há prejuízo no *turnover* ósseo. Observa-se esta condição quando há déficit na concentração plasmática de estradiol, acarretando no desenvolvimento de osteopenia e osteoporose.

Os bifosfonatos (BPs) são fármacos análogos sintéticos estáveis do pirofosfato inorgânico no qual o átomo central de oxigênio da ligação P-O-P é substituído por um átomo central de carbono (P-C-P), o que acarreta melhor solubilidade em água, além de proporcionar ao medicamento maior resistência à hidrólise química e enzimática (ZAVRAS, 2011). Apresenta afinidade alta pela hidroxiapatita devido ligação ao carbono central, tornando o BP estrutura ácida, altamente carregada, que se liga facilmente ao cálcio. Os pirofosfatos são encontrados naturalmente no corpo humano e fazem parte do mecanismo de regulação da calcificação e reabsorção óssea (MIGLIORATI *et al.*, 2006).

Bifosfonatos contendo nitrogênio (N-BPs) são administrados por via intravenosa em pacientes com doenças esqueléticas, tais como, câncer metastático, doença de Paget, osteopenia e osteoporose (BLACK *et al.*, 2007). Os N-BPs suprimem potencialmente a atividade dos osteoclastos, que são as células responsáveis pela reabsorção óssea, reduzindo a ocorrência de

doenças relacionadas que acometem o tecido ósseo, tal como fraturas ósseas, e dores em pacientes com doenças malignas do osso (COSTA; MAJOR, 2009,).

Estes fármacos são separados por gerações e sua classificação depende da estrutura química e potência. A propriedade anti-reabsortiva dos BPs aumenta dez vezes a cada geração. O BP que foi utilizado neste estudo, o ácido zoledrônico (ZOL), pertence ao grupo da terceira geração que apresenta a potência mais alta em doenças metastáticas, em relação aos outros BPs, pois o nitrogênio está contido dentro do anel heterocíclico (RUGGIERO, 2009). Ainda, segundo este autor, o ZOL foi aprovado nos EUA, pelo *Federal and Drug Administration* com o nome comercial de Zometa (Novartis), em 2002. Considerada linha de última geração, o Zometa é aplicado por via endovenosa, uma vez ao mês, em dose de 4 mg/Kg por período de 15 minutos.

Após a administração do ZOL via intravenosa, devido a sua alta afinidade pela hidroxiapatita do osso, ele é rapidamente retirado da circulação sistêmica e local, aderindo-se a superfície óssea, particularmente nos sítios de atividade osteoclástica (RUGANI et al., 2010). Atua inibindo a farnesil difosfato sintase, enzima chave na via do mevalonato. Esta enzima é o principal alvo desses medicamentos na inibição de osteoclastos. Além disso, o ZOL é altamente eficaz em reduzir os marcadores bioquímicos da remodelação óssea como o C-telopeptídeo e fosfatase alcalina (LEWIECKI, 2010).

A meia-vida plasmática destes fármacos é curta, sendo de 30 minutos a 2 horas, no entanto, depois de absorvida, a droga pode permanecer por mais de 10 anos no tecido ósseo, porém, à medida que vai sendo depositada camada nova de tecido ósseo sobre as camadas contendo BP, a atividade sobre os osteoclastos diminui, caso o uso do fármaco seja diminuído (MARX et al., 2005).

Embora os BPs apresentem efeitos positivos inibindo a reabsorção óssea, em pacientes osteoporóticos, a supressão excessiva do *turnover* ósseo pode levar a micro danos. Por este motivo, a maior preocupação clínica em relação a isso tem sido o comprometimento da qualidade óssea normal, por excesso de repressão da reparação óssea. Pelo fato dessas drogas se

acumularem no esqueleto, o uso contínuo e em longo prazo, pode causar alguns danos como a necrose avascular (MCCLUNG, 2003). Além disso, são relatados outros efeitos adversos do fármaco, como a hipofosfatemia, hipocalemia, hipocalcemia, febre, calafrios, mialgia e artralgia. Mas o efeito adverso de maior destaque que tem sido motivo de preocupação é a osteonecrose de mandíbula associada ao uso de bifosfonatos (OMAB). Consiste em área de tecido ósseo exposto, não havendo como causa a radioterapia. A área exposta pode se apresentar assintomático ou tornar-se infectada. Tem como principais sintomas o aparecimento de dor, inchaço, parestesia, supuração, ulceração de tecidos moles adjacentes, mobilidade dos dentes ao redor, e até mesmo, em alguns casos, perda de parte da mandíbula (HAMDY, 2010). Os primeiros relatos desta enfermidade surgiram de pacientes que utilizavam BPs para o tratamento de doenças ósseas metastáticas. Alguns casos podem estar associados ao uso de BPs orais, como o Alendronato, muito utilizado nos casos de osteoporose e osteopenia (SCULLY et al., 2006). Os fatores de risco para o desenvolvimento da OMAB podem ser modulados pela natureza da droga, fatores locais e sistêmicos. A potência do BPs e a duração do tratamento são diretamente proporcionais ao aparecimento da doença. Pacientes que fazem uso do fármaco e são submetidos a algum tratamento odontológico, como exodontia, adquirem risco sete vezes maior de contraírem a osteonecrose de mandíbula. Além destes fatores, algumas infecções como as periodontais, periapicais e pericoronais também são fator de risco, bem como, o uso de próteses mal adaptadas, tabaco, álcool e a higiene oral deficiente (*American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2007). A etiologia desta doença ainda é desconhecida, no entanto, parecem ser decorrentes da complexa interação do metabolismo ósseo, trauma local, infecção, hipovascularização e o uso de BPs. Os pacientes que utilizam os BPs pela via parenteral parecem estar mais susceptíveis a doença, do que aqueles que fazem o uso oral da droga. Outros fatores que podem estar relacionados ao aparecimento da osteonecrose mandibular, são as desordens sistêmicas, como a diabetes mellitus, imunossupressão e o uso de medicamentos concomitantes ao BP, como corticosteróides e agentes quimioterápicos (*American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2007).

Hipótese

Considerando que em organismos femininos senis a concentração plasmática de estradiol é menor favorecendo a atividade osteoclástica, hipotetizamos que a terapia hormonal com estradiol poderia modular a atuação do ZOL após intervenção cirúrgica oral.

Objetivo

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atuação do ZOL no processo de regeneração óssea alveolar de ratas Wistar senis submetidas ou não a terapia estrogênica.

Metodologia

Animais:

Todos os procedimentos utilizados para realização deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista, UNESP, de acordo com o processo 02150-2012 (Anexo II). Durante a realização deste estudo foram utilizadas 40 ratas da linhagem Wistar (18 meses), mantidas em gaiolas coletivas (4 animais/caixa) em ambiente com temperatura em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de luz controlada (12/12 h) e acesso livre à água e ração. Os animais foram distribuídos (8-10 animais por grupo experimental) aleatoriamente nos 4 grupos experimentais apresentados na tabela abaixo:

N ^o / Grupos	Grupo Experimental	Idade inicial (meses)	Terapia (duração/dias)	Exodontia (dia)	Eutanásia	
					Dias/tratamento	Idade/Rata
1	OM + NaCl	16	90	72°	90 ⁰	18
2	OM + ZOL	16	90	72°	90°	18
3	E ₂ + NaCl	16	90	72 ⁰	90 ⁰	18
4	E ₂ + ZOL	16	90	72°	90 ⁰	18

OM= Óleo de milho
E₂= 17 β-estradiol

Ciclo estral:

O esfregaço vaginal dos animais foi colhido para verificação do ciclo estral, por volta das 9h da manhã, segundo a técnica de Long & Evans (1922) e analisado a fresco ao microscópio óptico, durante 15 dias. Foram selecionadas apenas as ratas que estavam em diestro persistente para constituírem os grupos experimentais.



Figura 1 - Coleta do esfregaço vaginal

Pellets:

Após o ciclo estral, as ratas foram submetidas a cirurgias para o implante de pellets contendo óleo de milho (OM) (grupos 1 e 2) ou 17 β-estradiol (300 µg/mês - grupos 3 e 4) (Fig. 2A), sendo realizadas três trocas, com substituições a cada 30 dias. As cirurgias foram realizadas sob anestesia geral com cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge/50 mg/Kg p.c., i.p.) e xilazina (Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.), na qual foi realizada incisão na região dorsal da rata (Fig. 2B) e implantado o pellet (Fig.

2C). Após a cirurgia, todos os animais experimentais receberam dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, 0,2 mL/animal, i.m.). Foi realizado análise do esfregaço vaginal para acompanhamento da fase do ciclo estral.

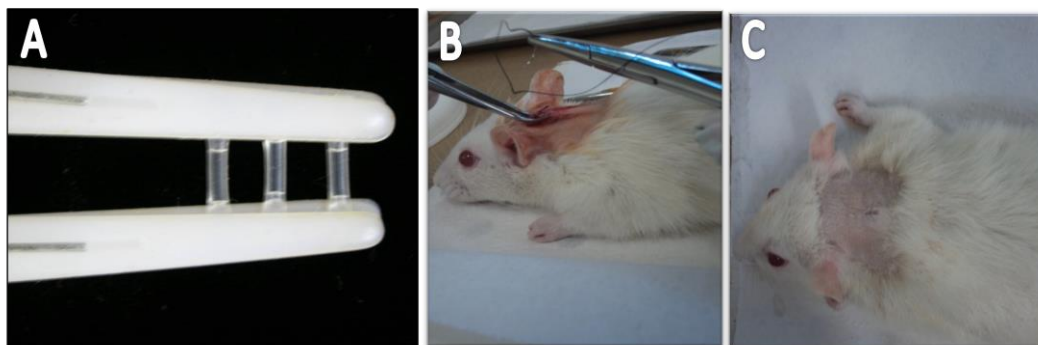


Figura 2: Pellets contendo óleo de milho ou 17β -estradiol (300 $\mu\text{g}/\text{mês}$): (A) Preparo pellets. (B) Procedimento cirúrgico para implantação de pellets. (C) Pellet implantado e sutura pós-operatória.

Tratamento:

Em humanos, 4 mg de ZOL são administrados mensalmente por infusão intravenosa. Considerando peso humano médio de 60 Kg, a dose de ZOL utilizada é de 0,067 mg/Kg, ou seja, 67 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Em função do metabolismo do rato ser mais alto (rápido) que o metabolismo humano, administramos 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ZOL três vezes por semana via intraperitoneal (IP). Este protocolo para o ZOL tem sido utilizado em outros estudos com ratos (ÇANKAYAET al. 2013; BASI et al., 2011; SENEL et al., 2010a; SENEL et al., 2010b). O tratamento com ZOL ou NaCl (0,15 M) nos animais, foi iniciado faltando sete semanas para a eutanásia. Na 4^o aplicação do ZOL a extração do primeiro molar inferior foi realizada, para a criação de defeito com 4 mm de diâmetro. Os animais foram sacrificados sete semanas após o início do tratamento e no 90^o dia, após o implante do primeiro *pellet*, de acordo com o esquema a seguir.



Exodontia:

Foi realizado treinamento da exodontia (grupo piloto) devido à dificuldade (fraturas, sangramento, acesso restrito, visualização) para a execução da cirurgia, utilizando dispositivo próprio para exodontia de molar de ratas, do laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP-FOA (Fig. 3A).

Após o treinamento, foi realizada a extração do 1º molar inferior das ratas (Fig. 3B, C e D) na 4ª semana após o início do tratamento com NaCl ou ZOL, sob efeito de anestesia geral com xilazina/quetamina, para análise posterior do processo de reparo alveolar de 28 dias. Imediatamente após a exodontia, as bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de seda 4-0 (Johnson e Johnson) e os animais receberam dose única de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, Wyeth, São Bernardo do Campo, SP, Brasil – 0,2 mL/rato/i.m.). Alimentação dos animais foi pastosa durante as primeiras 48 horas após as intervenções cirúrgicas e retornando à normalidade após este período.

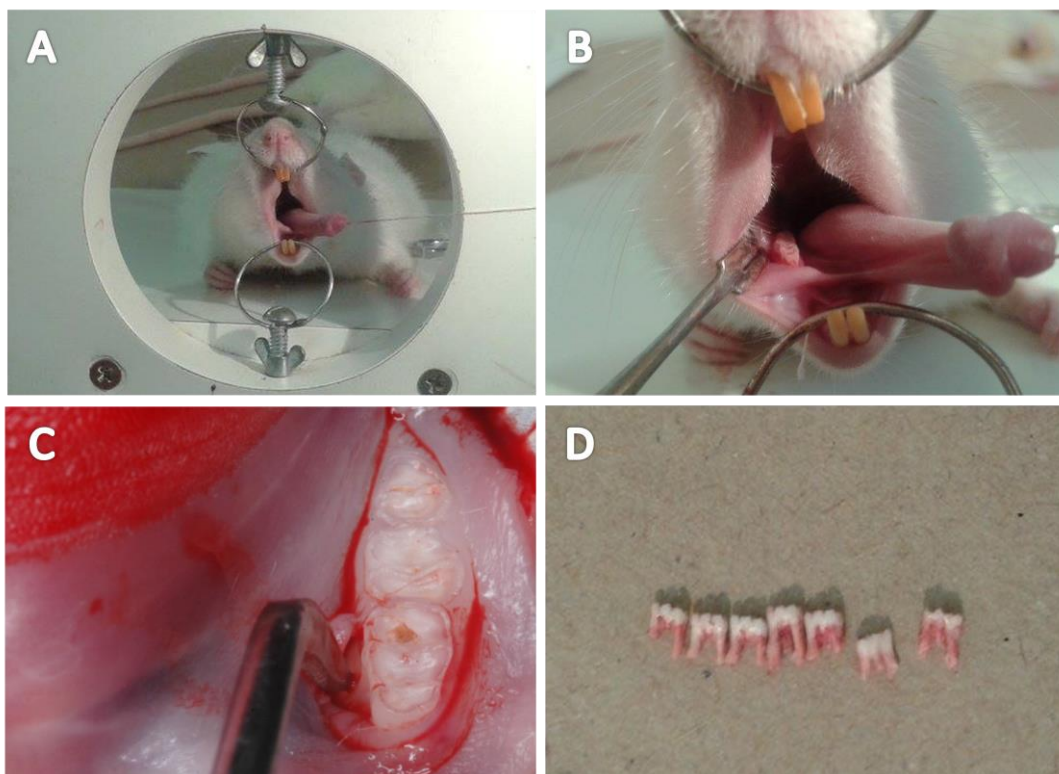


Figura 3: Procedimento de exodontia do 1° molar inferior dos animais. (A) Preparação do animal para realização do procedimento cirúrgico em dispositivo específico. (B) Visualização do 1° molar inferior do animal. (C) Realização da sindesmotomia. (D) Elementos dentários dos animais extraídos.

Coleta de Material:

Após sete semanas de tratamento, os animais foram anestesiados (xilazina/quetamina) para coleta sanguínea, de acordo com técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). As amostras de sangue foram colhidas e submetidas à centrifugação a 2500 rpm, por 15 minutos na temperatura de 2°C. O plasma e o soro foram fracionados em alíquotas e estocado em freezer -20°C e -80°C respectivamente, até o momento das determinações dos marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo. Em seguida, os animais foram sacrificados por dose excessiva de anestésico e realizada a separação das mandíbulas direita da esquerda. Obtemos, então, a peça com o alvéolo, após cortes com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares. As peças foram fixadas em formalina tamponada (10%), durante 72 horas, em temperatura ambiente. Após este período, as peças foram lavadas em água corrente por 12 horas e em seguida descalcificadas em EDTA 10%, durante aproximadamente 2 meses. Após descalcificadas e prontas para serem feitos

os cortes para as lâminas, as peças foram lavadas em água corrente, por 12 horas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina pelo método de rotina, com o cuidado de orientá-las de forma a permitir cortes dos alvéolos, no sentido vestibulo-lingual e paralelamente ao seu longo eixo.

Análises bioquímicas:

Foram realizadas análises bioquímicas do plasma dos animais experimentais para verificação da atividade celular do metabolismo ósseo (cálcio, fósforo e fosfatase alcalina) de acordo com o protocolo abaixo:

Cálcio: as determinações foram realizadas através de método espectrofotométrico (Kit marca Labtest/cat. 90). O cálcio reagiu com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando complexode cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm (Espectrofotômetro Hitachi U 1100). Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

Fósforo: as dosagens foram realizadas através do método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972) modificado, utilizando kit comercial (marca Labtest/Cat. 12). O fósforo inorgânico reagiu com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação do complexo fosfomolibdato não reduzido, determinado em 340 nm (Espectrofotômetro Hitachi U1100). Os resultados foram expressos em mg/dL⁻¹.

Fosfatase alcalina: a atividade enzimática (U/L) foi verificada através de método cinético, utilizando como substrato p-nitrofenilfosfato de sódio na concentração de 100 mmol/L⁻¹, em pH 9,8. A velocidade de formação do produto p-nitrofenil foi acompanhada através da determinação da absorbância em 405 nm. Todo o procedimento experimental foi realizado segundo o protocolo fornecido pela empresa Labtest, fabricante do kit, tendo sido utilizados 20 µL de plasma como amostra biológica.

Análise Histológica:

Nos blocos obtidos, foram efetuados cortes semi-seriados, com 6 micrômetros de espessura, os quais foram corados com hematoxilina e eosina para proceder à análise histológica. Os cortes foram analisados em microscópio óptico (Microscópio trinocular Leica DM 4000B).

Análise imunohistoquímica:

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. No final de cada etapa da reação imunohistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em três lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-RANKL do rato gerado em cabra (SC-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-OPG do rato gerado em cabra (SC-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Para a contracoloração empregou-se a hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por investigador que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. Para RANKL e OPG a imunomarcação foi definida como coloração acastanhada confinada ao compartimento citossólico das células imunorreativas e na matriz extracelular. Em cada animal foram analisadas seis secções histológicas do terço médio do alvéolo dental com aumento de 400x. Efetuou-se análise semi-

quantitativa e o critério para o estabelecimento dos escores foi baseado em Garcia e colaboradores (2013) e Theodoro e colaboradores (2014): ESCORE 0: padrão de imunomarcção nulo (ausência total de células-imunorreativas (IR) por campo microscópico e ausência de marcação na matriz extracelular (MEC); ESCORE 1: baixo padrão de imunomarcção (1/4 das células-IR por campo microscópico e fraca marcação na MEC); ESCORE 2: moderado padrão de imunomarcção (\square 1/2 das células-IR por campo microscópico e moderada marcação na MEC); ESCORE 3: alto padrão de imunomarcção (\square 3/4 das células-IR por campo microscópico e moderada marcação na MEC). Para TRAP a imunomarcção foi definida como coloração acastanhada presente exclusivamente ao citossol das células imunorreativas. Foram quantificadas apenas as células multinucleadas TRAP-positivas. Em cada animal foi analisada uma secção histológica do terço médio do alvéolo dental com aumento de 250x. Efetuou-se análise semi-quantitativa onde a quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas foram distribuídas nos seguintes escores: ESCORE 0: padrão de imunomarcção nulo (ausência total de células-IR por campo microscópico); ESCORE 1: baixo padrão de imunomarcção (até 4 células-IR por campo microscópico); ESCORE 2: moderado padrão de imunomarcção (entre 5 e 8 células-IR por campo microscópico); ESCORE 3: alto padrão de imunomarcção (mais de 8 células-IR por campo microscópico).

Análise Estatística:

Utilizamos as médias \pm EPM (erro padrão da média) para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$ para todas comparações.

Resultados

Análise Bioquímica

Os resultados obtidos na determinação das concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina dos grupos experimentais realizados estão representados graficamente pela média e EPM (\pm) na figura 4.

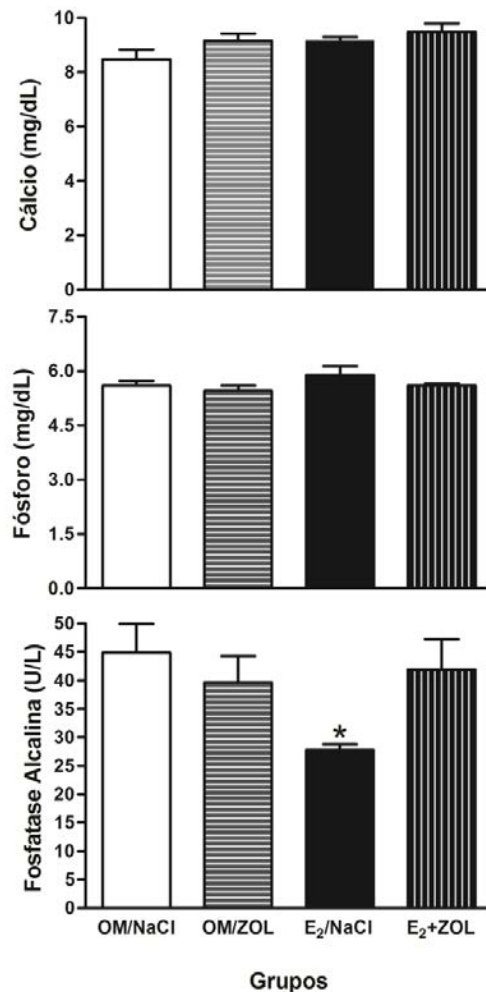


Figura 4: Concentração plasmática de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina de ratas com ou sem reposição hormonal e que receberam NaCl (0,2mL - grupo OM/NaCl; grupo E₂/NaCl.) ou ácido zoledrônico (0,2 mL, diluído em solução salina – grupo OM/ZOL; grupo E₂/ZOL). *P<0,05 vs OM/NaCl.

A concentração plasmática de cálcio observada na análise, não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados com ZOL ou com NaCl. A análise da concentração plasmática de fósforo nos mostrou que também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Entretanto, a análise da fosfatase alcalina, evidenciou que o grupo que recebeu terapia hormonal com E₂, apresentou atividade enzimática menor em relação aos outros grupos experimentais, sendo estatisticamente significativa quando comparado com o grupo de animais OM/NaCl (Fig. 4).

Análise histológica:

Grupo OM/NaCl

Os alvéolos dentais estão recobertos por tecido epitelial associado a tecido conjuntivo rico em fibroblastos, com moderada quantidade de fibras colágenas, vasos sanguíneos e células inflamatórias. A ferida cirúrgica esta parcialmente preenchida por trabéculas ósseas neoformadas, entremeadas por tecido conjuntivo rico em fibroblastos e fibras colágenas, intensamente vascularizado e com pequena quantidade de células inflamatórias esparsamente distribuídas (Fig. 5)

Grupo E₂/NaCl

A ferida cirúrgica apresentava características histológicas similares ao grupo OM/NaCl, no entanto, o osso neoformado ocupava parte maior dos alvéolos e se apresentava sob a forma de trabéculas mais espessas que delimitavam pequenos espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo intensamente vascularizado, rico em fibroblastos e com raras células inflamatórias (Fig.6).

Grupos OM/ZOL e E₂/ZOL

As características histológicas destes grupos foram muito similares. A maior parte das ratas tratadas com ZOL apresentou áreas de osso necrótico nas adjacências do alvéolo dental. A quantidade de trabéculas ósseas no interior dos alvéolos foi muito menor em comparação com os grupos OM/NaCl e E₂/NaCl. Não houve restituição da membrana mucosa na superfície dos alvéolos dentais. Intenso infiltrado inflamatório, composto predominantemente por linfócitos, ocupava grande parte da ferida cirúrgica. No interior do alvéolo e em parte do tecido ósseo não vital havia presença de grandes colônias microbianas (Fig.7 e 8).

Análise imunohistoquímica:

As análises da imunomarcção para RANKL e OPG evidenciou expresso predominantemente em osteoblastos e matriz extracelular. A marcao para TRAP foi expressa predominantemente em osteoclastos multinucleados.

Nos grupos OM/NaCl e E2/NaCl foi verificado que a quase totalidade dos osteoclastos se mostravam ativos, entretanto, nos grupos OM/ZOL e E2/ZOL a maioria dos osteoclastos se mostravam arredondados, com ausncia de polarizao nuclear e distantes da matriz ossea, ou seja, exibindo caractersticas de inatividade.

Os resultados obtidos nas anlises das imunomarcções para TRAP, RANKL e OPG, so:

TRAP: no grupo OM/NaCl prevaleceu moderado padro de imunomarcção (score 2) e nos demais grupos experimentais (OM/ZOL; E2/NaCl; E2/ZOL) prevaleceu baixo padro de imunomarcção (score 1).

RANKL: foi verificado que no grupo OM/NaCl prevaleceu padro de imunomarcção que variou do baixo ao moderado (score 1 – score 2) e nos grupos OM/ZOL, E2/NaCl e E2/ZOL prevaleceu baixo padro de imunomarcção (score 1).

OPG: nos grupos OM/NaCl, E2/NaCl e E2/ZOL prevaleceu moderado padro de imunomarcção (score 2) e no grupo OM/ZOL prevaleceu padro de imunomarcção que variou do baixo ao moderado (score 1 – score 2).

A tabela abaixo apresenta a sntese desses resultados:

	OM/NaCl	OM/ZOL	E2/NaCl	E2/ZOL
TRAP	score 2	score 1	score 1	score 1
RANKL	score 1-2	score 1	score 1	score 1
OPG	score 2	score 1– 2	score 2	score 2

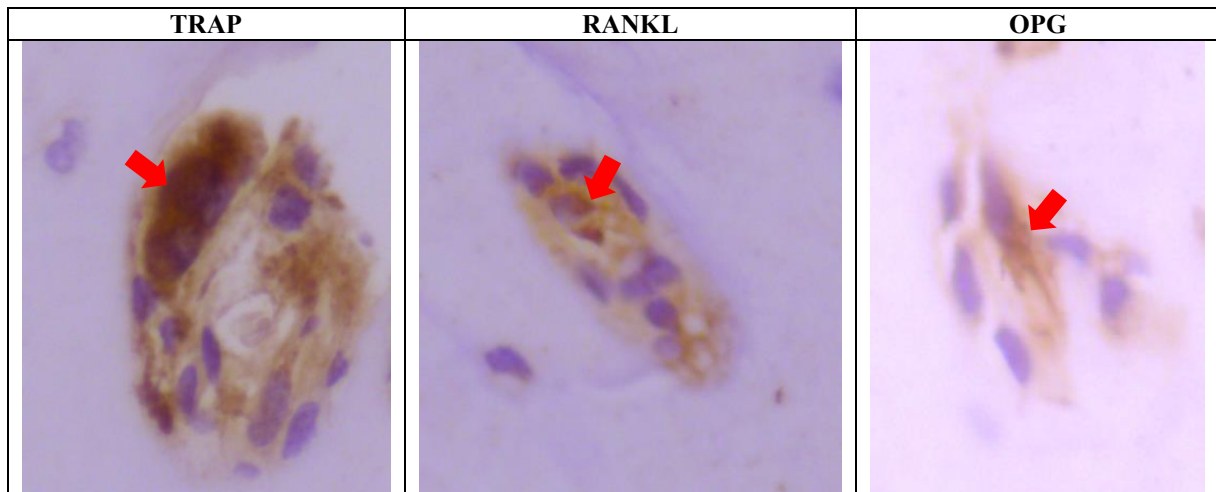


Figura 9: Fotomicrografia das imagens obtidas através da análise imunohistoquímica cotendo marcações para as proteínas TRAP/RANKL/OPG. (A) Marcação da proteína TRAP evidenciando a expressão de osteoclasto multinucleado. (B) Marcação da proteína RANKL evidenciando a expressão de osteoblasto. (C) Marcação da proteína OPG evidenciando a expressão de osteoblasto.

Discussão

Os resultados obtidos sugerem que a terapia hormonal com o estradiol não atenuou a ocorrência de áreas necróticas nos locais de extração dentária em organismos senis tratados com ácido zoledrônico. Embora a associação no uso de bifosfanatos e osteonecrose de mandíbula tenha sido demonstrada em outros estudos (SENEL et al., 2010; BARBA-RECREO et al., 2013; LOBATO et al., 2008; CARLSON et al., 2009) tanto em humanos quanto em roedores, o mecanismo exato que leva a esta condição permanece mal definido (SENEL et al., 2010). O uso de bifosfanato em roedores fêmeas de 2 a 3 meses demonstra que é capaz de causar inflamação, principalmente ao redor da raiz do dente, mesmo em condição onde não há injúria, o que não ocorre em outros locais, como o fêmur, por exemplo, mostrando que a região já é propícia para a ocorrência de infiltrado inflamatório durante o uso desta medicação (SENEL et al., 2010).

Estudo realizado em nosso laboratório revelou que a diminuição significativa na concentração plasmática de estradiol, em organismos adultos (ratas com 06 meses), potencializou a ação do ZOL (WAYAMA, 2011).

Mediante estes resultados, elaboramos este estudo para analisarmos se em animais mais velhos, com aciclicidade estral e no período de diestro persistente (esse modelo animal corresponde à fase de perimenopausa em mulheres) a terapia hormonal com estradiol poderia atenuar as áreas de osteonecrose mandibular. Entretanto, as análises realizadas até o momento, evidenciaram que o estradiol não desencadeou alteração significativa no processo de reparo alveolar após 28 dias da extração do 1º molar inferior de ratas de 18 meses que receberam ácido zoledrônico durante oito semanas via intraperitoneal (IP), três vezes por semana.

Através da análise histológica, podemos evidenciar que os animais que foram submetidos à terapia com ZOL apresentaram reparo alveolar deficiente, com escassa neoformação óssea, bem como áreas ósseas necróticas e intensa contaminação bacteriana. Estudo de Barba-Recreo e colaboradores (2013) mostrou que ratos de 2 meses de idade tratados com ZOL, via IP, durante 9 semanas e submetidos à extração dos molares superiores apresentaram osteonecrose avascular, diferentemente dos animais que receberam tratamento com solução salina. Em nosso estudo, verificamos que os grupos de ratas senis que receberam injeção de solução salina apresentaram neoformação óssea satisfatória, além de reepitelização da mucosa alveolar.

Sabe-se que durante a menopausa, as concentrações de estradiol diminuem para aproximadamente 10 a 15% do que era encontrado na perimenopausa, isso implica em alterações no ciclo de remodelamento ósseo, levando a desequilíbrio onde a reabsorção excede a formação óssea, causando déficit de tecido ósseo e assim osteopenia. Em organismos estrogenizados há diminuição da gênese de osteoclastos, por este composto atuar diminuindo as concentrações plasmáticas de IL-1 e TNF- α (PACIFICI et al., 1989; PACIFICI, 1996), que por sua vez estimulam a produção de citocinas como IL-6 e M-CSF. O estrógeno atua induzindo a síntese de matriz óssea (CHOW, LEAN e CHAMBERS, 1992), além promover a liberação de fatores, como TGF- β , que atuam sobre os osteoclastos (OURSLER et al., 1991), inibindo a reabsorção óssea e estimulando a morte dos osteoclastos (HUGHES et al., 1996).

Estudos relatam atraso no reparo alveolar em ratas ovariectomizadas submetidas à extração dentária quando comparado com o reparo alveolar em animais sham-ovariectomizados (LUVIZUTO et al., 2010a; 2010b; 2011). Este fato nos evidencia que a deficiência de estrógeno tende a prejudicar a neoformação óssea após o procedimento cirúrgico (PEREIRA et al., 2007; EJIRI et al., 2006; TANAKA et al., 2000). Em nosso estudo, realizamos terapia hormonal com 17 β -estradiol (300 μ g/mês) durante três meses, com substituição a cada 30 dias em ratas de 16 a 18 meses que apresentavam ciclo estral em diestro persistente, no período de periostropausa (GORE et al., 2000). Os resultados referentes às lâminas histológicas nos mostraram que não houve diferença significativa no reparo alveolar dos animais do grupo OM e E₂ que não receberam ZOL, no que diz respeito à qualidade do tecido ósseo formado. No entanto, quando analisamos a fosfatase alcalina (Fig. 2), notamos que a atividade enzimática no grupo que recebeu a terapia com E₂ e solução salina, foi significativamente menor, evidenciando que o pico de atividade desta enzima ocorreu antes, mostrando, então, que a neoformação óssea foi mais rápida, comparada ao grupo de ratas senis que não recebeu terapia hormonal com E₂ (OM/NaCl).

Em relação ao grupo tratado com o ZOL e que recebeu terapia hormonal com E₂, contradizendo nossa hipótese, observamos que a modulação do E₂ no tecido ósseo não foi suficiente para cessar ou sequer diminuir o aparecimento de osteonecrose. Podemos notar nas imagens histológicas (Fig. 7 e 8) características bem parecidas com o grupo que foi tratado com ZOL e não recebeu terapia hormonal, como tecido ósseo sem vitalidade, contaminação por bactérias e deficiência na neoformação óssea. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que o metabolismo ósseo de ratas com 18 meses apresenta-se alterado comparado a animais jovens, mesmo que ovariectomizados, sendo que o ZOL é droga potente da terceira geração da família dos N-BP's, que possui efeito devastador no reparo de feridas cirúrgicas, principalmente no organismo de animais senis, no qual nem o E₂ exerceu efeito modulador.

A osteoprotegerina (OPG) e seu ligante RANKL, são considerados peças-chave na regulação do metabolismo ósseo (LACEY et al., 1998; SIMONET et al., 1997). O RANKL é citocina produzida por osteoblastos que quando ligada ao seu receptor RANK, presente nos osteoclastos, tem a

propriedade de estimular a atividade destas células e inibir a sua apoptose. Este efeito pode ser atenuado na presença de OPG que é expresso por muitos tecidos e células, incluindo os osteoblastos (HOFBAUER et al., 2000).

Em nosso estudo, realizamos a imunomarcagem para as proteínas OPG, RANKL e TRAP como método complementar no intuito de melhor compreensão para os resultados relacionados ao efeito do ZOL no reparo alveolar.

Sugere-se que o sistema RANK/RANKL/OPG pode estar envolvido na patogênese da OMAB, porém ainda não se sabe exatamente sobre a veracidade desta afirmação, necessitando de mais estudos sobre o assunto (ÇANKAYA et al, 2013).

Tem sido demonstrado que com o envelhecimento do organismo há aumento nos níveis de OPG sérico, sendo que há predileção pelo organismo feminino, talvez porque enquanto a testosterona causa queda nos níveis de OPG, o estrógeno provoca o seu aumento (KUDLACEK et al., 2003; KHOSLA et al., 2002a; KHOSLA et al., 2002b). Estudo de Eghbali-Fatourehchi e colaboradores (2003), mostraram que em mulheres que se encontram na pós-menopausa há aumento na expressão de RANKL encontrada nas células estromais da medula óssea quando comparadas à pré-menopausa. Sugere-se, ainda, que o estrógeno pode regular a expressão de RANKL em células estromais da medula óssea de mulheres na pós-menopausa que realizam reposição hormonal, não avaliando se o efeito causado pelo estrógeno é direto ou indireto.

Em contrapartida, Viereck e colaboradores (2002) notaram que pacientes com osteoporose tratados com Pamidronato oral ou ZOL apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de OPG. Além disso, estudo clínico (Fernandez et al., 2010) realizado com pacientes com mieloma múltiplo têm observado que a utilização de bifosfonatos causa diminuição na expressão de RANKL em células estromais da medula óssea, como avaliado por Martini e colaboradores (2007) em ensaio clínico realizado em pacientes portadores de Doença de Paget, após 30 dias de tratamento com Pamidronato intravenoso.

Çankaya e colaboradores (2013) realizaram estudo em ratas que foram submetidas a tratamento com ZOL ou solução fisiológica (10 semanas) e verificaram aumento na expressão de RANKL associado ao aumento da

expressão OPG na tíbia dos animais que receberam ZOL. Porém, verificaram diminuição na expressão de RANKL quando analisada a mandíbula destes animais, denotando predileção do mecanismo do medicamento pelo tecido mandibular.

Condições patológicas no tecido ósseo, como Mieloma Múltiplo e doença de Paget, e o hipoestrogenismo em mulheres com osteoporose pós-menopáusicas apresentam alteração no sistema RANK/RANKL/OPG. Essas alterações favorecem atividade osteoclástica e os bifosfonatos, como o ZOL, utilizados no tratamento destas desordens esqueléticas podem interferir neste sistema de forma a atenuar a intensa reabsorção óssea através da diminuição da expressão da proteína RANKL e aumento da expressão de OPG em mandíbulas de ratas, como descrito por Çankaya e colaboradores (2013).

No entanto, quando analisamos o tratamento de ratas com hipoestrogenismo natural (18 a 20 meses), com terapia com ZOL durante oito semanas associada à criação de ferida cirúrgica observamos diminuição na expressão tanto de RANKL, como de OPG. Esse resultado evidencia o efeito citotóxico potente do fármaco no tecido ósseo, suprimindo de forma bastante considerável o *turnover* ósseo, propiciando o desenvolvimento de OMAB, como observado no grupo OM/ZOL, ao contrário do que observamos no grupo OM/NaCl, no qual há equilíbrio na imunomarcacão tanto de OPG como RANKL. Nos grupos em que foi realizada a terapia com reposição hormonal, houve diminuição na imunomarcacão de RANKL, porém com moderada marcacão de OPG, tanto no grupo que foi tratado com ZOL (E2/ZOL) como no que recebeu soluçao fisiológica (E2/NaCl), evidenciando o efeito do E2 no aumento da expressao de OPG. Quando associamos este resultado ao histológico, observamos que apesar da reposição hormonal indicar melhora no reparo alveolar com o aumento da imunomarcacão de OPG, que este não foi suficiente para evitar o desenvolvimento de OMAB. Esse resultado sugere que a supressão excessiva de RANKL por tanto tempo, devido ao longo período em que o ZOL permanece no tecido ósseo pode ser o causador da OMAB e que o organismo senil está mais susceptível a esta condição.

Além disso, relatos clínicos mostram que a idade tem demonstrado ser fator de risco importante no aparecimento da OMAB em pacientes com desordens esqueléticas tratados com bifosfonatos (ZOL, Alendronato,

Pamidronato), cuja média de idade é de 73,8 anos com predileção para o sexo feminino de 2:1 e que 87% dos casos estão relacionados à extração dentária durante o tratamento com o fármaco (COSSÍO et al., 2008; LESCLIOUS et al., 2009). Brados e colaboradores (2009) ainda afirmam que, a cada década de vida, o risco de desenvolver OMAB aumenta em 9%. Deste modo, pode-se suspeitar que a idade dos animais foi fator que potencializou o efeito da osteonecrose, sendo que a terapia hormonal não foi suficiente para que houvesse diferença na neoformação óssea.

Deste modo, pode-se concluir que o Ácido Zoledrônico, usado no tratamento de metástases ósseas, osteoporose, doença de paget e hipercalcemia, possui efeito antirreabsortivo potente, capaz de alterar o reparo alveolar após a criação de ferida cirúrgica no tecido ósseo, causando osteonecrose mandibular e que esse efeito pode ser potencializado pela idade do indivíduo, independentemente da concentração plasmática de E₂. Sendo assim, deve-se considerar o período de desenvolvimento do organismo e evitar que se realize procedimento cirúrgico na cavidade oral, expondo tecido ósseo, principalmente durante o tratamento com ZOL.

Referências

American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(3):369-76.

Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid - Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(6):744-50.

Basi DL, Hughes PJ, Thumbigere-Math V, Sabino M, Mariash A, Lunos SA, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of Zoledronic acid-treated rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(11):2698-707.

Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356(18):1809–22.

Brados A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, et al. . Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):945-52.

Çankaya M, Cizmeci Şenel F, Kadioglu Duman M, Muci E, Dayisoğlu EH, Balaban F. The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(9):1134-9.

Carlson ER, Basile JD. The role of surgical resection in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):85-95.

Catalano A, Morabito N, Basile G, Brancatelli S, Cucinotta D, Lasco A. Zoledronic acid acutely increases sclerostin serum levels in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5):1911-5.

Chow JW, Lean JM, Chambers TJ. 17 beta-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology*. 1992;130(5):3025-32.

Cossío PI, Macián AC, Ceballos JLP, Nicas JP, Pérez JLG. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13(1):e52-5.

Costa L, Major PP. Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. *Nat ClinPractOncol*. 2009;6(3):163–74.

Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1221-30.

Ejiri S, Toyooka E, Tanaka M, Anwar RB, Kohno S. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. *Arch Oral Biol*. 2006;51(11):941–50.

Fernández M, Pino AM, Fiqueroa P, Rodríguez JP. The increased expression of receptor activator of nuclear-κB ligand (RANKL) of multiple myeloma bone marrow stromal cells is inhibited by the bisphosphonate ibandronate. *J Cell Biochem*. 2010;111(1):130-7.

Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, 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*. 2013

Gore AC, Oung T, Yung S, Flagg RA, Woller MJ. Neuroendocrine mechanisms for reproductive senescence in the female rat: gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine*. 2000;13(3):315-23.

Hamdy RC. Zoledronic acid: clinical utility and patient considerations in osteoporosis and low bone mass. *Drug Des Devel Ther*. 2010;4:321-35.

Harms, P. G.; Ojeda, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. A. P.*, v. 36, p. 391-392, 1974.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000;15(1):2-12.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med*. 1996;2(10):1132-6.

Khosla S, Arrighi HM, Melton III LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan C, et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int*. 2002;13(5):394-9.

Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O'Fallon WM. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1550-4.

Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R, Austrian Study Group on Normative Values of Bone Metabolism. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone*. 2003;32(6):681-6.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.

LeFevre J, McClintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988;38(4):780-9.

Lerner, Ulf H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research* 85.7 (2006): 584-595.

Lewiecki EM. Intravenous zoledronic acid for the treatment of osteoporosis: the evidence of this therapeutic effect. *Core Evid*. 2009;4:13-23.

Lima-Costa MF; Veras R. Saúde pública e envelhecimento. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(3):700-701,2003.

Lobato JV, Mauricio AC, Rodrigues JM, Cavaleiro MV, Cortez PP, Xavier L, et al. Jaw avascular osteonecrosis after treatment of multiple myeloma with zoledronate. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008;61(1):99-106.

Luvizuto ER, Dias SMD, Okamoto T, Dornelles RCM, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):984-90.

Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia JR IR, Okamoto R, et al. Osteocalcinimmunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone.* 2010;46(4):1021-9.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SMD, Okamoto T, Dornelles RCM, Garcia Junior IR, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010;55(1):52-9.

Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, et al. Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone.* 2007;40(2):457-63.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1567-75.

McClung MR. Bisphosphonates. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003;32(1):253-71.

Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo S. O tratamento de pacientes com osteonecrose associada aos bisfosfonatos: uma tomada de posição da Academia Americana de Medicina Oral. *J Am Dent Assoc.* 2006; 6(3):5-16.

Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BJ, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(15):6613-7.

Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, Peck WA. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(7):2398-402.

Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996;11(8):1043-51.

Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2248–53.

Rugani P, Acham S, Truschneqq A, Obermayer-Pitsch B, Jakse N. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: surgical treatment with ErCrYSGG-laser: case report. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(6):e1-6.

Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): initial discovery and subsequent development. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(5):13-8.

Scully C, Madrid C, Bagan J. Dental endosseous implants in patients on bisphosphonate therapy. *Implant Dent.* 2006;15(3):212-8.

Senel FC, Kadioglu Duman M, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):385-91.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309–19.

Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. Region-specific bone mass changes in rat mandibular condyle following ovariectomy. *J Dent Res.* 2000;79(11):1907–13.

Theodoro, L. H., Caiado, R. C., Longo, M., Novaes, V. C. N., Zanini, N. A., Ervolino, E et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers in medical science.* 2014; 1-10.

Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(3):680–6.

Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. *J Periodontol.* 2007;78(3):584-94.

Wayama MT. Ácido zoledrônico e a regeneração alveolar em ratas [trabalho de conclusão de curso]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2011.

Zavras AI. The impact of bisphosphonates on oral health: lessons from the past and opportunities for the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1218:55–61.

Anexo I

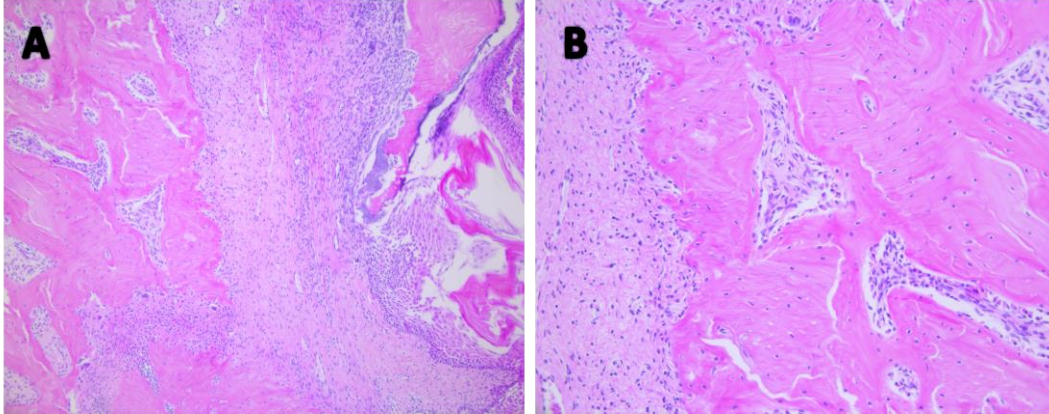


Figura 5: Imagens histológicas (HE) dos alvéolos dentais referentes ao grupo OM/NaCl: (A) Imagem histológica no aumento de 10x referente ao alvéolo submetido à exodontia, evidenciando neoformação óssea satisfatória. (B) Imagem de maior aumento (20x), na qual podemos observar vitalidade do osso neoformado evidenciado pelas lacunas da matriz óssea preenchidas por osteócitos, além de boa vascularização tecidual.

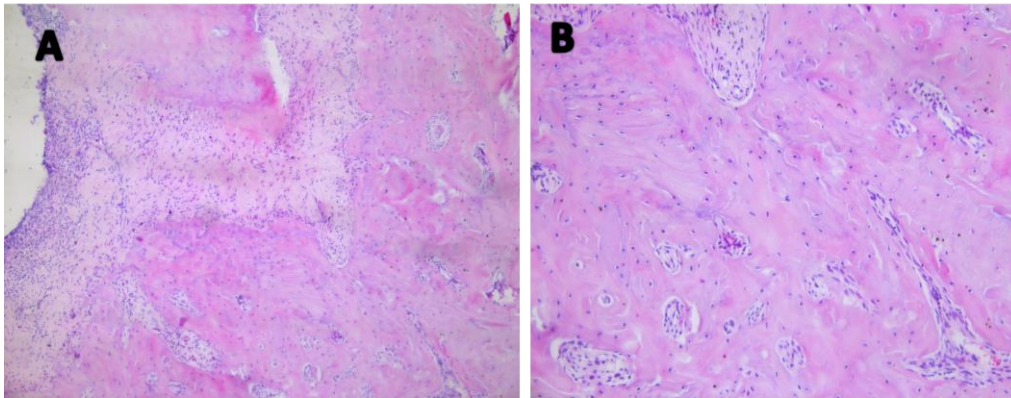


Figura 6: Imagens histológicas (HE) dos alvéolos dentais referentes ao grupo E₂/NaCl: (A) Imagem histológica no aumento de 10x, referente ao alvéolo dental submetido à exodontia, em que observamos neoformação óssea satisfatória com vitalidade óssea. (B) Imagem de maior aumento (20x), evidenciando a vitalidade do osso neoformado caracterizado pela boa vascularização tecidual e lacunas da matriz óssea preenchida por osteócitos.

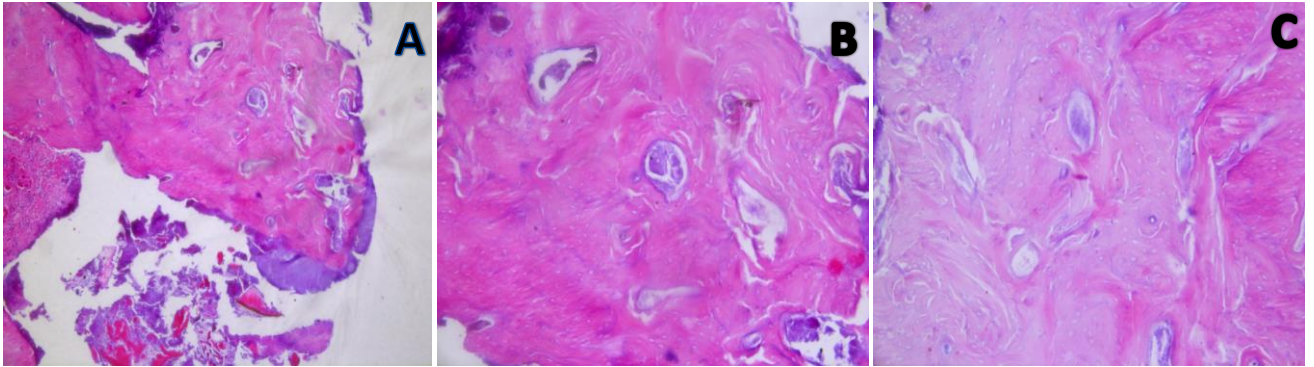


Figura 7: Imagens histológicas (HE) dos alvéolos dentais referentes ao grupo E₂/ZOL: (A) Imagem histológica no aumento de 10x, na qual podemos observar neoformação óssea deficiente, contaminação bacteriana e osso necrótico. (B) e (C) Imagens histológicas no aumento de 20x em que observamos osso necrótico e sem vitalidade evidenciada pela ausência de osteócitos nas lacunas da matriz óssea, bem como ausência de vascularização.

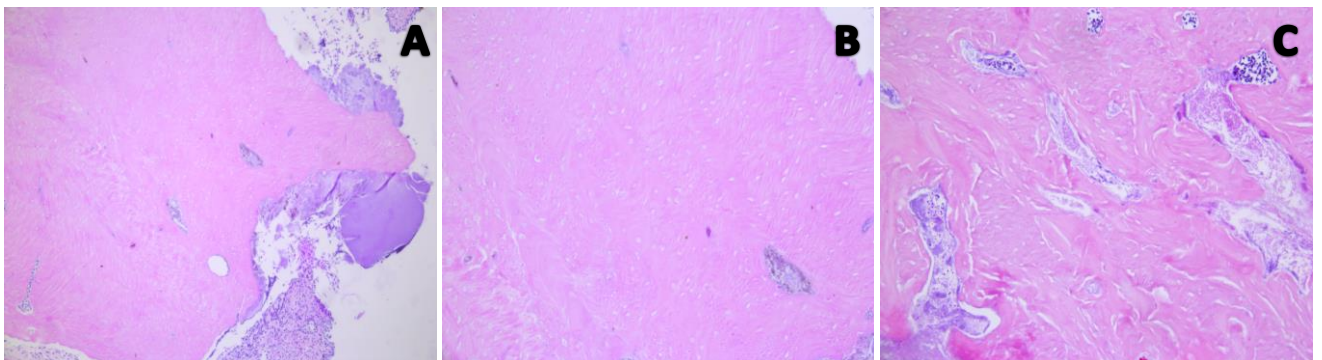


Figura 8: Imagens histológicas (HE) dos alvéolos dentais referentes ao grupo OM/ZOL: (A) Imagem histológica no aumento de 10x, na qual observamos alvéolo com preenchimento ósseo deficiente, contaminação bacteriana e presença de osso necrótico. (B) e (C) Imagens histológicas em aumento de 20x em que observamos osteonecrose por bisfosfonatos, evidenciada pela presença de osso sem vitalidade com lacunas ósseas sem preenchimento celular e ausência de vascularização.

Anexo II



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Ação do ácido zoledrônico e terapia estrogênica na regeneração óssea alveolar de ratas senis"** sob responsabilidade da Pesquisadora **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** e colaboração de Gustavo Antonio Correa Momesso está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **02150-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research **"Acting of zoledronic acid and strogen therapy on alveolar wound healing in aging rats"**, process number **02150-2012**, under responsibility of **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** and with collaboration of Gustavo Antonio Correa Momesso agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Fabiano A. Cadioli", written in a cursive style.

Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator