



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LESLIE CRISTINE FIORI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM  
ALENDRONATO, A LONGO PRAZO, SOBRE A  
REPARAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO EM DEFEITOS DE  
CALVÁRIAS. ESTUDO EM RATAS**

Araraquara

2016



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LESLIE CRISTINE FIORI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM  
ALENDRONATO, A LONGO PRAZO, SOBRE A  
REPARAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO EM DEFEITOS DE  
CALVÁRIAS. ESTUDO EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para o título de Mestre em Odontologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

**Co-Orientadoras:** Prof. Dra. Ana Paula de Souza Faloni

Dra. Marina Montosa Belluci

Araraquara

2016

Fiori, Leslie Cristine

Avaliação do efeito do tratamento com alendronato, a longo prazo, sobre a reparação do tecido ósseo em defeitos de calvárias. Estudo em ratas / Leslie Cristine Fiori.-- Araraquara: [s.n.], 2016.  
107f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Faloni

1. Remodelação óssea 2. Crânio 3. Alendronato I. Título

LESLIE CRISTINE FIORI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM  
ALENDRONATO, A LONGO PRAZO, SOBRE A REPARAÇÃO DO  
TECIDO ÓSSEO EM DEFEITOS DE CALVÁRIAS. ESTUDO EM  
RATAS**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

2º Examinador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

3º Examinador: Prof. Dr. Roberta Okamoto

Araraquara, 31 de agosto de 2016

*DADOS CURRICULARES*

**LESLIE CRISTINE FIORI**

**NASCIMENTO**

22 de Junho de 1990, Porto Velho/RO

**FILIAÇÃO**

Marília Lima Pimentel Cotinguiba

Luis Eduardo Fiori

**2008/2012**

Curso de Graduação em Odontologia pela  
Faculdade de Odontologia de Araraquara –  
UNESP

**2014/2016**

Curso de Pós-Graduação em Odontologia,  
área de concentração em Periodontia, nível  
de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia  
de Araraquara – UNESP

**2015/2016**

Especialização em Periodontia pela  
Faculdade de Odontologia de Araquara –  
FOAr - UNESP.

# DEDICATÓRIA

## **Dedico esse trabalho:**

Aos meus pais, Marília e Luis, à minha avó Adir e ao meu avô Messias (*in memoriam*) que são os meus maiores incentivadores e principais responsáveis por eu ter tido possibilidade de abraçar todas as maravilhosas oportunidades que a vida colocou em meu caminho. Sem vocês, a realização desse trabalho jamais seria possível!

Ao meu grande amor, amigo e parceiro de caminhada, meu marido João, que me apoia incondicionalmente e me incentiva e motiva sempre, e que não me deixou desistir nos momentos de decepção e desânimo que vivi durante a realização desse trabalho!

Aos meus irmãos Leonardo, Andrey, Victória e Giovanna, e às irmãs de coração Laura e Flora, por serem sempre tão compreensivos e por aceitarem todas as vezes em que foi necessário fazer sacrifícios em prol da minha formação acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me proporcionar uma família maravilhosa e me proporcionar vivenciar oportunidades únicas em minha vida, e principalmente por jamais me abandonar nos meus momentos de pouca fé.

Agradeço de forma muito especial aos meus primos Messias, Lourayne e Michely, aos sogros João e Marta e cunhados Lidiane e Leonardo, que também estiveram comigo e me apoiaram durante a realização dessa etapa em minha vida!

Agradeço imensamente à minha querida orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, por me acolher desde o meu 4º ano de faculdade por me confiar a grande responsabilidade de realizar esse trabalho. Agradeço por toda a paciência, dedicação e por todos os ensinamentos que tive a oportunidade de adquirir ao longo de quase 5 anos em quem estivemos trabalhando juntas, que foram muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal!

Agradeço carinhosamente à minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula de Souza Faloni, que encarou a tarefa (nada fácil) de me auxiliar nesse trabalho e que nunca mediu esforços para me ajudar, que sempre me encorajou e incentivou e me fez enxergar uma capacidade e força que nem eu sabia que tinha. Você foi uma das mais gratas surpresas que a minha passagem de quase 10 anos por Araraquara me proporcionou, como sempre digo a você, e que apareceu em minha vida no momento que mais precisei, e que se tornou mais que uma co-orientadora, uma amiga!

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Marina Montosa Belluci, por toda ajuda e contribuição a esse trabalho! Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e experiência comigo.

Aos meus grandes amigos Bruno e Ulyanna, por me apoiarem, me incentivarem e por entenderem meus vários momentos de ausência durante essa jornada!

Agradeço com muito carinho as minhas queridas amigas de pós-graduação Sâmara, Mariana e Sabrina, que me ajudaram muito ao longo de todos esses anos de convivência. Vocês são muito especiais e foram muito importantes para mim ao longo desse período!

Aos queridos colegas de pós-graduação Mário, Sâmia, Luana, Jonleno, Kahena, Romerito, Dayane, Mayara, Luis Carlos, Maurício, Andressa, Suzane, Fernanda Florian e Jackeline pela convivência sempre agradável em aula, laboratório ou biotério da FOAr!

Aos professores de Periodontia da FOAr, Prof. Dr. José Eduardo Sampaio, Pro. Dr. Joni Cirelli, Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Marcantonio, Prof. Dr. Carlos Rossa, Prof<sup>a</sup> Dra. Daniela Zandim e Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior pela convivência agradável e pelos valiosos ensinamentos fundamentais para minha formação profissional.

Aos queridos funcionários do departamento de Diagnóstico e Cirurgia da FOAr Claudinha, Leandro, Isabela e Zezé pela ajuda e contribuição que sempre me proporcionaram durante essa minha jornada e pelo companheirismo e ótima convivência diária nos laboratórios e clínicas!

A disponibilidade dos membros titulares da banca Prof. Dr. José Eduardo, Prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Okamoto, e aos suplentes Prof. Dr. Joni Cirelli e Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Emília, e pela contribuição prestada a esse trabalho!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e institucional, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de nível superior (CAPES).

***“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”***

**José de Alencar**

Fiori LC. Avaliação do efeito do tratamento com alendronato, a longo prazo, sobre a reparação do tecido ósseo em defeitos de calvárias. Estudo em ratas [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

## RESUMO

Os bifosfonatos têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças relacionadas a distúrbios no metabolismo ósseo. Dentre os bifosfonatos mais potentes, o alendronato (ALD), possui grande potencial em inibir a reabsorção óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, o efeito da administração de alendronato, a longo prazo, na reparação óssea em defeitos críticos confeccionados em calvárias de ratas. Para isto, 160 ratas foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos que receberam, semanalmente, injeções subcutâneas de placebo [grupo controle (CTL)] e de alendronato [grupo alendronato (ALD)]. Após 120 dias do início do tratamento, foi confeccionado um defeito crítico na calvária de todos os animais e 10 animais de cada grupo foram sacrificados aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 dias após a confecção do defeito. No dia do sacrifício foram coletadas amostras de urina e sangue e foram removidas as calvárias e os fêmures dos animais. Os fêmures foram avaliados quanto à densidade mineral óssea (BMD). Para a avaliação sistêmica do efeito do medicamento no metabolismo ósseo, foram investigados os níveis urinários de deoxipiridinolina (DPD) e os níveis séricos de propeptídeo amino terminal do procólágeno tipo I (P1NP), de telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX) e de osteocalcina por ensaio imunoenzimático (ELISA). Seções de calvárias submetidas ao processamento para inclusão em parafina foram empregados para: 1) imuno-histoquímica para detecção de RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear  $\kappa$ B), osteoprotegerina (OPG), Cathepsina K, RUNX2 (fator de transcrição 2 relacionado ao Runt), Osteopontina (OPN), iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF); 2) coloração com Tricrômico de Goldner para análise da quantidade de tecido mineralizado e de matriz osteóide e fechamento do defeito; 3) avaliação da quantidade de osteoclastos TRAP+ (localização de células positivas para a enzima fosfatase ácida tartarato resistente-positivos) e 4) análise morfológica do tecido ósseo. Foram encontrados maiores valores de BMD para os animais no ALD em relação ao CTL. As concentrações de CTX e DPD foram maiores no grupo ALD, enquanto as concentrações de P1NP e osteocalcina foram menores no grupo ALD. Na análise imuno-histoquímica, verificou-se maiores expressões de cathepsina K no ALD até os 15 dias, com inversão a partir dos 20 dias. A OPN apresentou menor imunomarcagem nos períodos iniciais no ALD, havendo uma inversão aos 45 e 60 dias. O VEGF apresentou expressão significativamente maior no ALD aos 45 dias. O grupo ALD apresentou menor imunopositividade para o iNOS em todos os períodos, com diferença estatística até os 25 dias, enquanto o RUNX2 apresentou valores significativamente menores no ALD até os 20 dias e aos 60 dias em relação ao CTL. O ALD apresentou menor expressão de RANKL e maior expressão de OPG, em relação ao CTL. Observou-se diminuição da quantidade de células TRAP+ ao longo dos períodos no CTL e ALD. Verificou-se menor quantidade de matriz osteóide no ALD. Aos 45 e 60 dias, no ALD, a distância entre as bordas do defeito foi menor em relação aos períodos iniciais. Na análise morfológica, observou-se um relativo atraso na remodelação óssea no ALD. Os resultados em conjunto, sugerem que o ALD pode ter um efeito prejudicial no processo de reparo de defeitos críticos em calvárias de ratas, a longo prazo.

**Palavras-chave:** Remodelação óssea. Crânio. Alendronato

Fiori LC. Long-term evaluation of the alendronate treatment effect on bone repair in calvarial defects. A rat study [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

## ABSTRACT

The bisphosphonates have been widely used for the treatment of diseases related to osseous metabolism disturbances. Among the most powerful bisphosphonates, the alendronate (ALD) presents great potential to inhibit the osseous reabsorption. This aim of this study was to evaluate, *in vivo*, the effect of the administration of alendronate in the long run, in bone repair in critic defects produced in rats' calvarias. For so, 160 rats were randomly distributed into 2 groups which received, weekly, placebo subcutaneous injections [control group (CTL)] as well as alendronate injections [alendronate group (ALD)]. After 120 days from the beginning of treatment, a critic defect was produced in all animals and 10 animals from each group were sacrificed at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 days after the defect production. On the day of sacrifice, urine and blood samples were collected and the calvarias and femurs were removed. The femurs were evaluated as for their bone mineral density (BMD). For the systemic evaluation of the medicine effect over the bone metabolism, the deoxypyridinoline urinary levels were investigated (DPD) as well as the serum levels of amino-terminal procollagen propetide of type 1 (P1NP), of carboxy-terminal telopeptide of collagen type I (CTX) and of osteocalcin by means of enzyme-linked immunosorbent essay (ELISA). Parts of calvarias undergone processing for inclusion in paraffin were employed to: 1) immuno-histochemistry for detection of RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand), osteoprotegerin (OPG), Cathepsin K, RUNX2 (transcription factor 2 related to Runt), Osteopontin (OPN), iNOS (inducible nitric oxide synthase) and Vascular Endothelial Growing Factor (VEGF); 2) coloration with Goldner's Trichrome for analyzing the quantity of mineralized tissue and of osteoid matrix and defect closing; 3) evaluation of quantity of osteoclasts TRAP+ (positive cells localization for the acid phosphatase enzyme positive-resistant tartrate) and 4) morphologic analysis of the osseous tissue. Higher values of BMD were found for the animals in the ALD in relation to CTL. The concentration of CTX and DPD were higher in group ALD, while the concentration of P1NP and osteocalcin were smaller in group ALD. In the immuno-histochemical analysis, it was verified higher expressions of cathepsin K in ALD until the 15<sup>th</sup> day, with inversion starting from the 20<sup>th</sup> day. The OPN presented smaller immunolabeling in the initial periods in the ALD, and there was an inversion on the 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days. The VEGF, presented expression meaningfully higher in the ALD on the 45<sup>th</sup> day. The group ALD presented lesser immunopositivity for the iNOS in all the periods, with difference estatistical till the 25<sup>th</sup> day, while the RUNX2 presented values meaningfully smaller in the ALD till the 20<sup>th</sup> day and 60<sup>th</sup> day in relation to CTL. The ALD presented smaller expression of RANKL and higher expression of OPG, in relation to CTL. It was observed reduction of quantity of TRAP+ cells along the periods in the CTL and ALD. It was verified smaller quantity of osteoid matrix in the ALD. On the 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days, in the ALD, the distance between the borders of the defect was smaller in relation to initial periods. In the morphological analysis, it was observed a relative delay in the bone remodeling in the ALD. The results, as a whole, suggest that the ALD may present a damning effect in the repair processing of critic defects in rats' calvarias, in the long term.

**Keywords:** Bone remodeling. Skull. Alendronate

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALD: alendronato

AppCL2P: análogo não hidrolisável do ATP

Apppl: adenosina metil-trifosfato

ATP: adenosina tri-fosfato

BFs: bifosfonatos

CTL: controle

CTX: telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I

DPD: Deoxipiridinolina

FPPS: farnesil difosfato sintase

GGPP: geranylgeraniol difosfato

GTPases: proteínas ligantes ao GTP

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IPP: isopentil pirofosfato

N: átomo de nitrogênio

OH: grupo hidroxila

OCN: osteocalcina

OPG: osteoprotegerina

OPN: osteopontina

P-C-P: núcleo químico fosfato-carbono-fosfato

P-O-P: núcleo químico fosfato-oxigênio-fosfato

P1NP: telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I

RANK: receptor de ativação do fator nuclear  $\kappa\beta$

RANKL: ligante do receptor de ativação do fator nuclear  $\kappa\beta$

RUNX2: fator de transcrição 2 relacionado ao Runt

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

ZOL: zoledronato

## SUMÁRIO

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>            | <b>13</b>  |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b> | <b>17</b>  |
| <b>3 OBJETIVO.....</b>              | <b>31</b>  |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODO.....</b>     | <b>32</b>  |
| <b>5 RESULTADO.....</b>             | <b>42</b>  |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>             | <b>78</b>  |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>             | <b>88</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>             | <b>89</b>  |
| <b>ANEXO.....</b>                   | <b>107</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado dinâmico que é constantemente reabsorvido e neoformado de acordo com eventos fisiológicos<sup>124, 129</sup>. Esse processo, no qual o osso antigo é constantemente substituído por osso novo, é chamado de remodelação óssea, sendo esse evento regulado por uma variedade de mecanismos bioquímicos e mecânicos e caracterizado pelas ações coordenadas de osteoclastos e osteoblastos<sup>55</sup>. Os ciclos de remodelação óssea dependem de múltiplas linhas de comunicação de células de linhagem osteoclástica e osteoblástica em seus vários estágios, e através dessa complexa via, o osso é capaz de responder adequadamente aos estímulos inflamatórios, mecânicos e hormonais promovendo uma estrutura adequada à função humana<sup>124</sup>. Além disso, o equilíbrio entre formação e reabsorção é responsável também pela manutenção da massa óssea.

Alterações na remodelação óssea estão associadas com algumas doenças como osteoporose, doença de Paget, mieloma múltiplo e metástases ósseas. Diversas drogas têm sido utilizadas para tratamento dessas condições e dentre elas encontram-se os bifosfonatos, empregados ao longo dos últimos 40 anos<sup>111</sup>.

Os bifosfonatos são substâncias análogas ao pirofosfato, mas caracterizados por possuírem em sua cadeia principal um grupo fosfato-carbono-fosfato (P-C-P), que se ligam fortemente à hidroxiapatita e são resistentes à hidrólise<sup>46, 107</sup>. Existem duas classes de BFS, os não nitrogenados e os nitrogenados.

Os BFs nitrogenados (possuem nitrogênio em sua composição) são considerados mais potentes, e diminuem a reabsorção óssea por meio da inibição da enzima farnesil difosfato sintase (FPPS), que é responsável pela ligação de algumas proteínas à membrana celular (prenilação), sendo este um evento importante para as células exercerem suas funções. Em relação aos osteoclastos, a não ocorrência da prenilação reduz sua atividade conduzindo à apoptose<sup>49</sup>.

Dentre os BFs mais potentes está o alendronato, que por seu grande potencial em inibir a reabsorção óssea e aumentar a densidade mineral óssea, é a droga de primeira escolha para tratamento da osteoporose pós-menopausa, uma doença associada à deficiência de

estrogênio. Seu uso está associado também a uma diminuição no risco de fraturas vertebrais em mulheres com osteoporose<sup>14</sup>.

Os BFs, por terem grande afinidade com o tecido ósseo, são incorporados pelos cristais de hidroxiapatita, permanecendo ligados à porção mineral. Durante o processo de reabsorção óssea, o microambiente torna-se ácido fazendo com que o BF se dissocie da superfície mineral óssea e seja fagocitado pelos osteoclastos, levando-os à apoptose<sup>74, 108</sup>.

Outra célula fundamental no processo de remodelação óssea, o osteoblasto, pode sofrer influência dos BFs e podendo, sob certas circunstâncias, atuar no aumento da formação óssea<sup>45</sup>. Estudo, *in vitro*, que avaliou o efeito do ALD sobre a osteoblastogênese, constatou que há um efeito anabólico dessa droga em relação à diferenciação de células-tronco em osteoblastos<sup>40</sup>, enquanto outro estudo demonstrou que os BFs levaram ao aumento do desenvolvimento de osteoblastos a partir de células progenitoras isoladas da medula óssea<sup>75</sup>. Além disso, a aplicação local de ALD, em um modelo de reimplante dental, demonstrou a estimulação da proliferação e diferenciação de osteoblastos<sup>69</sup>. Por outro lado, estudo sugeriu que parte da ação de inibição dos osteoclastos pelos BFs é mediada por osteoblastos<sup>114</sup>. Foi sugerido que o efeito antireabsortivo dos BFs, mediado por osteoblastos, está relacionado à via RANKL/OPG. O ligante do receptor de ativação do fator nuclear  $\kappa B$  (RANKL) representa um fator derivado de osteoblastos essencial para ativação e formação de osteoclastos, enquanto a osteoprotegerina (OPG), também secretada pelos osteoblastos, atua como um antagonista do RANKL, bloqueando seu efeito e agindo na prevenção da reabsorção óssea<sup>97</sup>. O mecanismo de ação pelo qual os BFs atuam nessa via ainda não está bem esclarecido, porém foi demonstrado que com o uso desses medicamentos, há uma diminuição na expressão de mRNA do RANKL, sugerindo assim que a influência dos BFs na osteoclastogênese pode ser parcialmente atribuída a inibição de liberação de fatores de diferenciação de osteoclastos por células estromais ou pelos osteoblastos<sup>77</sup>. Por outro lado, foi observado em um estudo *in vitro* com células humanas osteoblásticas primárias (hOB), que o principal efeito dos bisfosfonatos nesse sistema RANKL/OPG, é atuar no aumento da produção de OPG<sup>136</sup>.

Outro efeito dos BFs que tem sido estudado é sobre a angiogênese. Foi observado, *in vitro*, que a droga leva a uma inibição da função vascular endotelial, por meio da redução da proliferação e indução de apoptose de células endoteliais<sup>47</sup>. Também *in vitro*, foi demonstrado que o ácido zoledrônico inibiu a proliferação de células endoteliais e dos fatores de

crescimento endotelial vascular (VEGF) e fibroblástico básico (bFGF), em cultura de células humanas<sup>139</sup>.

Em função do crescente e amplo uso desses medicamentos, surgiu a necessidade de se observar o efeito dos BFs sobre o tecido ósseo no processo de reparo frente a diferentes procedimentos. Existem controvérsias, por exemplo, quanto ao efeito da droga em sítios de extração em animais. Tem sido demonstrado que os BFs podem ter uma influência negativa sobre o metabolismo ósseo, promovendo um atraso no início do reparo ósseo em sítios de extração em animais submetidos a tratamento com ALD<sup>3, 58</sup>. Por outro lado, estudos demonstraram que a administração em curto prazo não impediu a formação óssea após extração dentária e que a droga tem o potencial de melhorar o preenchimento ósseo nos sítios de extração<sup>128</sup>, além do fato que o ALD parece promover a cicatrização de alvéolos em ratas com deficiência de estrogênio<sup>63</sup>.

Quando o efeito do ALD foi avaliado em relação à osseointegração de implantes, estudos em animais demonstraram que o medicamento foi efetivo no aumento da densidade óssea ao redor dos implantes<sup>51</sup>, na otimização do processo de osseointegração<sup>134</sup>, na manutenção da área de contato osso/implante com padrão semelhante ao controle<sup>37, 135</sup> e no aumento do torque necessário para remoção dos implantes<sup>52, 94</sup>. Porém, apesar do ALD e outros BFS favorecerem a osseointegração de implantes orais, alguns estudos relataram casos de osteonecrose dos maxilares após procedimentos orais invasivos, como extração dentária<sup>61, 82, 86</sup>, e instalação de implantes em pacientes em uso desses medicamentos<sup>2, 71, 72</sup>. O mecanismo pelo qual os BFs podem levar ao processo de osteonecrose ainda não foi completamente esclarecido. Uma das hipóteses é a de que a profunda inibição da função dos osteoclastos pode também provocar a estagnação da remodelação óssea, sendo que microdanos provenientes de injúrias (por exemplo, extração dentária) não poderiam ser reparados, resultando em necrose óssea<sup>110</sup>.

O uso dos bisfosfonatos sobre o processo de ósseo, ainda precisa ser melhor investigado. Um estudo que avaliou o efeito do zoledronato no processo de cicatrização óssea em fíbulas de coelhos constatou que o medicamento não impediu a cicatrização, porém seu efeito foi caracterizado por estimulação da produção de osso primário e provável inibição da remodelação, levando à retenção de osso trabecular<sup>84</sup>. A avaliação in vivo do efeito do YM529, um BF nitrogenado, no reparo de defeito confeccionado em osso cortical, demonstrou que o medicamento pode ter atuado em duas vias: estimulando o

desenvolvimento de células osteogênicas da medula no início da regeneração óssea e uma ação inibitória sobre a diferenciação terminal dos osteoblastos nos períodos finais da remodelação (nesse caso, levando a um atraso na cicatrização do osso lamelar)<sup>91</sup>. Um estudo mais recente demonstrou que a terapia com ALD, tanto local quanto sistêmica, melhorou a formação óssea em modelo de defeito em calvária de ratos, e sugeriu que a inibição da atividade de osteoclastos levou a um aumento na taxa de aposição óssea<sup>130</sup>. Foi constatado ainda, em um modelo de ferida em calvárias de ratos, que o tratamento com etidronato (HEBP) acelera o processo de fechamento da ferida, aumenta a formação de osteoide e tecido mineralizado no compartimento ósseo da ferida, promove a diferenciação de osteoblastos, porém reduz a proliferação e migração de mais células precursoras osteogênicas primitivas<sup>28</sup>.

Porém, como visto, são escassos os estudos que avaliaram mecanismos e células envolvidas no processo de reparo de feridas em relação ao tratamento com alendronato, especificamente.

Considerando-se o fato da crescente utilização dessa classe de medicamentos, entende-se que novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação e efeitos dos BFs no tecido ósseo buscando otimizar o tempo de emprego da medicação bem como minimizar efeitos colaterais sobre esse tecido.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O processo de remodelação óssea permite que o osso tenha a capacidade de autoreparação e de adaptação diante das forças que incidem sobre ele, sendo que em condições fisiológicas há um equilíbrio entre neoformação e reabsorção. Porém, alterações nos parâmetros que regulam esse processo de remodelação resultam em doenças como osteoporose, doença de Paget e osteogênese imperfeita. (Datta et al.<sup>31</sup>, 2008).

A osteoporose é uma doença osteometabólica caracterizada pela diminuição da massa óssea esquelética e pelo aumento da fragilidade óssea, ambos os efeitos resultantes do desequilíbrio entre formação e reabsorção do tecido ósseo. Essa patologia óssea acomete geralmente mulheres na pós-menopausa, em função da diminuição nos níveis de estrogênio. Com a deficiência estrogênica há aumento na taxa de remodelação óssea, porém o desequilíbrio entre formação e reabsorção ocorre pela diminuição do tempo de vida dos osteoblastos e aumento no tempo de vida dos osteoclastos, devido ao atraso na ocorrência de apoptose (Manolagas<sup>78</sup>, 2000). Além disso, há aumento na formação de osteoclastos (Faloni, Cerri<sup>43</sup>, 2007). Por outro lado, a ocorrência da osteoporose também está associada ao aumento em idade dos indivíduos e a fatores de risco como uso de glucocorticóides, tabagismo e alcoolismo (Rachner et al.<sup>104</sup>, 2011; Manolagas, Jilka<sup>79</sup>, 1995; Harada, Rodan<sup>56</sup>, 2003). Sabe-se que com o avanço da idade, há uma diminuição da osteoblastogênese acompanhada de aumento na adipogênese, o que pode explicar a diminuição da formação óssea e a ocorrência de osteopenia associadas ao envelhecimento (Manolagas<sup>78</sup>, 2000). Cerca de 40% das mulheres brancas que se encontram no período pós-menopausa desenvolvem a osteoporose, a qual predispõe ao aumento no risco de fraturas ósseas, principalmente em sítios como coluna vertebral, quadril e pulso. Há estimativas que, com o envelhecimento, a taxa de fraturas na população norte-americana possa chegar a 48% nos próximos 25 anos (O'Connor<sup>96</sup>, 2016; Rachner et al.<sup>104</sup>, 2011; Rosenthal et al.<sup>109</sup>, 2014).

Dentre os principais tipos de tratamentos estabelecidos para a osteoporose, podemos destacar a terapia de reposição hormonal com estrógeno e os bifosfonatos (BFs) (de Villiers et al.<sup>32</sup>, 2013). Atualmente, a terapia com BFs tem sido a primeira escolha no tratamento da osteoporose, pois são drogas que apresentam resultados favoráveis em relação ao aumento na densidade mineral óssea e à redução no risco de fraturas ósseas (Hegde et al.<sup>57</sup>, 2015; Cosman et al.<sup>25</sup>, 2014; Giro et al.<sup>51</sup>, 2008; Black et al.<sup>12</sup>, 2000).

## ***Bifosfonatos***

Os bifosfonatos (BFs) são análogos do ácido pirofosfórico, que é uma substância endógena encontrada no organismo humano na forma de pirofosfato. Essa substância, que pode ser encontrada em fluidos como urina e plasma, tem um papel na regulação do metabolismo ósseo por ter afinidade de ligação aos cristais de hidroxiapatita. Porém, por sofrer rápida hidrólise enzimática, principalmente se administrada por via oral, seu uso como agente terapêutico é restrito (Fernandes et al.<sup>44</sup>, 2005; Papapoulos<sup>98</sup>, 2008; Schibler et al.<sup>118</sup>, 1968).

Portanto, a procura por uma opção terapêutica com função análoga ao pirofosfato, com ação mais prolongada sobre o metabolismo ósseo, levou ao desenvolvimento dos BFs, substâncias que, além de resistirem à hidrólise, têm ação mais potente e possuem maior afinidade de ligação à hidroxiapatita (Papapoulos<sup>98</sup>, 2008; Nancollas et al.<sup>93</sup>, 2005). Além disso, essas drogas apresentam baixa absorção no trato gastrointestinal e são excretadas rapidamente pelos rins. Essas diferenças ocorrem pelo fato dos BFs possuírem em sua cadeia principal um carbono central (P-C-P), ao invés do oxigênio presente no pirofosfato (P-O-P) (Weinerman, Usera<sup>138</sup>, 2015).

Atualmente, os bifosfonatos têm sido utilizados não somente como tratamento para osteoporose, mas também em outras patologias como doença de Paget, mieloma múltiplo (Drake et al.<sup>35</sup>, 2008), prevenção de metástases ósseas (Strobl et al.<sup>126</sup>, 2015) e como adjuvantes a outros tratamentos, nos casos de neoplasias com metástases ósseas (Tolia et al.<sup>132</sup>, 2014). A principal ação desses medicamentos é a inibição da reabsorção óssea agindo, principalmente, sobre o osteoclasto, inibindo sua diferenciação, recrutamento para a superfície óssea e atividade, além de induzir a apoptose dessas células (Rodan, Fleisch<sup>107</sup>, 1996; Xu et al.<sup>140</sup>, 2013). Por outro lado, estudos relataram que os BFs têm efeito também nos osteoblastos e osteócitos (Bellido, Plotkin<sup>9</sup>, 2011; Chaplet et al.<sup>20</sup>, 2004; Komatsu et al.<sup>69</sup>, 2013).

A afinidade de ligação ao tecido ósseo, o mecanismo de ação e a potência desses fármacos variam de acordo com a ligação que ocorre nas cadeias laterais (R1 e R2, respectivamente), que se ligam ao carbono central presente na molécula dos bifosfonatos. Assim, podem-se dividir os BFs em duas classes: nitrogenados e não-nitrogenados (Russell et al.<sup>112</sup>, 1999).

### ***Bifosfonatos não-nitrogenados***

São considerados bifosfonatos pouco potentes, pois não possuem um nitrogênio em seu radical R2. Os BFs pertencentes a essa classe se comportam como análogos dos pirofosfatos inorgânicos e são metabolicamente incorporados como análogos ATP (adenosina tri-fosfato). Esses análogos são não hidrolisáveis, tóxicos e do tipo AppCL2P (análogo não hidrolisável do ATP), sendo que o acúmulo desses metabólitos no meio intracelular interfere no metabolismo do ATP e leva à apoptose dos osteoclastos. Os principais representantes dessa classe são o etidronato e o clodronato (Frith et al.<sup>48</sup>, 1997; Russell<sup>111</sup>, 2011).

### ***Bifosfonatos nitrogenados***

Pertencem à essa classe os BFs mais potentes, possuindo, usualmente, em seu radical R1 um grupo hidroxila (OH) e no radical R2 uma molécula de nitrogênio (N), que pode estar ligada a uma cadeia lateral de múltiplos carbonos ou a um grupo heterocíclico (Das, Crockett<sup>30</sup>, 2013). Essa classe de medicamentos também leva à apoptose de osteoclastos, porém através de mecanismos diferentes aos dos BFs não-nitrogenados. Os BFs nitrogenados inibem a atividade da enzima farnesil difosfato sintase (FPPS), que é uma enzima reguladora da via do mevalonato e conhecida por seu papel na biossíntese do colesterol e outros esteróides (Papapoulos<sup>98</sup>, 2008). Além disso, essa via é responsável pela síntese de proteínas (como farnesil e geranilgeraniol difosfato – GGPP) que são essenciais para a prenilação e correta localização subcelular de proteínas, incluindo pequenas GTPases como Ras, Rab, Rho e Rac, que desempenham um papel central nos processos que regulam a função dos osteoclastos (Drake, Cremers<sup>36</sup>, 2010; Das, Crockett<sup>30</sup>, 2013), como morfologia celular, arranjo do citoesqueleto, regulação do movimento de vesículas citoplasmáticas necessárias para a função osteoclástica e apoptose (Russell<sup>111</sup>, 2011). Em adição, a inibição da FPPS leva a um acúmulo de isopentil pirofosfato (IPP), que resulta na produção de adenosina metil-trifosfato (Apppl) que, por sua vez, induz à apoptose dos osteoclastos (Monkkonen et al.<sup>88</sup>, 2006).

Esses fármacos, por serem mais potentes em relação aos BFs não-nitrogenados, são mais utilizados para tratamento de osteoporose, mieloma, doença de Paget, metástases ósseas e outras doenças que envolvem fragilidade óssea (Giger et al.<sup>49</sup>, 2013). Os principais

representantes dessa classe são o alendronato, ácido zoledrônico (ou zoledronato) e risedronato (Russell<sup>113</sup>, 2008).

### ***Alendronato***

O alendronato (ALD) é um BF nitrogenado potente que possui grande afinidade de ligação à hidroxiapatita e tem sido indicado como terapia de primeira escolha para o tratamento da osteoporose, assim como em outras condições como doença de Paget e osteogênese imperfeita (Russell<sup>113</sup>, 2008). O alendronato é rapidamente adsorvido à superfície óssea e capturado pelos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea, atuando como um inibidor específico da FPPS, considerada a molécula alvo da ação do ALD (Bergstrom et al.<sup>10</sup>, 2000). Essa classe de BF tem sido associada ao aumento da densidade mineral óssea e redução no risco de fraturas, em pacientes portadores de osteoporose (Das, Crockett<sup>30</sup>, 2013). Em avaliação por meta-análise de Cranney et al.<sup>26</sup>, (2002) pôde confirmar que o tratamento com ALD reduz o risco relativo de ocorrência de fraturas vertebrais e não vertebrais, além de demonstrar que o medicamento, em doses de 10mg ou superiores, possui um efeito potente no aumento da densidade mineral óssea em pacientes com tal condição. De acordo com Peters et al.<sup>100</sup> (2001), a FDA (Food and Drug Administration), recomenda as seguintes doses de ALD para tratamento de osteoporose: 1 comprimido de 5mg (1x/dia) ou 1 comprimido de 35mg (1x/semana), para prevenção, e 1 comprimido de 10mg (1x/dia) ou 70mg (1x/semana), para tratamento.

### ***Bifosfonatos x Remodelação óssea***

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado que é constantemente submetido a um processo de remodelação, no qual o osso antigo é reabsorvido pelos osteoclastos e um novo osso é formado pelos osteoblastos. Porém, esse é um complexo processo, regulado por uma variedade de células e de fatores biomecânicos (Datta et al.<sup>31</sup>, 2008; Hadjidakis, Andoroulakis<sup>55</sup>, 2006), que pode variar de indivíduo para indivíduo. Em condições fisiológicas, o processo de remodelação está em constante equilíbrio. Entretanto, alterações nos parâmetros que regulam esse processo podem levar a modificações no metabolismo ósseo e resultar em doenças como, por exemplo, a osteoporose (Datta et al.<sup>31</sup>, 2015). Dessa forma, é importante o estudo dos fatores que podem interferir, tanto de forma prejudicial quanto de forma benéfica, no processo

de remodelação óssea. Nesse contexto, os bifosfonatos têm sido alvo de diversos estudos, pois se caracterizam como uma substância que tem influência sobre o metabolismo ósseo.

Os BFs possuem mais afinidade ao tecido ósseo do que a qualquer outro tecido, sendo que essa preferência pelas superfícies mineralizadas os deixa em estreito contato com os osteoclastos (Russell<sup>111</sup>, 2011). Durante o processo de reabsorção óssea, os BFs ligados à superfície mineralizada são liberados no ambiente ácido, nas lacunas de reabsorção dos osteoclastos, os quais capturam então grandes quantidades da substância. Sabe-se que a principal ação dos BFs, em relação à remodelação óssea, é justamente sobre os osteoclastos, principalmente maduros, promovendo um efeito tóxico sobre essas células. Esse efeito resulta em alterações na morfologia celular, no citoesqueleto, na diferenciação, no recrutamento e na capacidade de reabsorção, podendo levar também à apoptose dessas células (Papapoulos<sup>98</sup>, 2008, Russell<sup>111</sup>, 2011).

No estudo de van Beek et al.<sup>133</sup> (2003) foi verificado, em ratos, que células precursoras de osteoclastos, localizadas na superfície óssea, eram alvo dos BFs, os quais agiam inibindo a diferenciação dessas células em osteoclastos. Além disso, verificaram que esses medicamentos não tinham ação sobre células osteogênicas e que seu efeito ocorria pela inibição da prenilação de proteínas mediada pelo GGPP (geranilgeraniol difosfato) e não pela FPPS.

Em outro estudo foi verificado, *in vitro*, que o efeito do tratamento com altas doses de zoledronato (ZOL) levou à redução do número de osteoclastos e osteoblastos por área, bem como diminuição dos níveis séricos de marcadores de atividade dessas células (Pozzi et al.<sup>102</sup>, 2009).

O ligante do receptor de ativação do fator nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL) é uma proteína da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) que, quando ligada ao seu receptor (RANK), é responsável pela diferenciação e ativação de células precursoras em osteoclastos maduros e pela inibição de sua apoptose (Kwan et al.<sup>70</sup>, 2004). Por outro lado, a osteoprotegerina (OPG), que é uma proteína também pertencente à família do TNF, pode ligar-se ao RANKL, impedindo assim a sua atividade, atuando como uma molécula inibidora da reabsorção óssea (Simonet et al.<sup>114</sup>, 1997; Boyce, Xing<sup>15</sup>, 2008).

Alguns estudos demonstraram o efeito dos bifosfonatos sobre a tríade RANK/RANKL/OPG. Em estudo *in vitro*, foi demonstrado que o ácido zoledrônico, um

potente BF, pode inibir a reabsorção óssea por meio da redução da expressão transmembrana de RANKL e do aumento da secreção de OPG, em células semelhantes a osteoblastos (Pan et al.<sup>97</sup>, 2004). Tal efeito, da redução da expressão de RANKL, também foi verificado no processo alveolar da maxila de ratos tratados com alendronato, confirmando esse mecanismo da droga para a diminuição da reabsorção óssea (Bradaschia et al.<sup>16</sup>, 2013).

Por outro lado, no estudo de Kim et al.<sup>66</sup> (2002), embora tenha havido inibição da formação de osteoclastos e da reabsorção óssea em meio de cultura celular, o tratamento com pamidronato e alendronato não alterou a expressão gênica de RANKL e OPG.

O efeito dos BFs sobre osteoclastos foi avaliado em estudo in vitro, no qual células RAW (células derivadas da linhagem de monócitos/macrófagos de murinos) diferenciaram-se em células semelhantes a osteoclastos (osteoclast-like cells) na presença de RANKL. Os resultados sugeriram um efeito inibitório dos BFs sobre a diferenciação dessas células e uma indução de sua apoptose, bem como prejuízo da capacidade de reabsorção (Abe et al.<sup>1</sup>, 2012).

Martins et al.<sup>81</sup> (2015) mostraram que baixas concentrações de ALD inibem a osteoclastogênese e diminuem a atividade de osteoclastos maduros, sem causar danos aos seus precursores.

Outra célula importante no processo de remodelação óssea é o osteoblasto. Originária de células tronco mesenquimais, é responsável pela produção dos componentes da matriz óssea (Hadjidakis, Androulakis<sup>55</sup>, 2006). O papel dos osteoblastos na remodelação óssea está associado não somente à sua capacidade de síntese de tecido ósseo, mas também pelo fato de estimular a completa diferenciação dos osteoclastos, por meio da expressão de RANKL em células osteoblásticas estromais, e por secretar OPG (Boyce, Xing<sup>15</sup>, 2008).

Com o avanço da idade, há uma redução do número de osteoblastos, sendo esses substituídos por adipócitos (Ali et al.<sup>5</sup>, 2005). Dessa forma, é importante a compreensão do efeito que os BFs podem exercer sobre essas células.

Um estudo que avaliou o efeito do ALD sobre o estresse mecânico no osso maxilar, em modelo de doença de Paget juvenil em ratos, concluiu que o ALD, além de inibir a atividade osteoclástica, também teve efeito sobre os osteoblastos, inibindo sua atividade, tanto local quando sistêmica (Shoji et al.<sup>121</sup>, 2010). Essa ação inibitória nos dois tipos de células também foi encontrada em estudo com ZOL (Pozzi et al.<sup>102</sup>, 2009).

Porém, outros estudos obtiveram resultados diferentes. No estudo de Lindtner et al.<sup>75</sup> (2014) foi constatado que o ALD e o ZOL aumentaram a diferenciação de osteoblastos a partir de células estromais da medula óssea de mulheres com osteoporose, ou seja, que esses bifosfonatos apresentaram um efeito osteoanabólico sobre a osteoporose. Da mesma forma, estudos com alendronato (Duque, Rivas<sup>40</sup>, 2007; Komatsu et al.<sup>69</sup>, 2013) e com Pamidronato e Zoledronato (Reinholz et al.<sup>105</sup>, 2000), constataram que esses bifosfonatos favoreceram a formação óssea por meio de estímulos à proliferação, diferenciação e atividade de osteoblastos. Além disso, Viereck et al.<sup>136</sup>, (2002) demonstraram que os BFs têm efeito direto sobre os osteoblastos, promovendo aumento da secreção de OPG.

A divergência entre esses resultados pode ser explicada pelas diferenças nas metodologias, tipos de BFs usados, duração do tratamento e, principalmente, pela diferença na concentração desses BFs. O efeito da concentração do medicamento sobre os osteoblastos pode ser visto nos estudos de Marolt et al.<sup>80</sup> (2012) e Koch et al.<sup>68</sup> (2010). No estudo de Marolt, em que foram utilizadas diferentes concentrações de pamidronato ( $10^{-10}$  a  $10^{-4}$  M), in vitro, em linhagem de células semelhantes a osteoblastos primárias de humanos, foi observado que as maiores concentrações desse BF ( $10^{-4}$ ) apresentaram significativa capacidade de inibir a proliferação celular, diminuir a viabilidade e induzir a apoptose dessas células, quando comparadas a concentrações menores. Em contraste, no estudo de Koch, os BFs nitrogenados, ZOL e ibandronato, na mais alta dose testada ( $5 \times 10^{-5}$ ) aumentaram a expressão gênica de marcadores relacionados à diferenciação de osteoblastos, quanto comparados ao grupo controle. Entretanto, outro estudo com ZOL observou que altas doses do BF (maiores que  $10^{-7}$ ) têm uma ação inibitória sobre o metabolismo e a proliferação de osteoblastos, enquanto na concentração de  $10^{-7}$  houve aumento da proliferação dessas células (Corrado et al.<sup>24</sup>, 2010).

Quando ocorre o aprisionamento de osteoblastos em lacunas da matriz óssea, estas células passam a ser denominadas osteócitos, sendo sua presença fundamental para a manutenção da homeostase óssea (Manolagas<sup>78</sup>, 2000). Logo, a ação dos BFs sobre essas células também tem sido alvo de estudos, os quais sugerem que esses medicamentos podem prevenir a apoptose de osteócitos e osteoblastos (Ploktin et al.<sup>101</sup>, 1999; Bellido, Plotkin<sup>9</sup>, 2011).

Em estudo empregando modelo de osteoporose em ovinos, foi constatado que a deficiência de estrógeno leva a um aumento no nível de apoptose de osteócitos e acúmulo de

microinjúrias. Porém, o tratamento com ácido zoledrônico reduziu significativamente esses níveis de apoptose e, embora tenha promovido um aumento do acúmulo de microinjúrias, as fissuras produzidas foram menores quando comparado aos grupos sem tratamento (Orlaith Brennan et al.<sup>17</sup>, 2011).

Em relação à angiogênese, Wood et al.<sup>139</sup> (2002) demonstraram, in vitro, o efeito do ácido zoledrônico levando à inibição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e da proliferação de células endoteliais. O estudo de Misso et al.<sup>87</sup> (2012) também constatou o efeito anti angiogênico do ácido zoledrônico, tendo sido verificado que o zoledronato inibiu a viabilidade e o crescimento de células endoteliais do cordão umbilical de humanos.

Em pacientes com câncer e metástase óssea, doses baixas e intermitentes de ácido zoledrônico resultaram em diminuição dos níveis séricos de fator de VEGF, após o início da terapia (Santini et al.<sup>116</sup>, 2007).

Em outro estudo, mulheres em fase pós-menopausa foram divididas em 2 grupos: Controle (cálcio e vitamina D) e Tratado (cálcio e vitamina D + 70mg/semana de ALD). Amostras de sangue foram coletadas nos 2 grupos no início do estudo e nos períodos de 3, 6 e 12 meses, para detecção dos fatores pró-angiogênicos VEGF e ANG-1 (angiopoietina-1). No grupo tratado houve diminuição significativa da concentração de VEGF no período de 12 meses, comparado ao inicial, e diminuição não significativa de ANG-1. O percentual combinado de VEGF e ANG-1 em 6 e 12 meses foi menor no grupo tratado em relação ao controle. Ainda nesse estudo, foram realizadas análises in vitro, nas quais foram testadas diferentes concentrações de ALD e ZOL (variando de  $10^{-12}$  a  $10^{-6}$ ) em linhagens de células osteoblásticas e osteocíticas. Foi verificado que concentrações mais altas de ALD e ZOL promoveram diminuição na produção de VEGF em linhagens de células osteoblásticas, sendo o efeito anti-angiogênico do ZOL mais pronunciado que do ALD. Porém, esses BFs não alteraram a produção de VEGF em linhagem de células osteocíticas (Ishtiaq et al.<sup>62</sup>, 2015).

A avaliação de marcadores sistêmicos de reabsorção óssea também tem sido alvo de estudos relacionados aos BFs. O telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX), o telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTX) e a deoxipiridinolina (DPD) são produtos da degradação do colágeno que são liberados na circulação e na urina, sendo considerados importantes marcadores de reabsorção óssea (Seibel<sup>119</sup>, 2005).

Em estudo no qual o ALD foi administrado em ratas ovariectomizadas, foi constatado que esse medicamento levou a uma diminuição dos níveis de deoxipiridinolina (DPD) e osteocalcina no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle (Da Paz et al.<sup>29</sup>, 2001). Grey et al.<sup>54</sup> (2009) também verificaram que a administração de zoledronato diminuiu os níveis de marcadores de reabsorção (CTX e NTX) e de formação óssea (osteocalcina e P1NP - Propeptídeo amino terminal do procolágeno tipo I).

Em avaliação com mulheres em período pós-menopausa, portadoras de osteoporose e submetidas ao tratamento com 35mg/semana de risedronato, foi verificado que os níveis urinários de CTX e DPD foram significativamente menores em todos os períodos avaliados (1, 3 e 6 meses após o início do tratamento) quando comparados aos níveis das amostras coletadas no início do tratamento. Por outro lado, os níveis séricos de osteocalcina foram significativamente menores apenas nos períodos de 3 e 6 meses (Karadag-Saygi et al.<sup>64</sup>, 2011).

Quanto à interrupção do tratamento com ALD, em mulheres portadoras de osteoporose, foi observado um aumento nos níveis séricos de CTX e P1NP nos períodos de 3, 6, 9 e 12 meses após interrupção da droga (Silva et al.<sup>122</sup>, 2011).

Embora ainda não estejam completamente elucidadas as vias e os mecanismos pelos quais os bifosfonatos agem sobre o metabolismo ósseo, a ação desses medicamentos sobre o processo de remodelação e reparo ósseo, como um todo, tem sido confirmada.

O efeito do ALD sobre o reparo do tecido ósseo foi demonstrado em estudo em ratos, nos quais foi administrado 1 mg/kg de alendronato previamente (2 dias antes) à extração dentária e a cada 4 dias até o sacrifício (3, 7, 10 e 14 dias após procedimento cirúrgico). Foram realizadas análises morfométrica (micro-CT), morfológica com hematoxilina e eosina, além da detecção da enzima TRAP (Fosfatase ácida resistente ao tartarato) – marcador de osteoclastos. Foi observado um rápido aumento na quantidade de células TRAP+ no 3º dia, seguido de uma queda nos períodos seguintes, para ambos os grupos. Inicialmente foi verificado, para o grupo tratado, menor volume de osso neoformado (7 dias) em relação ao grupo controle; porém, nos períodos de 14 e 28 dias, esse volume foi maior no grupo que recebeu o medicamento em relação ao grupo controle. Tal achado demonstrou que o BF promoveu um atraso no início da reparação do tecido ósseo (Hikita et al.<sup>58</sup>, 2009).

Esse efeito também foi observado no estudo de Aguire et al.<sup>3</sup> (2010), em que ratas foram submetidas a tratamento com ALD (15 e 150  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) por 4 semanas antes da extração do 1º molar inferior, sendo o medicamento mantido até o dia do sacrifício (10, 21, 35 e 70 dias). Foi observado, nas duas doses testadas, por meio de análise histomorfométrica, que houve diminuição transitória na vascularização e no volume de tecido ósseo no período de 10 dias; porém, nos períodos seguintes o sítio de extração foi progressivamente preenchido, de forma semelhante nos animais tratados e controle. Houve ainda um atraso na reabsorção do osso interdental nos sítios de extração dos animais tratados com ALD, no período de 10 dias. Dessa forma, os autores concluíram que o ALD promoveu um atraso no reparo ósseo nos estágios iniciais, após a realização das extrações.

Em contraste, um estudo que avaliou o efeito do ALD sobre o reparo ósseo em ratas ovariectomizadas (OVX), constatou que a droga favoreceu o processo de reparo. Os animais receberam o tratamento com ALD (1 mg/kg/dia) durante 1 semana após a extração do 1º molar superior esquerdo. Análises de microCT foram realizadas no início do estudo e em 2, 4 e 6 semanas pós extração. Foi observada maior densidade óssea no período de 4 semanas no grupo recebeu o tratamento com ALD comparado ao grupo controle (OVX + solução salina). Embora não tenha havido diferença significativa em relação à perda de altura da crista alveolar, o grupo OVX-ALD mostrou uma tendência a apresentar menor reabsorção óssea ao longo dos períodos. Os autores concluíram que o ALD teve efeito positivo em um modelo de reparo ósseo associado à deficiência estrogênica (Jee et al.<sup>63</sup>, 2010).

Resultado similar foi obtido no estudo de Tanoue et al.<sup>128</sup> (2015), no qual os autores verificaram que a administração de 100 $\mu\text{g/kg/dia}$  ALD, a curto prazo (3, 5, 7, 10 e 21 dias), após a extração do 1º molar superior teve o potencial de promover aumento da formação óssea, podendo ter um impacto positivo sobre o reparo em sítios de extração dentária.

Em estudo que teve como objetivo avaliar o efeito do ALD sobre o reparo em sítios de extração, 15 ratas receberam injeções subcutâneas de alendronato (2,5mg/kg/dia) durante 14 dias antes da realização da extração do 2º molar inferior, sendo a medicação mantida por 7, 14 e 21 dias após a realização do procedimento cirúrgico. O grupo controle recebeu injeção salina nos mesmos períodos. As análises, histológica e histomorfométrica, revelaram que, em todos os períodos, os animais que receberam o tratamento com ALD apresentaram menores níveis de osso neoformado na região apical ao sítio de extração, quando comparados ao grupo controle. A presença de osteoclastos, avaliada por meio de análise histoquímica para TRAP,

revelou que o grupo controle em todos os períodos apresentou maior expressão de células TRAP+, enquanto no grupo tratado além da menor expressão, as células estavam em apoptose ou em estágio latente, evitando que ocorresse a reabsorção da crista alveolar após a extração. Em relação à análise imunohistoquímica, foi observado aos 7 dias, que o grupo controle apresentou mais vasos sanguíneos em relação ao grupo alendronato, sendo que nos outros períodos os grupos apresentaram imunomarcações semelhantes. Já em relação à imunomarcação para duas proteínas da matriz óssea – OPN (osteopontina) e BSP (sialoproteína óssea) – estas foram semelhantes para ambos os grupos em todos os períodos (Yamamoto-Silva et al.<sup>141</sup>, 2013).

No estudo de Kim et al.<sup>65</sup>(2011), os animais tiveram os primeiros molares superiores extraídos, sendo que em uma hemimaxila foi realizada a instalação de implante, imediatamente após a extração do dente. Os animais receberam aplicação sistêmica de ALD (5 mg/kg, 3x /semana), durante 4 semanas previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos e até o momento do sacrifício (3, 7, 14 e 28 dias após cirurgia). Foram realizadas análises histológicas (H&E, Tricrômico de Masson), histoquímica (TRAP), imunohistoquímica (Colágeno tipo I – COL I) e mensuração do contato osso/implante. Nos sítios de extração não foram encontradas diferenças entre os grupos ALD e controle, em relação à neoformação óssea, enquanto nos sítios que receberam o implantes houve percentual significativamente maior de área óssea no período de 14 dias para o grupo ALD. Em ambos os sítios avaliados, não houve diferença entre os grupos quanto à quantidade de osteoclastos, porém foi observada maior quantidade de lacunas vazias no grupo ALD. Houve expressão de COL I para ambos os grupos no período de 7 dias, nos sítios de extração. Não houve diferença no contato osso/implante entre o grupo ALD e controle. Os resultados demonstraram que o ALD prejudicou a função dos osteoclastos, porém não prejudicou a função dos osteoblastos nos sítios avaliados.

O efeito positivo dos bisfosfonatos no reparo de defeitos ósseos foi observado por P. D'Aoust et al.<sup>28</sup>(2000). Nesse estudo, foram realizados defeitos (aproximadamente 0.8 mm) nos lados direito e esquerdo do osso parietal de ratos. Após a cirurgia, os animais foram submetidos a tratamento com injeções de etidronato (HEBP - 1-hidroxietilideno-1,1-biofosfonato), 15 mg/kg/dia, ou de solução salina (controle). Os animais foram sacrificados após 1 e 2 semanas. Na avaliação morfométrica foi verificado que os grupos tratados apresentaram maior percentual de fechamento da ferida em relação ao grupo controle, sendo a

maioria do defeito preenchido por matriz osteóide. Na análise imunohistoquímica foi observado aumento da expressão de osteopontina (OPN), sugerindo aumento na diferenciação dos osteoblastos.

O efeito negativo dos bifosfonatos sobre o processo de reparo foi observado no estudo de Toker et al.<sup>131</sup>(2012). Foram realizados defeitos críticos no lado direito das calvárias de ratos, os quais foram preenchidos com enxerto ósseo sintético somente (grupo MBCP); enxerto embebido em solução de 1 mg/mL de ALD por 5 minutos (grupo MBCP + ALD local); e enxerto associado ao alendronato sistêmico (MBCP + ALD sistêmico/0,01 mg/kg/dia). Os animais foram sacrificados após 8 semanas, sendo realizadas análises histológica e histomorfométrica. Foi detectado número significativamente maior de lacunas de reabsorção, de osteoclastos e de osteoblastos nos grupos que receberam o enxerto + ALD sistêmico. Quanto à área média de osso novo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos que receberam o enxerto. Nesse estudo, a administração sistêmica ou aplicação local de alendronato não favoreceu a regeneração óssea associada ao enxerto.

Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo acima citado, foram seguidos os mesmos protocolos de divisão dos grupos, dosagem e tempo de aplicação do ALD, sacrifício e de análises, porém foi empregado enxerto autógeno (obtido do lado esquerdo das respectivas calvárias). Nesse segundo estudo, tanto os animais que receberam enxerto ósseo autógeno + ALD local, quanto o grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno + ALD sistêmico, apresentaram quantidade significativamente maior de osso neoformado, comparado ao grupo controle. O número de osteoblastos e a área total de osso também foi significativamente maior no grupo enxerto + ALD local quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, foi possível verificar que o ALD foi capaz de promover aumento da formação óssea quando associado a enxertos autógenos, em modelo de defeito ósseo em calvárias (Toker et al.<sup>130</sup>, 2012).

Akyol et al.<sup>4</sup> (2015) avaliaram o efeito da associação irrigação com ALD/aplicação de laser de baixa potência sobre o reparo de defeitos ósseos em ratos. Foram confeccionados defeitos nas epífises distais dos ratos e, no transcirúrgico, foi realizada a irrigação com ALD e subsequente aplicação do laser na região do defeito. Foi concluído que essa associação levou a uma melhora na formação óssea, promovendo assim um efeito benéfico sobre o reparo ósseo.

Já no estudo Wang et al.<sup>137</sup> (2016), foi desenvolvido um conjugado de microesferas de PLGA (ácido láctico co-glicólico) com ALD. Os ratos foram divididos em 3 grupos: PLGA 10mg, PLGA-ALD 5mg e PLGA-ALD 10 mg. Foram confeccionados defeitos nos fêmures esquerdos, os quais foram preenchidos seguindo o descrito para cada grupo, enquanto os fêmures direitos foram usados como controle. Os animais foram sacrificados 6 semanas após a cirurgia. A forma máxima e energia de absorção foram maiores para o PLGA-ALD 10mg, comparado ao PLGA, melhorando assim as propriedades mecânicas do osso. Na análise de microtomografia computadorizada (micro-CT) foi verificado que os grupos PLGA-ALD 5 e 10mg apresentaram volume de osso trabecular duas vezes maior que o PLGA. A análise histológica demonstrou que o PLGA-ALD acelerou a formação de fibras colágenas durante a formação óssea. Por fim, foi detectado maior imunomarcção de BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2) – marcador relacionado à diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos – no osso trabecular em ambos os grupos PLGA-ALD em comparação ao grupo PLGA. Assim, os autores concluíram que esse conjugado pode melhorar o processo de reparo e a qualidade do tecido ósseo.

Em um estudo com coelhos, foram confeccionados defeitos de 5 mm nas calvárias, os quais foram preenchidos com um disco composto de PLGA + pamidronato. Os animais foram sacrificados após 1, 2, 4, 6 e 8 semanas. Por meio de análises radiográfica e histológica, foi observado que o medicamento diminuiu a formação óssea e que essa formação foi mais lenta. Além disso, de um modo geral, houve menor formação de estruturas vasculares nos grupos tratados com pamidronato. Assim, os autores concluíram que o pamidronato teve efeito inibitório sobre o reparo ósseo (Choi et al.<sup>22</sup>, 2007).

O efeito dos bifosfonatos na osseointegração também tem sido alvo de diversos estudos.

Huja et al.<sup>59</sup> (2011) realizaram extrações em cães e instalaram mini-implantes na maxila e mandíbula. Os autores observaram que a administração de 0,1 mg/kg/mês de ácido zoledrônico (ZA), durante 4 meses, promoveu uma supressão do turnover ósseo na região adjacente ao mini-implante e nos sítios de extração.

Estudos que avaliaram o efeito do alendronato na osseointegração de implantes em modelo de deficiência de estrogênio constataram que animais submetidos ao tratamento com ALD apresentaram os maiores valores de torque de remoção dos implantes, provavelmente

em função do aumento da massa óssea que esse medicamento promove (Giro et al.<sup>52</sup>, 2007;Narai, Nagahata<sup>94</sup>, 2003).

Da mesma maneira, Viera-Negron et al.<sup>135</sup> (2008), por meio de análises histológicas e radiográficas, constataram que a administração subcutânea de 5 mg/kg de ALD, 3x/semana, promoveu aumento na densidade óssea ao redor dos implantes e melhora na osseointegração.

Um estudo também realizado com ratas, em modelo de deficiência estrogênica, no qual foi avaliado o efeito do ALD, por longo período, após a osseointegração de implantes, foi observado que o medicamento é efetivo na prevenção de perda de massa óssea ao redor desses implantes e em aumentar a densidade óssea, especialmente no osso esponjoso (Giro et al.<sup>51</sup>, 2008). Porém, embora esse efeito benéfico seja confirmado, a taxa de aposição mineral e de marcadores relacionados à remodelação óssea (OCN e DPD) foram significativamente diminuídos pelo ALD, o que pode sugerir um comprometimento na qualidade desse tecido (Giro et al.<sup>50</sup>, 2011).

Verzola et al.<sup>134</sup> (2015), avaliou o efeito do tratamento com 1 mg/kg/semana de ALD, a longo prazo (120 dias), em ratas que receberam implantes nas tíbias. Os animais foram sacrificados aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 após instalação dos implantes. Os autores verificaram que o tratamento com ALD acelerou a osseointegração, aumentou a densidade óssea e promoveu maior resistência à fratura e tenacidade nos fêmures, porém não melhorou a propriedade de deformação elástica do tecido.

Embora diversos estudos comprovem a ação dos BFs sobre o metabolismo do tecido ósseo, diante da crescente utilização desses medicamentos por uma grande parcela da população, é necessário um maior entendimento das vias e dos mecanismos pelos quais esses medicamentos agem, especialmente a longo prazo. Esse entendimento é importante para que se consiga ajustar dose e duração do tratamento, visando potencializar os efeitos benéficos e diminuir os efeitos colaterais. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a dinâmica do reparo de defeitos críticos confeccionados em calotas de ratas adultas tratadas com ALD.

### **3 OBJETIVO**

O objetivo desse estudo foi avaliar, em calvárias de ratas, a influência da administração de alendronato, a longo prazo, sobre o processo de reparação óssea. Foi analisado ainda, o impacto sistêmico do medicamento sobre densidade mineral óssea e sobre os marcadores de remodelação óssea.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

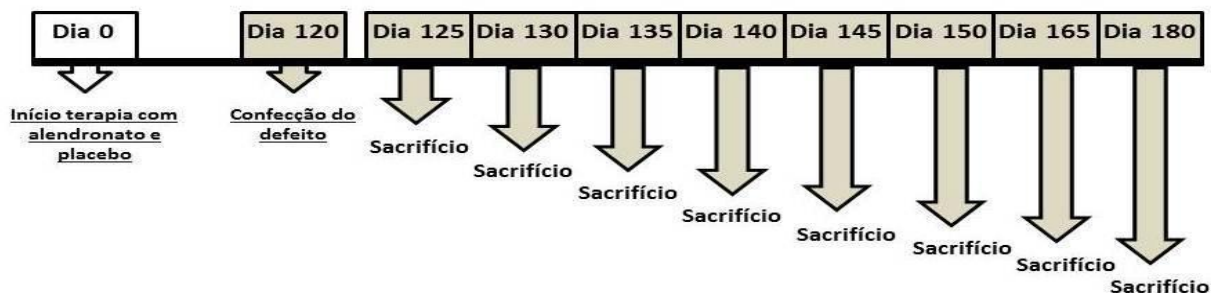
### Animais

Para esse estudo foram utilizadas 160 ratas Wistar com três meses de idade, pesando entre 200 e 250g. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno (Movart, Ribeirão Preto), em grupos de cinco, sendo alimentados com ração sólida padrão para animais de laboratório e água *ad libitum*. A temperatura foi controlada em 25°C e a umidade em 55%, sendo o tempo de exposição ao claro de 12 horas e 30 minutos e, ao escuro, de 11 horas e 30 minutos.

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Proc.nº16/2010) (ANEXO).

### Desenho do estudo

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais: grupo controle (CTL, n=80) e grupo alendronato (ALD, n=80). Os animais do grupo ALD receberam administração subcutânea de alendronato, na concentração de 1mg/Kg/semana<sup>23, 58</sup> (diluído em água destilada), enquanto os animais do grupo CTL receberam administração subcutânea de placebo (solução salina estéril) uma vez por semana, até o período pós-cirúrgico. Após 120 dias de tratamento, os animais de ambos os grupos foram submetidos à confecção de um defeito crítico na calvária. Dez animais de cada grupo foram sacrificados, por aprofundamento da anestesia, nos dias 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 dias após confecção do defeito. No dia do sacrifício foram coletadas amostras de sangue e urina. O peso dos animais foi controlado semanalmente durante todo o experimento para o ajuste da dose da medicação. A Figura 1 mostra o desenho experimental do estudo.

**Figura 1** - Desenho experimental do estudo

Fonte: Autoria própria

### **Cirurgia para confecção de defeitos críticos na calvária**

Os animais foram anestesiados por uma combinação de cloridrato de ketamina (Ketamina Agener – Agener União), na concentração de 0,08ml/100g, e cloridrato de xilazina 2% (Rompum - Bayer), na concentração de 0,04ml/100g de massa corpórea. Posteriormente, foi realizada a tricotomia da região superior do crânio do animal, seguida de antisepsia com gaze estéril embebida em solução de iodopovidona. Uma incisão em forma de ferradura foi realizada na porção central, com o objetivo de permitir acesso cirúrgico à calvária. Em seguida, os tecidos foram divulsionados para exposição do tecido ósseo.

Foram confeccionados defeitos ósseos circulares, com 6 milímetros de diâmetro, na porção mediana da calvária. A remoção total do tecido ósseo foi realizada com uma fresa trefina (Neodent, Brasil) sob constante irrigação, iniciando imediatamente após o vértice da sutura posterior craniana do animal. Após a confecção do defeito, as bordas da ferida foram suturadas em planos, sendo empregado fio reabsorvível (Vicryl 5-0 – Johnson & Johnson) para o plano profundo enquanto para o plano superficial foi empregado fio de seda (Seda 4-0 – Johnson & Johnson).

No pós-operatório os animais receberam penicilina associada à estreptomicina (Multibiótico Veterinário®; Vital Farma Ltda) na dosagem 0,1 ml/kg de peso, em dose única, e corticóide intramuscular na dosagem de 5mg/kg de (Cort-Trat®; A Química, Santa Marina S.A.), por três dias consecutivos.

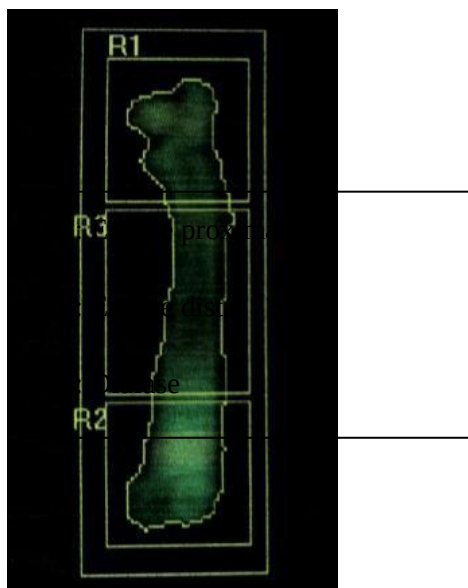
### **Sacrifício dos animais**

Os animais foram sacrificados nos períodos experimentais acima descritos, por aprofundamento da anestesia, tendo sido removidas as calvárias e o fêmur esquerdo. Os espécimes foram fixados em formaldeído tamponado 4%, durante 24 horas.

### **Densitometria Óssea**

A análise da densidade mineral óssea (BMD) foi realizada por Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA), em 10 fêmures esquerdos de cada grupo e para cada período de avaliação, para a constatação do efeito sistêmico do medicamento. Para isso foi utilizado um densitômetro (Discovery-A SN: 80999; Hologic Inc, Bedford, USA), empregando-se um software fornecido pelo fabricante do aparelho, para pequenos animais, no modo “High Resolution”. Para calibração do aparelho, foi realizado um teste previamente à leitura das amostras, o qual consiste em medir a densidade de um bloco padrão (“phantom”) composto por três camadas sintéticas, de constituição semelhante ao osso, com área e conteúdo mineral conhecido. A precisão da DXA, na determinação da BMD, foi avaliada pela mensuração do coeficiente de variação, expresso como uma porcentagem da média. Para tanto, cinco medidas consecutivas, de uma mesma amostra, foram realizadas na região de interesse, obtendo-se neste estudo um coeficiente de variação de 1,8%. A delimitação das regiões analisadas foi realizada com auxílio de ferramentas existentes no programa do aparelho, selecionando sempre o mesmo espaço a fim de padronizar as medidas de todas as sub-regiões. Foram efetuadas medidas de BMD global e de sub-regiões do fêmur (Figura 2).

**Figura 2** - Imagem obtida do fêmur por DXA. Delimitação global e de sub-regiões para análise.



Fonte: Autoria própria

### **Avaliação da concentração de marcadores de reabsorção e formação óssea**

Um dia antes do sacrifício os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas e, no dia do sacrifício, por meio da punção da artéria caudal, foram coletadas amostras de sangue (1,5ml). As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação a 1800 RPM, durante 15 minutos a 4°C, para separação do soro.

A avaliação da concentração dos níveis urinários de Deoxipiridinolina (DPD; MicroVue – Bone Health, Quidel – San Diego, USA), corrigida pela depuração da creatinina urinária de 24 horas ( $Nm.DPD/nMCr$ ), e a avaliação da concentração dos níveis séricos do Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I - CTX-I (RatLaps® ; Immunodiagnostic Systems Inc, Boldon – United Kingdom), Propeptídeo amino terminal do procolágeno tipo I - P1NP (Rat/Mouse; Immunodiagnostic Systems Inc, Boldon – United Kingdom) e Osteocalcina (Rat-MID®; Immunodiagnostic Systems Inc, Boldon – United Kingdom) foram realizadas por meio de ensaio imunoenzimático ELISA. Para cada reação, foram seguidas as instruções específicas dos fabricantes dos kits comerciais.

### **Preparação dos cortes descalcificados de tecido ósseo**

Após a fixação em formaldeído tamponado 4% por 24 horas, cinco espécimes de calvária relativos a cada grupo, em cada período de avaliação, foram lavados em água corrente e descalcificados em solução de EDTA 10% (pH 6.9) por 60 dias, à temperatura ambiente, com troca da solução em dias alternados. As calvárias foram então reduzidas, ou seja, foram cortadas no sentido transversal, resultando assim em duas amostras para cada animal. Essas amostras foram submetidas à desidratação com banhos sucessivos de etanol em graduações crescentes, diafanização com xilol, infiltração em parafina líquida a 60°C e, finalmente, inclusão em parafina.

Para cada bloco foram obtidos cortes semi-seriados de 4 µm de espessura, os quais foram montados em lâminas silanizadas (Perfecta, São Paulo - SP), contendo três cortes/lâmina, totalizando aproximadamente 20 lâminas. A desparafinização foi realizada por meio de três incubações (5, 3 e 3 minutos) em xilol, seguidas por uma incubação de três minutos em etanol absoluto. Em seguida, foi realizada a reidratação gradual por meio de imersão dos cortes em soluções decrescentes em concentração de etanol (95%, 90% e 70%) e água destilada (duas lavagens de três minutos cada).

### **Imuno-histoquímica**

Para a imunolocalização das células positivas para os receptores RUNX2, OPN, OPG, Catepsina K, RANKL, INOS e VEGF (Abcam, USA) os cortes foram submetidos a um processo de recuperação antigênica. Para os anticorpos OPN, RUNX2 e INOS o processo de recuperação antigênica foi realizado com uma solução de tris-EDTA com pH 9.0, por 20 minutos a 96°C. Já para VEGF, OPG, Cathepsina K e RANK L, a recuperação antigênica foi realizada em solução de citrato com pH 6.0, por 20 min a 96°C. Após o processo de recuperação antigênica foram realizadas três lavagens consecutivas em água destilada, de três minutos cada, sendo os cortes incubados em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% (para inibição da peroxidase endógena) por 30 minutos, sem luz e à temperatura ambiente. Foram realizadas novamente três lavagens sucessivas em água destilada, seguida da incubação com Protein Block Serum Free (Dako, North América) por 30 minutos para todos os anticorpos, com exceção da Catepsina K, no qual o tempo de Protein Block Serum Free foi de uma hora. Essas incubações foram realizadas em temperatura ambiente para inibição de reações

inespecíficas. Após sucessivas lavagens em água destilada, o anticorpo primário foi incubado, em uma concentração específica para cada anticorpo, durante 12 a 14 horas, a 4°C, em câmara úmida. Finalizado o período de incubação do anticorpo primário os cortes foram submetidos novamente a três lavagens sucessivas em água destilada, sendo então incubados com uma gota do anticorpo secundário biotinilado do kit de detecção universal (LSAB+System – HRP, Dako, North America), durante 30 minutos.

A detecção e localização da expressão do receptor, para cada marcador, foi determinada pelo complexo avidina-biotina-peroxidase. Assim, após incubação do anticorpo secundário e sucessivas lavagens, os cortes foram incubados em uma solução de estreptavidina conjugada com peroxidase (LSAB+System – HRP, Dako, North America) por 30 minutos. A revelação da coloração foi realizada por meio da utilização da diaminobenzidina (Liquid DAB + Substratechromogen System, Dako, North America) com tempos variando entre 10 e 40 segundos, dependendo do anticorpo. Subsequentemente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi, desidratados e selados com lamínula para permitir a análise em microscopia óptica.

Foram obtidas imagens de três regiões selecionadas nas calvárias (lados direito e esquerdo e região central do defeito), com auxílio de um microscópio de luz Leica DM2500 (Leica Microsystems, Germany), utilizando o programa LAS - Leica Application Suite V3 (Leica Microsystems, Germany). Cada imagem foi realizada com objetiva de 10x, resultando em um aumento final de 100x. As regiões foram selecionadas tendo como parâmetros os limites direito e esquerdo das calvárias (Figura 3).

Para a análise qualitativa ordinal das imunomarcações, para todos os anticorpos avaliados, foram atribuídos os seguintes escores: negativo (-), positivo (+), superpositivo (++) ou hiperpositivo (+++). Para realização da análise estatística, os escores foram convertidos em percentuais: 0%, 20% (10 a 30%), 60% (50 a 70%) e 90% (80 a 100%)<sup>34, 42, 103</sup>. A atribuição dos escores foi realizada por um único examinador, experiente e previamente calibrado.

**Figura 3** – Fotomicrografia ilustrativa das regiões de interesse para análise de Imuno-histoquímica. Barras: 100 µm.



Fonte: Autoria própria

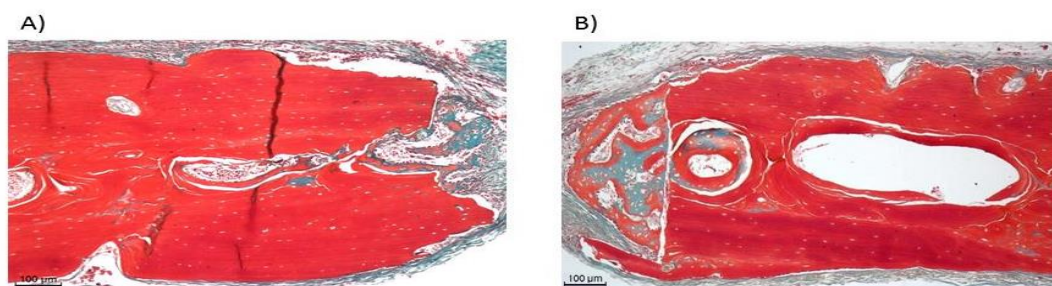
**Avaliação da área de tecido ósseo mineralizado e matriz osteóidee da distância linear entre as bordas do defeito**

Para análise da quantidade de tecido ósseo mineralizado e de matriz osteóide, bem como para avaliação do grau de fechamento do defeito, as lâminas foram coradas com Tricrômico de Goldner. Para essa coloração foram utilizados cortes descalcificados da calvária (4µm de espessura), os quais foram submetidos ao processo de deparafinização e reidratação, sendo posteriormente incubados em solução de fluido de Bouin, por uma hora, a 56°C. Após o período de incubação, os cortes foram lavados em água corrente por três minutos e então enxaguados em água destilada, seguida da incubação com hematoxilina de Weigert por 10 minutos, em temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas em água corrente por 10 minutos e enxaguadas três vezes em água destilada. Em seguida, foram incubadas em fucsina ácida de Ponceau, por cinco minutos, em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas em ácido acético 1% durante cinco minutos e incubadas em solução de PhosphomolybdicAcid-Orange G por dois minutos. Em seguida, foram enxaguadas novamente em ácido acético 1%, por 30 segundos, e incubadas em solução de Light Green por cinco minutos. Após esse período, as amostras foram lavadas em ácido acético 1% por cinco minutos e submetidas ao processo de desidratação, sendo então finalizadas por processo histológico de rotina.

Foram obtidas imagens de duas regiões selecionadas nas calvárias, lado direito e esquerdo do defeito, com auxílio do microscópio de luz Leica DM2500 (Leica Microsystems, Germany), utilizando o programa LAS - Leica Application Suite V3 (Leica Microsystems,

Germany), com objetiva de 10x (Figura 4). As imagens foram analisadas pelo software analisador de imagem Image J (1.42q – National Institute of Health – USA), sendo considerada como 100% a área de tecido ósseo total. A partir da área total, foram mensuradas as áreas com coloração vermelha, representando tecido ósseo maduro, e com coloração verde, representando matriz osteóide. Os resultados de tecido ósseo maduro e matriz osteóide foram apresentados como um percentual da área total mensurada.

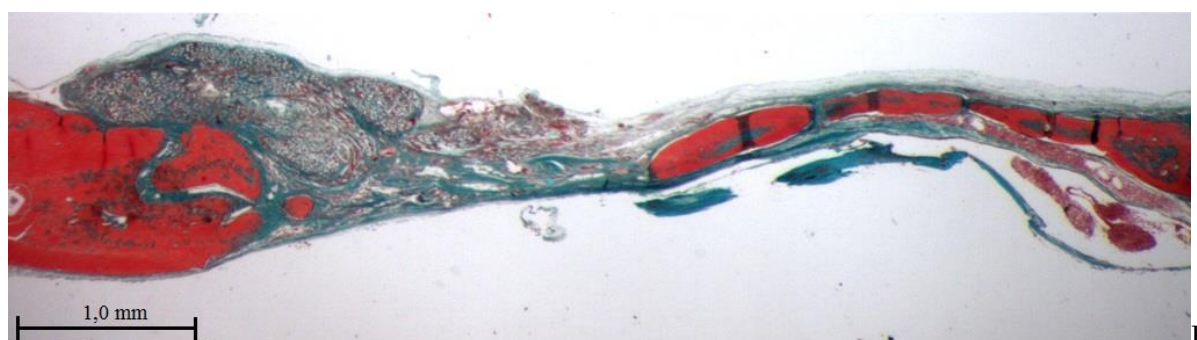
**Figura 4** – Fotomicrografia ilustrativa de cortes corados com Tricrômico de Goldner para mensuração da área de osso maduro e matriz osteóide. Aumento final de 100x. Lado esquerdo (A) Lado direito (B). Barras: 100µm.



Fonte: Autoria própria

Para avaliação do grau de fechamento do defeito, foram obtidas imagens de toda extensão do defeito com o Estereomicroscópio MZ-6 (Leica Microsystems, Germany), em objetiva de 2,5mm (Figura 5). Essas imagens foram analisadas com auxílio do mesmo software citado acima, sendo realizadas medidas lineares da distância entre as bordas do defeito.

**Figura 5** – Fotomicrografia ilustrativa de corte corado com Tricrômico de Goldner para mensuração da extensão linear entre as bordas do defeito. Aumento de 2,5x. Barra: 1,0mm.



onte: Autoria própria

### **Avaliação do número de células TRAP+ (Fosfatase ácida resistente ao tartarato-positivas)**

Foi realizada também a avaliação da quantidade de osteoclastos na calvária, por meio da contagem de células TRAP positivas (TRAP+). Para isso, os cortes (4µm de espessura) foram submetidos à coloração específica para osteoclastos (TRAP). As amostras foram submetidas ao processo de deparafinização e reidratação, sendo posteriormente incubadas em 0.1M Tris HCl, por 30 minutos, a 37°C. Foi então preparada a solução contendo PVA, MgCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>2</sub> e KNa tartarato, sendo essa solução pipetada sobre as amostras, as quais foram incubadas por mais duas horas a 37°C. As amostras foram lavadas duas vezes em água MiliQ na temperatura de 70°C para encerrar a reação. Após a coloração de TRAP, foi realizada a coloração com hematoxilina de Carazzi, sendo então finalizada por processamento histológico de rotina. Foram selecionadas duas regiões do defeito, uma do lado esquerdo e outra do lado direito, com auxílio do microscópio de luz (Leica DM2500, Leica Microsystems, Germany) em objetiva de 20x. Primeiramente foi realizada a mensuração da área total de tecido ósseo. Em seguida, foi realizada a contagem de osteoclastos, sendo consideradas para isso apenas as células com coloração vermelha, contendo três ou mais núcleos. O número de osteoclastos foi avaliado em relação à área de tecido ósseo.

### **Análise morfológica**

Para essa análise, cortes semi-seriados de 4 µm de espessura foram corados com Hematoxilina & Eosina (H/E). As lâminas foram submetidas a duas incubações seguidas em xilol (três minutos cada), seguidas de incubações subsequentes de álcool/xilol, álcool absoluto, álcool 90% e álcool 70% (três minutos cada). Em seguida, foi realizada uma lavagem de três minutos em água destilada. Após a lavagem, os cortes foram corados com Hematoxilina, durante 90 segundos. Após esse período as lâminas foram lavadas em água corrente por sete minutos, sendo então realizada a coloração com Eosina durante 10 segundos. Após esse período foram realizadas três lavagens rápidas, sendo as lâminas incubadas em álcool 95% (quatro minutos), seguida de duas incubações em álcool absoluto (quatro minutos cada). Em seguida, foi realizada incubação em álcool/xilol (três minutos), seguida de duas incubações em xilol (três minutos cada). Após a última incubação em xilol, as lâminas foram seladas com lamínulas para permitir a análise por microscopia óptica. Para isso, foram obtidas

imagens das regiões de interesse, utilizando-se um microscópio de luz Leica DM2500 (Leica Microsystems, Germany) empregando o programa LAS - Leica Application Suite V3 (Leica Microsystems, Germany). A avaliação morfológica foi realizada por meio de análise descritiva dos diferentes aspectos teciduais observados nos diferentes períodos para cada grupo (CTL e ALD). Os seguintes aspectos foram observados: normalidade do tecido ósseo, presença de células mononucleadas (polimorfonucleares, linfócitos, plasmócitos e macrófagos), lacunas de osteócitos vazias, presença de osteoclastos (células multinucleadas contendo três ou mais núcleos) e osteoblastos.

### **Análise estatística**

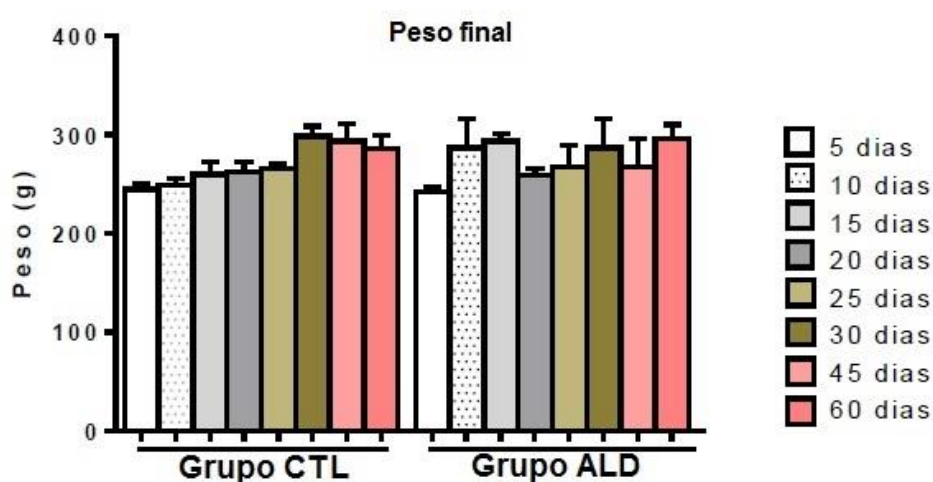
A avaliação da normalidade dos dados foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Na análise intergrupos dos dados paramétricos (Densitometria óssea e Avaliação dos marcadores de formação e perda óssea), dentro de cada período, foi empregado o teste t-não pareado. Para avaliação da evolução temporal desses dados, dentro de cada grupo (intragrupo), foi empregado o teste Anova complementado pelo teste post-hoc de Tukey. Para análise intragrupos de dados não paramétricos (Imuno-histoquímica, área de tecido ósseo maduro e matriz osteóide, fechamento do defeito e células TRAP+/área) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste post-hoc de Dunn, enquanto para análise intergrupos foi empregado o teste de Mann-Whitney. O software GraphPadPrism 5 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução das análises estatísticas. Todos os testes foram aplicados com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 5 RESULTADO

### Peso dos animais

Em relação ao peso dos animais, não foi verificada influência da aplicação do alendronato, não havendo diferença significativa entre os grupos durante e ao final do tratamento (Figura 6).

**Figura 6** - Peso dos animais no dia do sacrifício para ambos os grupos: controle (CTL) e alendronato (ALD). Valores expressos em média e desvio padrão.



$p > 0,05$  - Anova com teste post-hoc de Tukey

Fonte: Autoria própria

### Densitometria óssea

Na análise dos dados referentes à densitometria óssea global e das sub-regiões do fêmur (R1-epífise proximal; R2-epífise distal; R3-diáfise), foram observados valores de densidade mineral óssea (BMD) significativamente superiores para o grupo alendronato (ALD) quando comparado ao grupo controle (CTL), em cada período.

A análise da epífise proximal demonstrou que o ALD apresentou maiores valores de BMD nos períodos de 5, 30 e 45 dias ( $p < 0.01$ ) em relação ao CTL. A análise intragrupo, levando-se, portanto, em consideração a evolução temporal, demonstrou que

o CTL não apresentou alterações estatisticamente significantes na região de epífise proximal. Já no ALD, houve um aumento estatisticamente significativo da BMD nos períodos de 30 ( $p<0.001$ ), 45 ( $p<0.01$ ) e 60 dias ( $p<0.05$ ) em relação ao período de 15 dias (Tabela 1).

Na epífise distal, o ALD apresentou maiores valores de BMD nos períodos de 5 ( $p<0.001$ ), 10 ( $p<0.01$ ), 20 ( $p<0.05$ ), 25 ( $p<0.001$ ), 30 ( $p<0.001$ ), 45 ( $p<0.001$ ), e 60 dias ( $p<0.001$ ) em comparação ao grupo CTL. Na avaliação intragrupo, para o CTL foi verificado um aumento significativo da BMD no período de 30 dias em relação ao período de 5 dias ( $p<0.05$ ), enquanto no ALD foram verificados maiores valores de BMD nos períodos de 10 ( $p<0.05$ ), 30 ( $p<0.001$ ), 45 ( $p<0.01$ ) e 60 dias ( $p<0.001$ ) em relação ao período de 15 dias (Tabela 2).

Com relação à diáfise foram verificados, para o ALD, maiores valores de BMD nos períodos de 20 ( $p<0.01$ ), 30 ( $p<0.01$ ), 45 ( $p<0.01$ ) e 60 dias ( $p<0.01$ ) em relação ao CTL. Na avaliação intragrupo, para o CTL foram verificados valores significativamente maiores de BMD no período de 5 dias em comparação aos demais períodos ( $p<0.05$ ), enquanto para o ALD os períodos de 10 e 15 dias demonstraram os menores, embora com diferença significativa apenas quando comparados aos períodos de 5 ( $p<0.05$ ) e 20 dias ( $p<0.01$ ) (Tabela 3).

Na avaliação da BMD global foram constatados valores significativamente maiores para o ALD nos períodos de 5 ( $p<0.001$ ), 10 ( $p<0.05$ ), 20 ( $p<0.001$ ), 25 ( $p<0.05$ ), 30 ( $p<0.001$ ), 45 ( $p<0.001$ ), e 60 dias ( $p<0.001$ ) em relação ao CTL. A avaliação intragrupo demonstrou que o CTL não apresentou variações estatisticamente significantes ao longo do tempo. Por outro lado, o ALD apresentou valores significativamente menores no período de 15 dias, havendo posteriormente um aumento significativo (Tabela 4).

**Tabela 1** - Análise da densidade mineral óssea (BMD) nas regiões de epífise proximal para os grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio padrão.

| Grupo/Período | 5 dias       | 10 dias     | 15 dias     | 20 dias     | 25 dias     | 30 dias      | 45 dias      | 60 dias     |
|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| Controle      | 0.205±0.01 a | 0.222±0.01a | 0.223±0.01a | 0.221±0.02a | 0.225±0.02a | 0.223±0.01 a | 0.216±0.02a  | 0.223±0.01a |
| Alendronato   | 0.234±0.01*b | 0.229±0.00b | 0.212±0.01c | 0.232±0.01b | 0.227±0.01b | 0.249±0.02*a | 0.245±0.01*a | 0.238±0.01a |

\*p<0,01; Teste t-não pareado

Letras representam diferenças estatisticamente significantes entre periodos para cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey)

Fonte: Autoria própria

**Tabela 2** - Análise da densidade mineral óssea (BMD) nas regiões de epífise distal para os grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio padrão.

| Grupo/Período | 5 dias       | 10 dias      | 15 dias     | 20 dias      | 25 dias      | 30 dias      | 45 dias      | 60 dias      |
|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Controle      | 0.188±0.01b  | 0.221±0.02a  | 0.216±0.03a | 0.207±0.03a  | 0.192±0.02b  | 0.229±0.02a  | 0.226±0.03a  | 0.227±0.01a  |
| Alendronato   | 0.252±0.04γb | 0.264±0.03δa | 0.210±0.03c | 0.260±0.05*b | 0.261±0.03γb | 0.299±0.02γa | 0.285±0.02γa | 0.300±0.02γa |

\*p<0,05; δp<0,01; γp<0,001; Teste t-não pareado

Letras representam diferenças estatisticamente significantes entre os periodos entre cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey)

Fonte: Autoria própria

**Tabela 3** - Análise da densidade mineral óssea (BMD) nas regiões de diáfise para os grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio padrão.

| Grupo/Período | 5 dias      | 10 dias     | 15 dias     | 20 dias      | 25 dias     | 30 dias      | 45 dias      | 60 dias      |
|---------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Controle      | 0.233±0.01a | 0.208±0.03b | 0.204±0.01b | 0.199±0.01b  | 0.203±0.01b | 0.202±0.01b  | 0.195±0.01b  | 0.202±0.00b  |
| Alendronato   | 0.238±0.04a | 0.202±0.01c | 0.198±0.01c | 0.245±0.04*a | 0.202±0.01c | 0.226±0.01*b | 0.215±0.00*b | 0.220±0.01*b |

\*p<0,01; Teste t-não pareado

Letras representam diferenças significantes entre os periodos para cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey)

Fonte: Autoria própria

**Tabela 4** - Análise da densidade mineral óssea (BMD) Global para os grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio padrão.

| Grupo/Período | 5 dias       | 10 dias      | 15 dias     | 20 dias      | 25 dias      | 30 dias      | 45 dias      | 60 dias      |
|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Controle      | 0.203±0.01a  | 0.213±0.01a  | 0.215±0.02a | 0.207±0.01a  | 0.207±0.01a  | 0.215±0.01a  | 0.209±0.01a  | 0.215±0.01a  |
| Alendronato   | 0.236±0.01δa | 0.230±0.01*b | 0.206±0.01c | 0.238±0.01δa | 0.228±0.02*b | 0.255±0.01δa | 0.245±0.01δa | 0.249±0.01δa |

\*p<0,05; δp<0,001; Teste t-não pareado

Letras representam diferenças estatisticamente significantes entre periodos para cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey)

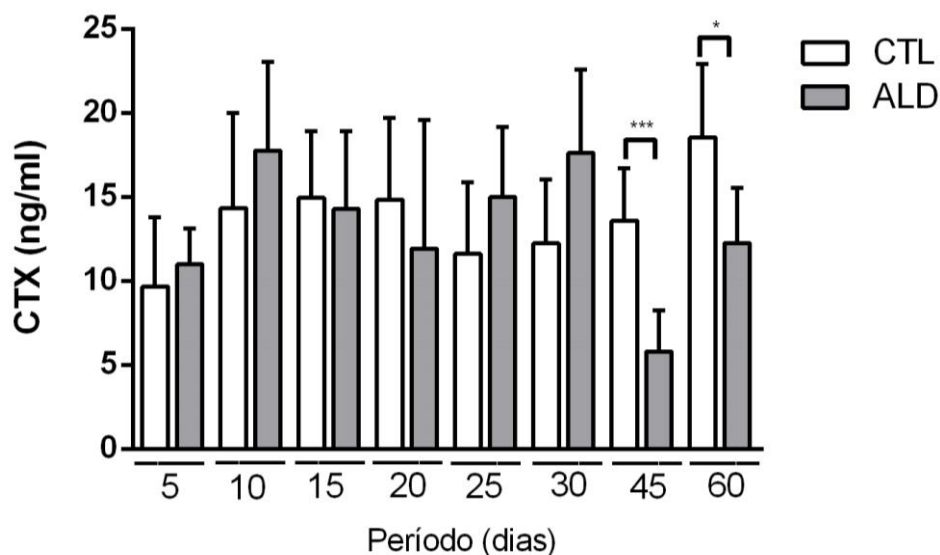
Fonte: Autoria própria

### Concentração de marcadores de remodelação óssea

#### **CTX (Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I)**

Na comparação entre os grupos quanto aos níveis séricos de CTX, foram verificadas concentrações significativamente maiores do marcador para o grupo controle nos períodos de 45 ( $p < 0,001$ ) e 60 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

**Figura 7** - Comparação entre grupos controle (CTL) e alendronato (ALD) quanto aos níveis séricos de CTX. Valores expressos em média e desvio padrão.

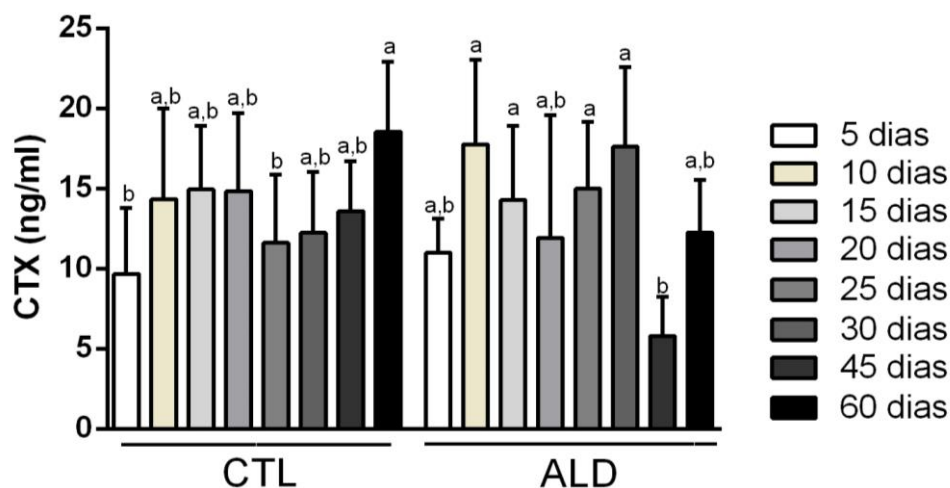


\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  – Teste t-não pareado

Fonte: Autoria própria

Na análise intragrupo foi verificado que, para o CTL, o período de 60 dias apresentou os maiores valores de CTX sendo, entretanto, apenas estatisticamente diferente em relação aos períodos de 5 e 25 dias. No ALD, os maiores valores foram observados aos 10, 15, 25 e 30 dias, sendo esses valores significativamente maiores em relação ao período de 45 dias (Figura 8).

**Figura 8** - Concentração sérica de CTX para os grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio-padrão.



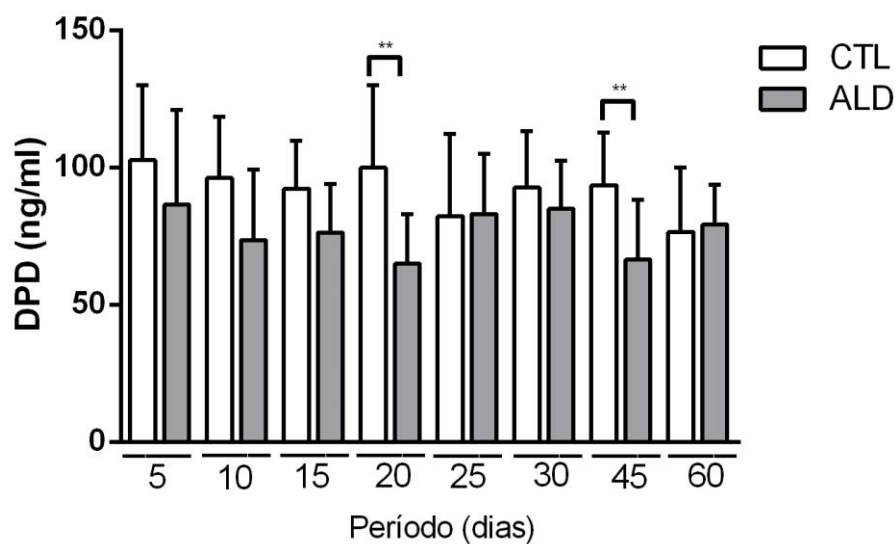
Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo.  $p < 0,05$  – Anova com teste post-hoc de Tukey

Fonte: Autoria própria

### **DPD (Deoxipiridinolina)**

Em relação à análise entre os grupos quanto à concentração dos níveis urinários de DPD, foi observado que, de um modo geral, o CTL apresentou maiores concentrações, porém com valores estatisticamente significantes apenas nos períodos de 20 ( $p < 0,01$ ) e 45 dias ( $p < 0,01$ ) (Figura 9).

**Figura 9** - Comparação entre os grupos CTL e ALD quanto aos níveis de DPD, corrigidos pela concentração urinária de creatinina de 24 horas, nas amostras obtidas no dia do sacrifício. Valores expressos em média e desvio-padrão.

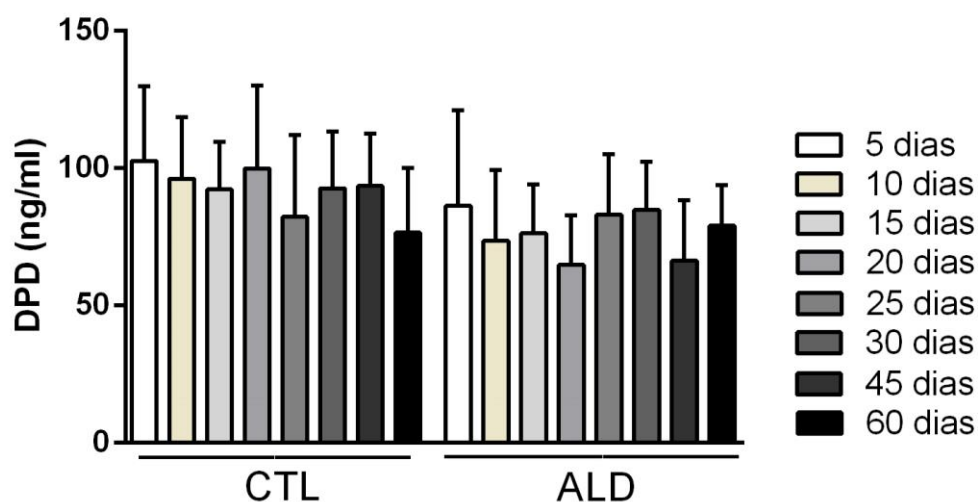


\*\*p<0,01 - Teste t-não pareado

Fonte: Autoria própria

Na análise intragrupo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ao longo dos períodos, tanto para o CTL quanto para o ALD (Figura 10).

**Figura 10** - Concentração urinária de DPD, corrigida pela concentração urinária de creatinina de 24 horas, para grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio-padrão.



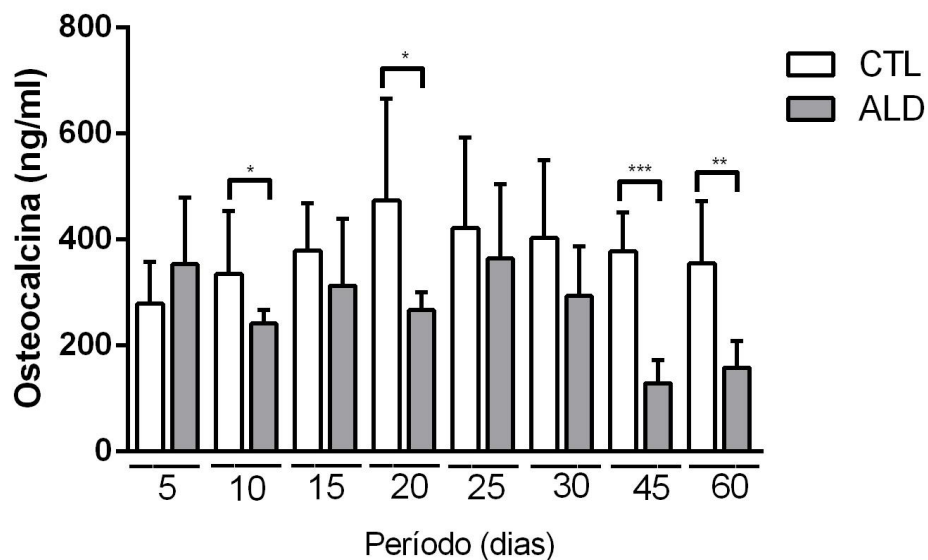
$p > 0,05$  – Anova

Fonte: Autoria própria

### ***Osteocalcina***

Na análise entre os grupos quanto aos níveis séricos de osteocalcina, foi observado que, de um modo geral, o CTL apresentou valores maiores de concentração do marcador que o ALD, com diferença significativa para os períodos de 10 ( $p < 0,05$ ), 20 ( $p < 0,05$ ), 45 (0,001) e 60 dias ( $p < 0,01$ ) (Figura 11).

**Figura 11** - Comparação entre os grupos CTL e ALD quanto aos níveis séricos de osteocalcina. Valores expressos em média e desvio-padrão.

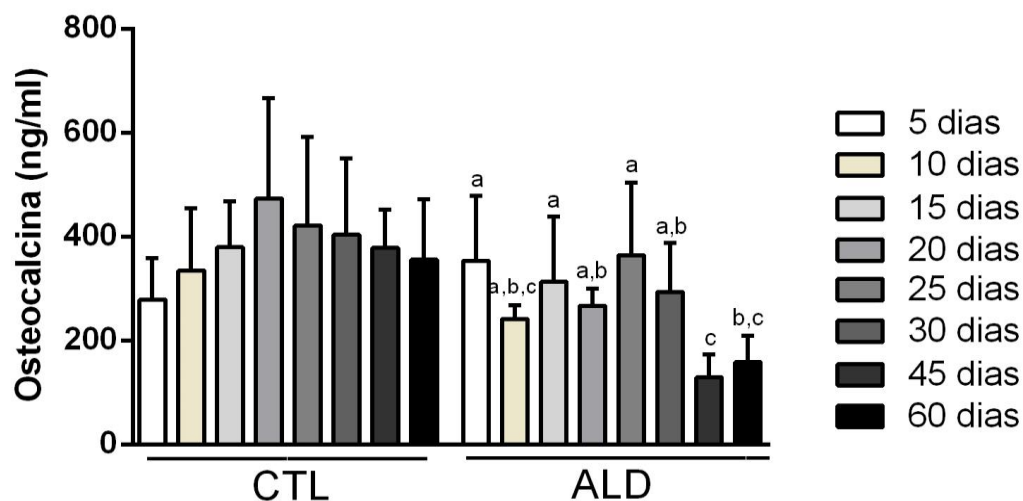


\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 - Teste t-não pareado

Fonte: Autoria própria

Com relação à análise intragrupo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes para o CTL. Para o ALD, foram verificados valores maiores de osteocalcina nos períodos de 5, 15 e 25 dias, com diferença estatisticamente significativa em relações aos períodos de 45 e 60 dias (Figura 12).

**Figura 12** - Concentração sérica de osteocalcina para grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio-padrão.



Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos.

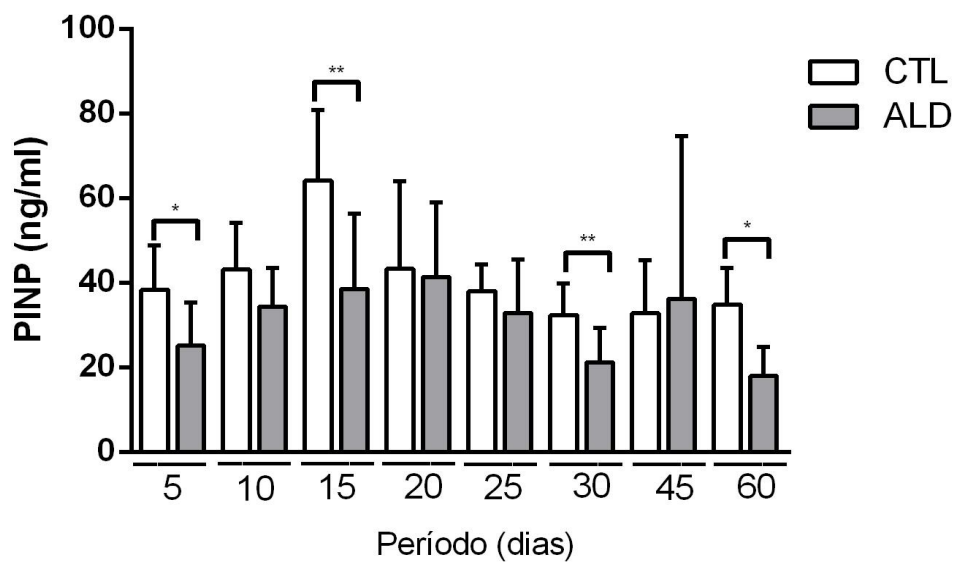
$p < 0,05$  - Anova com teste post-hoc de Tukey

Fonte: Autoria própria

### ***P1NP (Propeptídeo amino terminal do procolágeno tipo I)***

Na avaliação entre os grupos quanto ao marcador P1NP, foram observados maiores valores para o CTL, com diferença estatisticamente significativa, em relação ao grupo ALD, nos períodos de 5 ( $p < 0,05$ ), 15 ( $p < 0,01$ ), 30 (0,01) e 60 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 13).

**Figura 13** - Comparação entre os grupos CTL e ALD quanto aos níveis séricos de P1NP. Valores expressos em média e desvio-padrão.

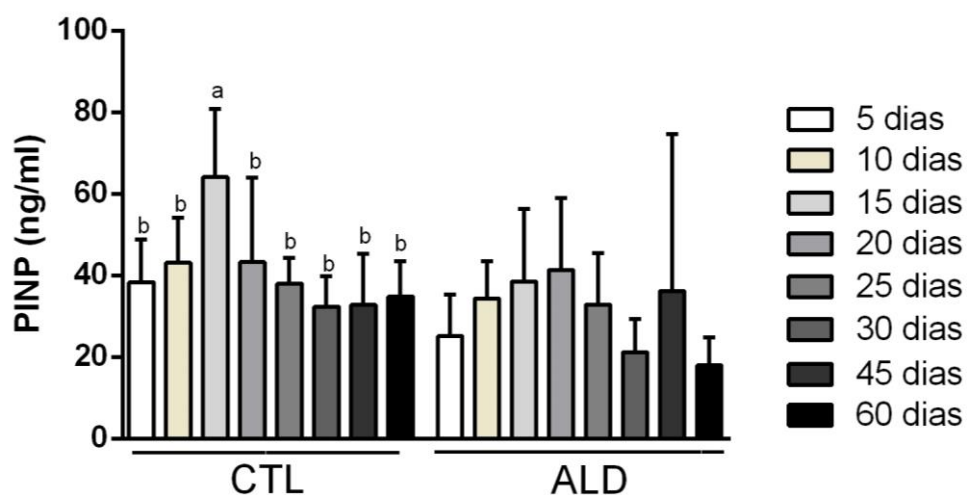


\*p<0,05; \*\*p<0,01 - Teste t-não pareado

Fonte: Autoria própria

Não foram observadas diferenças nas concentrações de P1NP ao longo dos períodos para o ALD. No CTL, as maiores concentrações de P1NP foram verificadas no período de 15 dias, sendo estatisticamente superior em relação aos demais períodos (Figura 14).

**Figura 14** – Concentração sérica de P1NP para grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio-padrão.



Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos.  
 $p < 0,05$  - Anova com teste post-hoc de Tukey

Fonte: Autoria própria

### Análise Imuno-histoquímica

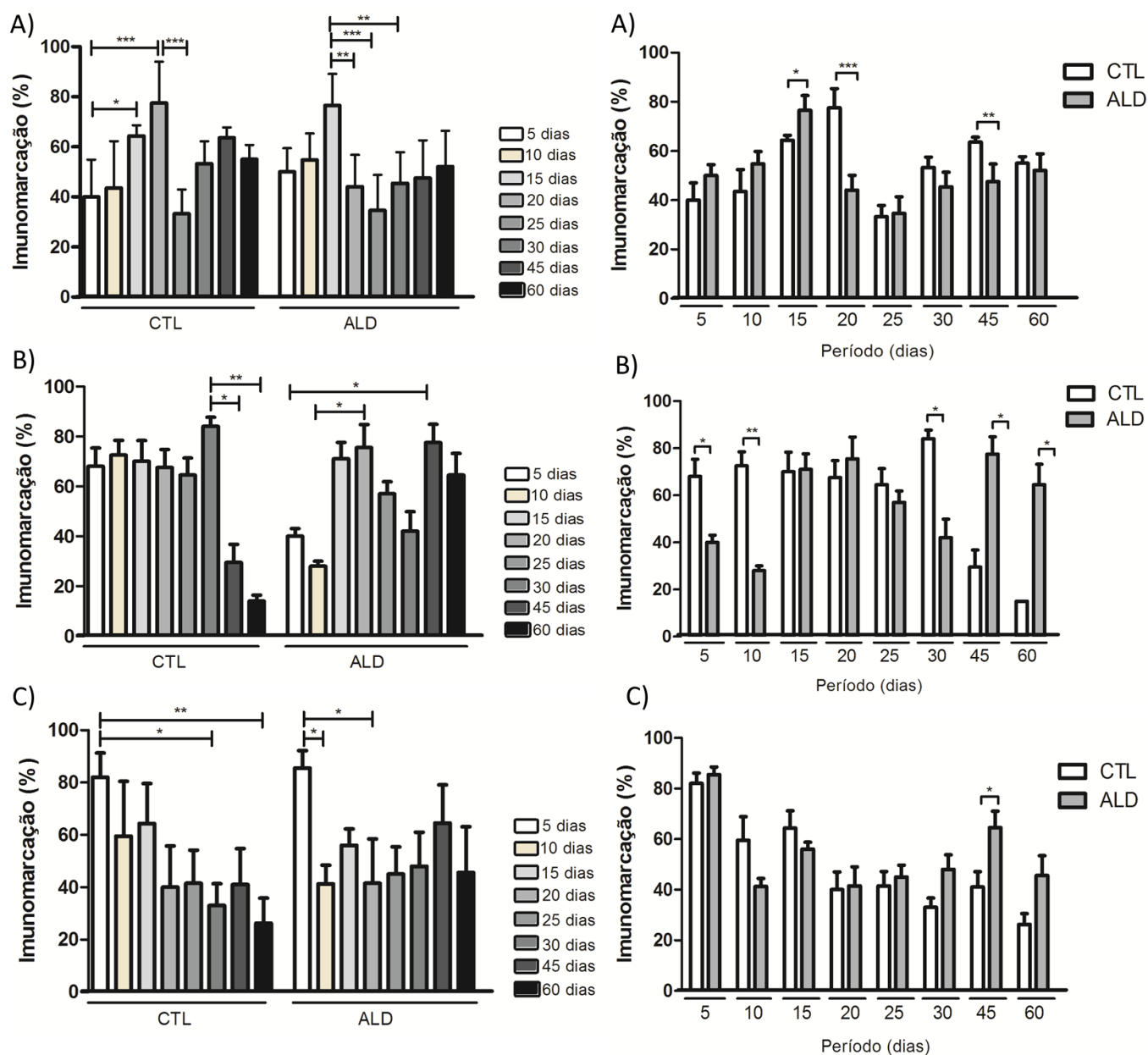
Na análise da expressão do anticorpo Catepsina K, nos grupos CTL e ALD foi observado que, até o período de 15 dias, houve maior expressão desse anticorpo para o grupo ALD, com diferença estatisticamente significativa no período de 15 dias ( $p < 0,05$ ) em relação ao CTL. Porém, a partir do período de 20 dias, houve uma inversão desse quadro, com o grupo CTL apresentando maiores percentuais de imunomarcção em relação ao ALD, com diferença estatisticamente significativa nos períodos de 20 ( $p < 0,001$ ) e 45 dias ( $p < 0,01$ ). Na avaliação ao longo dos períodos foi verificado que, no grupo CTL, os maiores percentuais ocorreram aos 15 e 20 dias, enquanto no grupo ALD, os maiores percentuais ocorreram aos 15 dias (Figura 15A e 16).

Em relação à comparação intergrupos da osteopontina (OPN), verificou-se que, de um modo geral, até os 30 dias houve maior imunomarcção desse anticorpo para o CLT, sendo esses valores significativamente maiores nos períodos de 5 ( $p < 0,05$ ), 10

( $p < 0,01$ ) e 30 dias ( $p < 0,05$ ), em relação ao ALD. No entanto, nos períodos de 45 ( $p < 0,05$ ) e 60 dias ( $p < 0,05$ ) dias houve uma inversão da situação, com valores significativamente maiores para o ALD em relação ao CTL. Na avaliação intragrupo, no grupo CTL, observou-se diminuição da expressão de OPN nos períodos de 45 e 60 dias em relação ao período de 30 dias. No grupo ALD, observou-se maior expressão de OPN aos 20 e 45 dias em relação aos 10 dias (Figura 15B e 17A).

Para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), a análise entre os grupos demonstrou que não houve diferença significativa para a maioria dos períodos, sendo que somente aos 45 dias o grupo ALD apresentou valores estatisticamente superiores aos do CTL ( $p < 0,05$ ). Na análise intragrupo, constatou-se para o grupo CTL uma diminuição da imunomarcção aos 30 e 60 dias em relação aos 5 dias. Em relação ao grupo ALD, verificou-se menor imunomarcção de VEGF aos 10 e 20 dias em relação aos 5 dias (Figura 15C e 17B).

**Figura 15** – Percentual de imunomarcção (%) para anticorpos Catepsina K (A), OPN (B) e VEGF (C). Valores expressos em média e desvio-padrão.

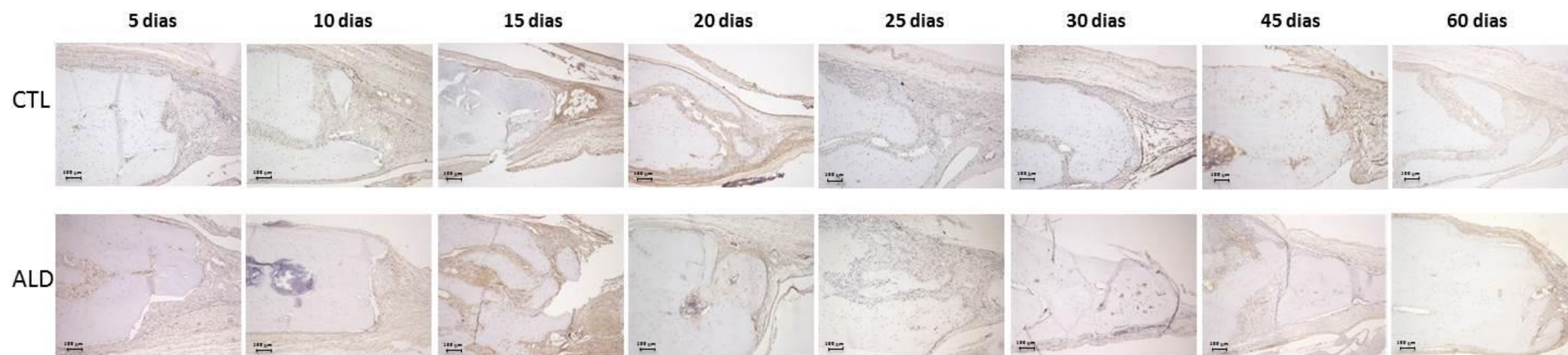


Análise intragrupo (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – Teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn).

Análises entre os grupos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  - Teste de Mann-Whitney).

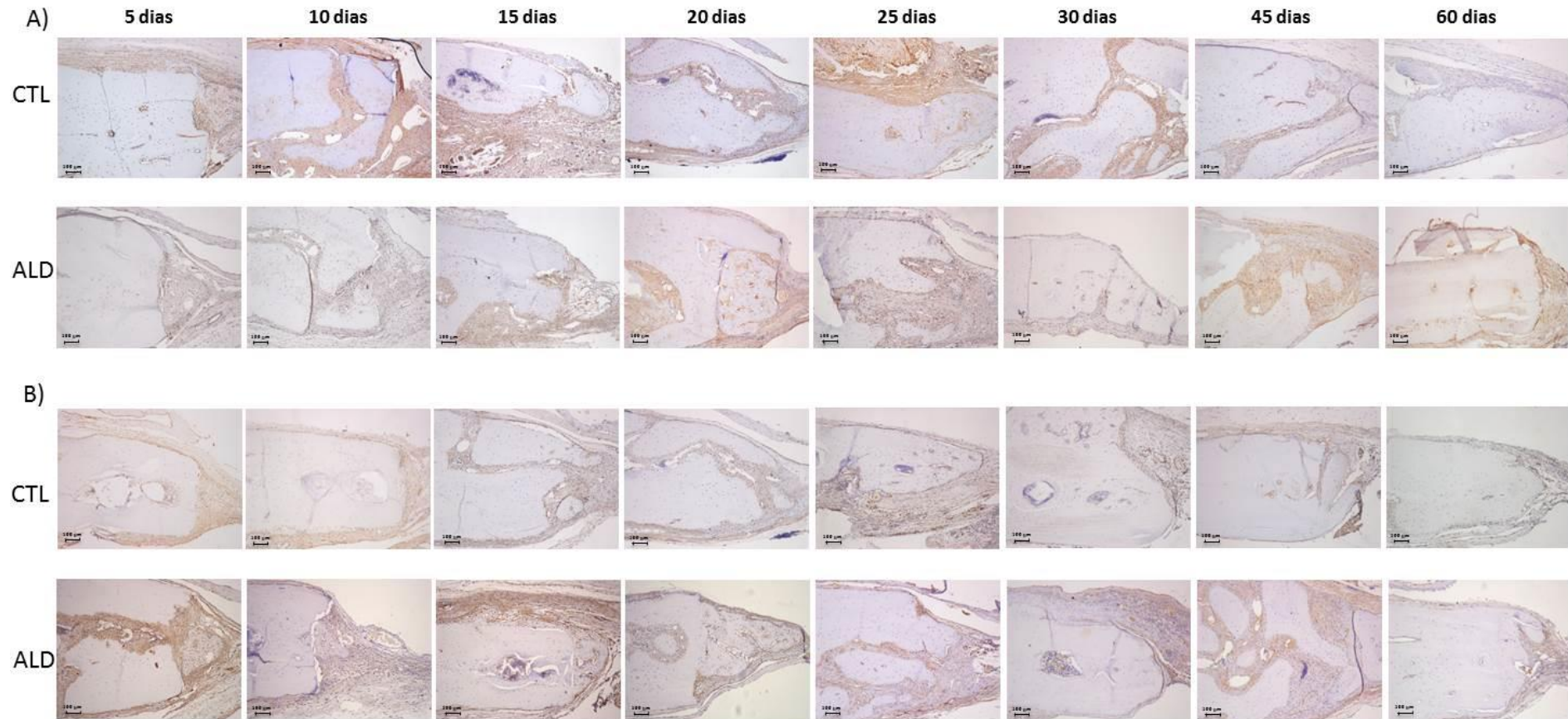
Fonte: Autoria própria

**Figura 16** – Fotomicrografias representativas da imunomarcção para o anticorpo Catepsina K para os grupos controle (CTL) e alendronato (ALD). Barras: 100µm.



Fonte: Autoria própria

**Figura 17** – Fotomicrografias representativas da imunomarcação para os anticorpos OPN **(A)** e VEGF **(B)** para os grupos controle (CTL) e alendronato (ALD). Barras: 100µm.

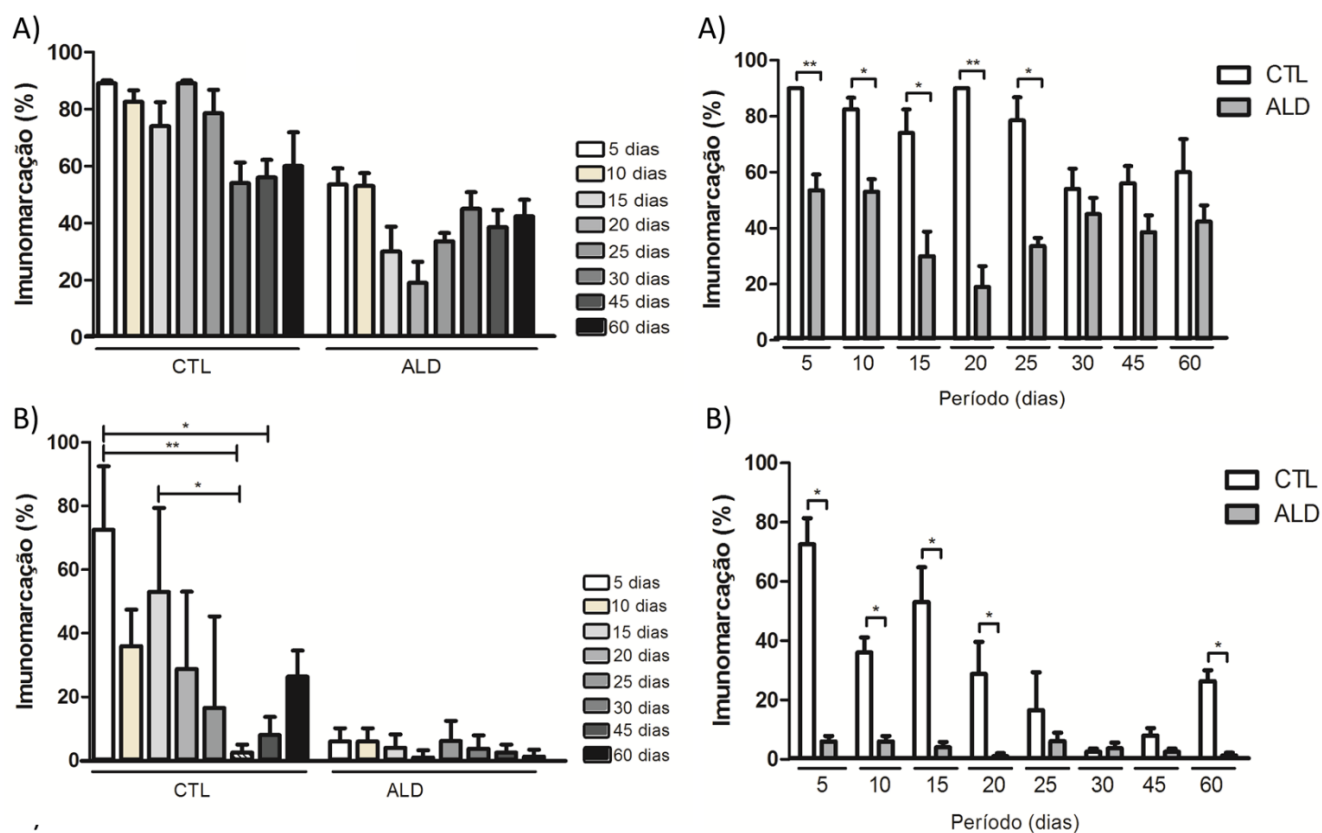


Fonte: Autoria própria

Na análise entre os grupos para imunomarcação de iNOS, verificou-se maior expressão desse marcador no grupo CTL, em todos os períodos, em relação ao ALD, com valores estatisticamente superiores aos 5 ( $p<0,01$ ), 10 ( $p<0,05$ ), 15 ( $p<0,05$ ), 20 ( $p<0,01$ ) e 25 dias ( $p<0,05$ ). Em relação à análise intragrupo, não foram verificadas diferenças ao longo dos períodos tanto no grupo CTL quanto no ALD (Figura 18A e 19A).

Na análise entre os grupos para o anticorpo RUNX2, foram detectados menores percentuais de imunomarcação para o grupo ALD em relação ao CTL, sendo valores esses significativamente menores nos períodos de 5 ( $p<0,5$ ), 10 ( $p<0,05$ ), 15 ( $p<0,05$ ), 20 ( $p<0,05$ ) e 60 dias ( $p<0,05$ ). Na avaliação intragrupo, para o grupo ALD não foram observadas diferenças entre os períodos. Já para o grupo CTL, os maiores valores foram observados nos períodos de 5 e 15 dias, com diferença estatisticamente significativa em relação aos períodos de 30 e 45 dias (Figura 18B e 19B).

**Figura 18** – Percentual de imunomarcação (%) para anticorpos iNOS (A) e RUNX2 (B). Valores expressos em média e desvio-padrão.

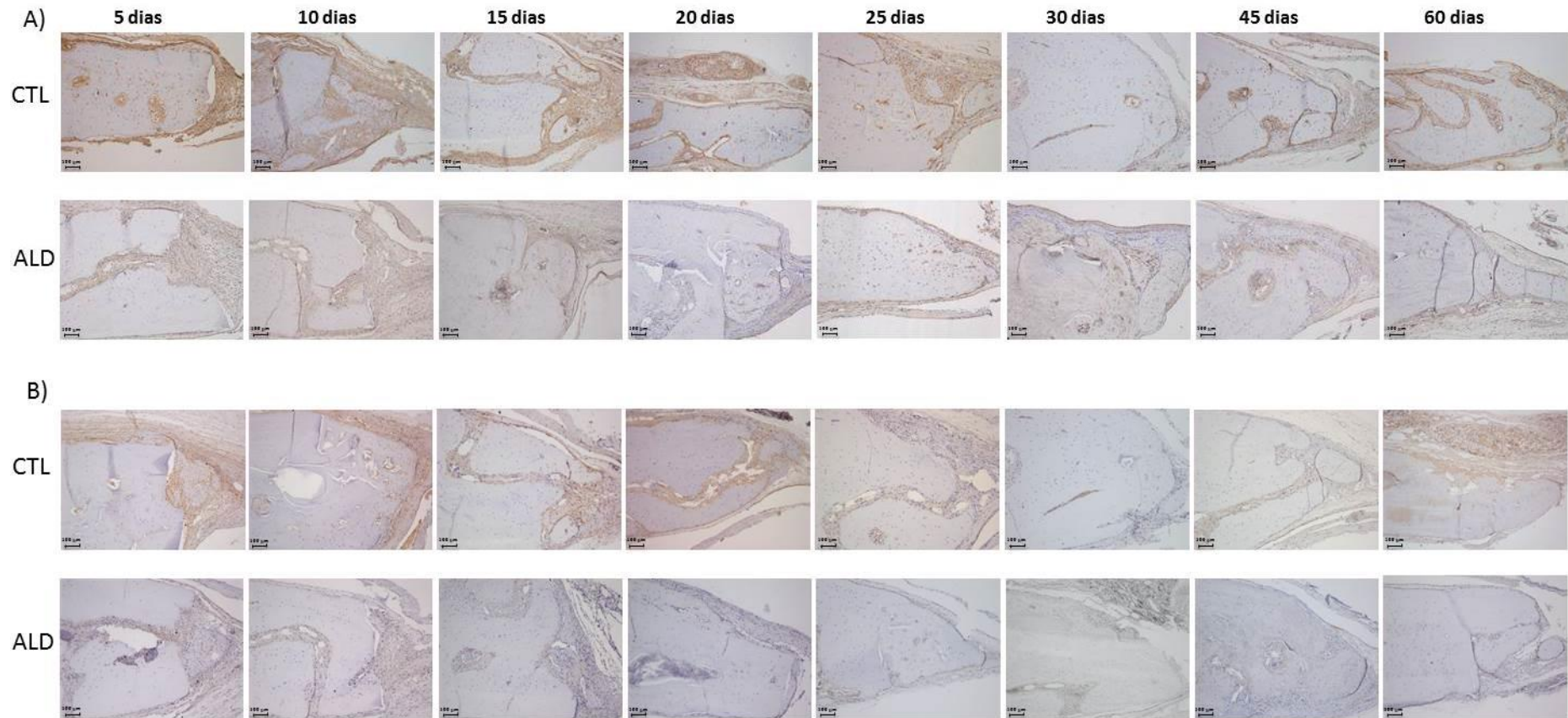


Análise intragrupo ( $p > 0,05$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  – Teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dun)

Análises entre os grupos ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  - Teste de Mann-Whitney)

Fonte: Autoria própria

**Figura 19** – Fotomicrografias representativas da imunomarcação para os anticorpos iNOS **(A)** e RUNX2 **(B)** para os grupos controle (CTL) e alendronato (ALD). Barras: 100µm.



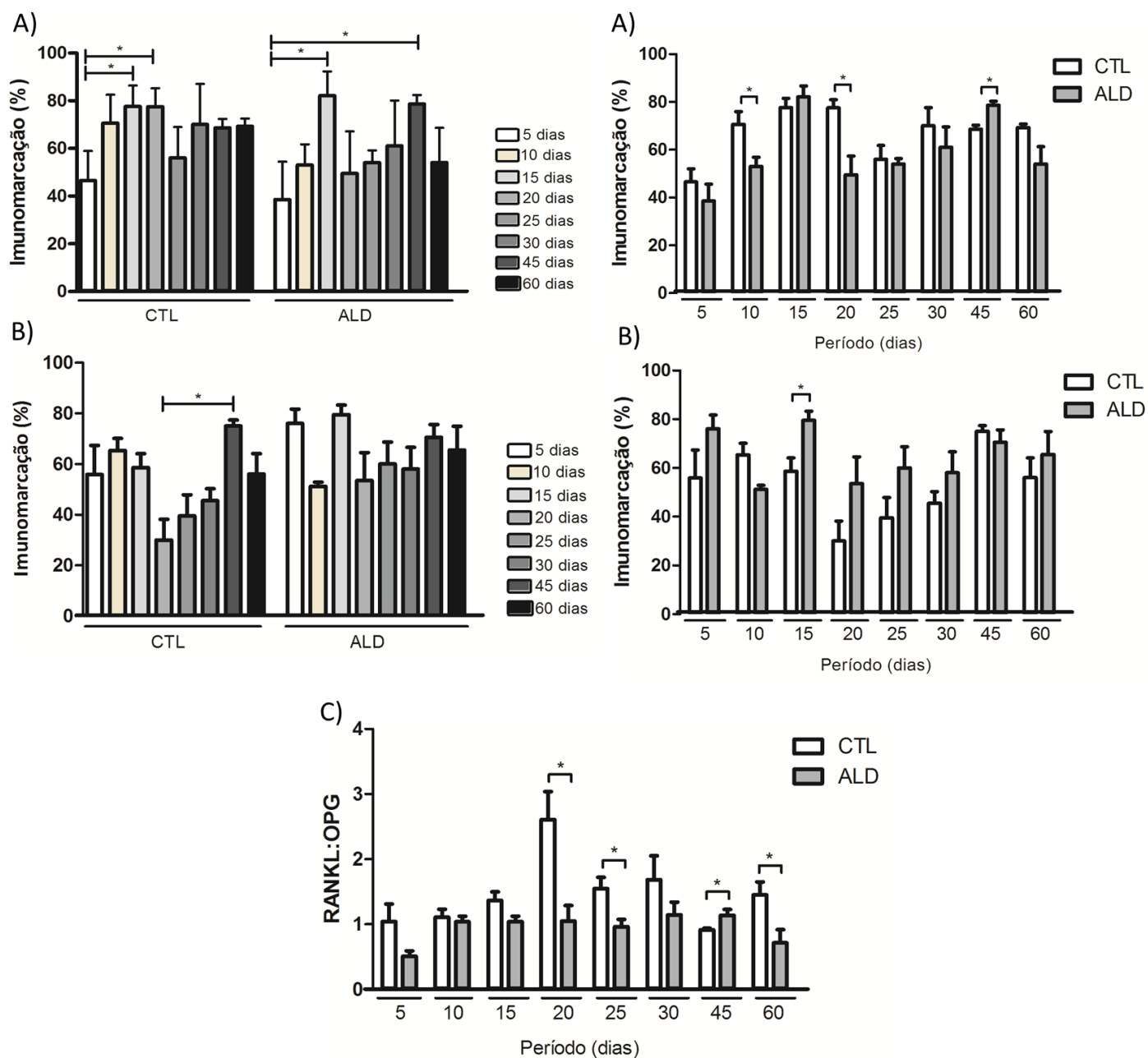
Fonte: Autoria própria

Quanto o anticorpo RANKL, pode-se verificar, de um modo geral, menor expressão no grupo ALD, sendo esses valores significativamente menores nos períodos de 10 ( $p<0,05$ ) e 20 dias ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo controle. No entanto, no período de 45 dias ( $p<0,05$ ), houve uma inversão, com valores significativamente maiores de RANKL para o grupo ALD. Na análise intragrupo, para o grupo CTL, os períodos de 15 e 20 dias apresentaram maior expressão de RANKL em relação aos 5 dias. No grupo ALD, os períodos de 15 e 45 dias apresentaram valores significativamente maiores de RANKL em relação ao período de 5 dias (Figura 20A e 21A).

Para o anticorpo OPG, na grande maioria dos períodos, o grupo ALD apresentou maior expressão desse marcador, porém com diferença estatisticamente significante apenas aos 15 dias ( $p<0,05$ ) em comparação ao grupo CTL. Não foram observadas diferenças ao longo dos períodos para o grupo ALD. No grupo CTL, foi verificada expressão significativamente maior desse anticorpo aos 45 dias em relação aos 20 dias (Figura 20B e 21B).

No que diz respeito à comparação entre os grupos quanto à proporção de imunomarcação entre os anticorpos RANKL e OPG (Razão RANKL:OPG), foram verificados maiores valores da razão para o grupo CTL na maioria dos períodos, sendo esses valores significativamente maiores nos períodos de 20 ( $p<0,05$ ), 25 ( $p<0,05$ ) e 60 dias ( $p<0,05$ ). Sugerindo assim, que houve maior tendência de reabsorção óssea no grupo CTL em relação ao grupo ALD. No entanto, aos 45 dias houve uma inversão do quadro, com o grupo ALD apresentando maiores valores da razão RANKL:OPG em relação ao CTL (Figura 20C).

**Figura 20** – Percentual de imunomarcção (%) para anticorpos RANKL (A), OPG (B) e Razão RANKL:OPG (C). Valores expressos em média e desvio-padrão.

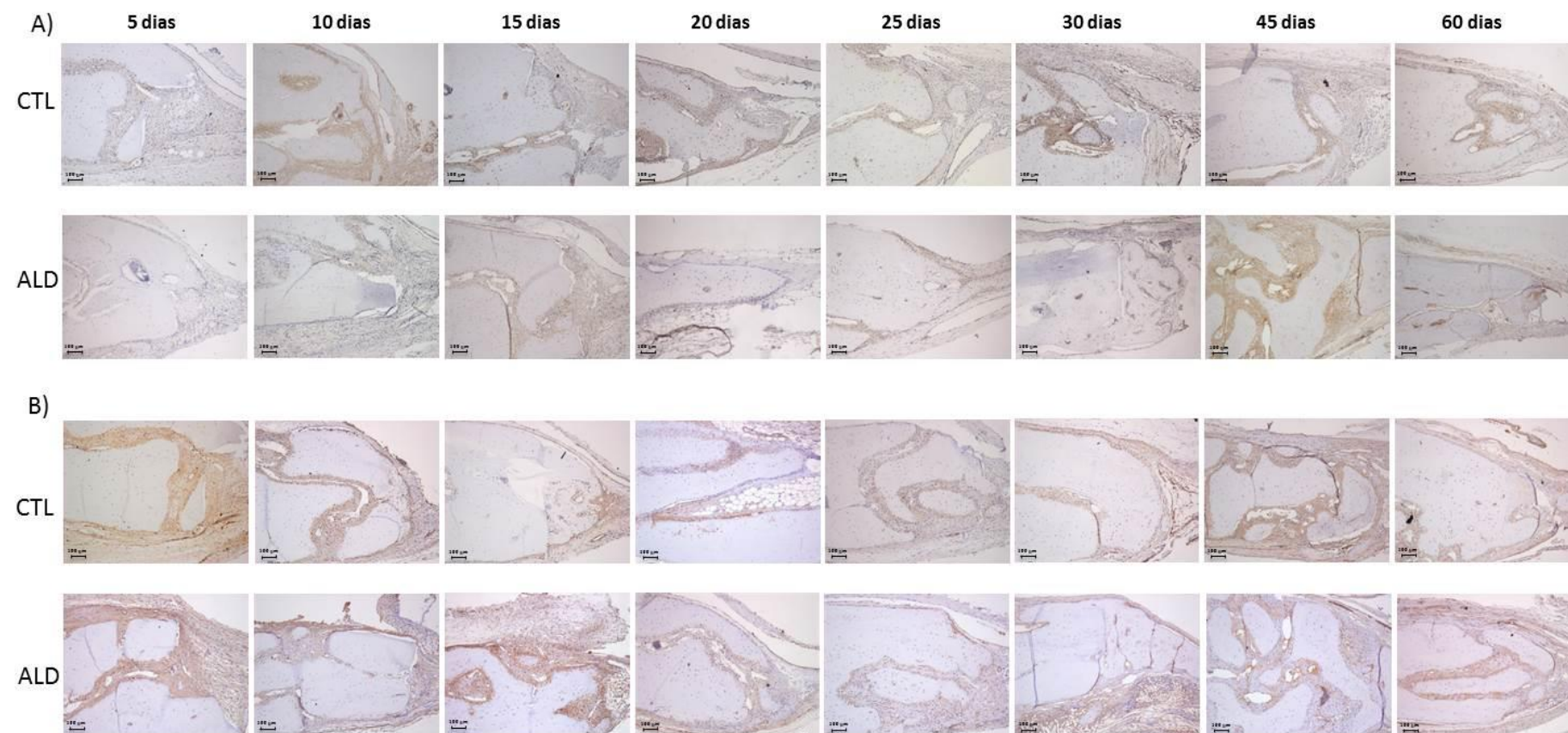


Annálise intragrupo (\* $p < 0,05$  – Teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dun)

Análises entre os grupos (\* $p < 0,05$  - Teste de Mann-Whitney).

Fonte: Autoria própria

**Figura 21** – Fotomicrografias representativas da imunomarcação para os anticorpos RANKL(A) e OPG(B) para os grupos controle (CTL) e alendronato (ALD). Barras: 100µm.

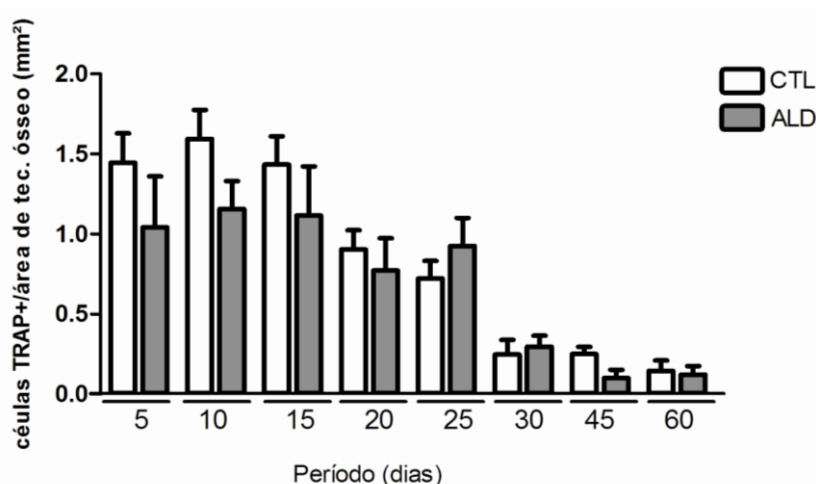


Fonte: Autoria própria

**Avaliação do número de células TRAP+ (Fosfatase ácida resistente ao tartarato-positivas)**

Na análise entre os grupos quanto à quantidade de células TRAP+ por área de tecido ósseo, foi observado que, de um modo geral, o grupo CTL apresentou maior quantidade de células TRAP+ em relação ao ALD. Entretanto, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 22 e 24).

**Figura 22** – Comparação entre os grupos CTL e ALD quanto ao número de células TRAP+ por área de tecido ósseo. Valores expressos em média e desvio padrão.

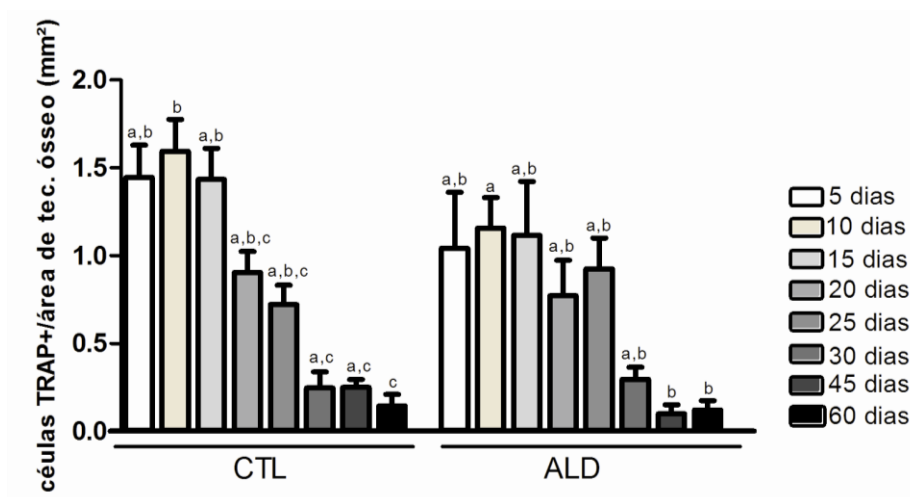


$p > 0,05$  – Teste de Mann-Whitney

Fonte: Autoria própria

Em relação à análise intragrupo, foi observada uma diminuição no número de células TRAP+ positivas ao longo dos períodos, tanto para grupo CTL quanto para grupo ALD. No grupo CTL os menores valores foram observados nos períodos de 30, 45 e 60 dias. No grupo ALD, os menores valores foram observados nos períodos de 45 e 60 dias (Figura 23 e 24).

**Figura 23** – Número de células TRAP+ por área de tecido ósseo para grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio-padrão.

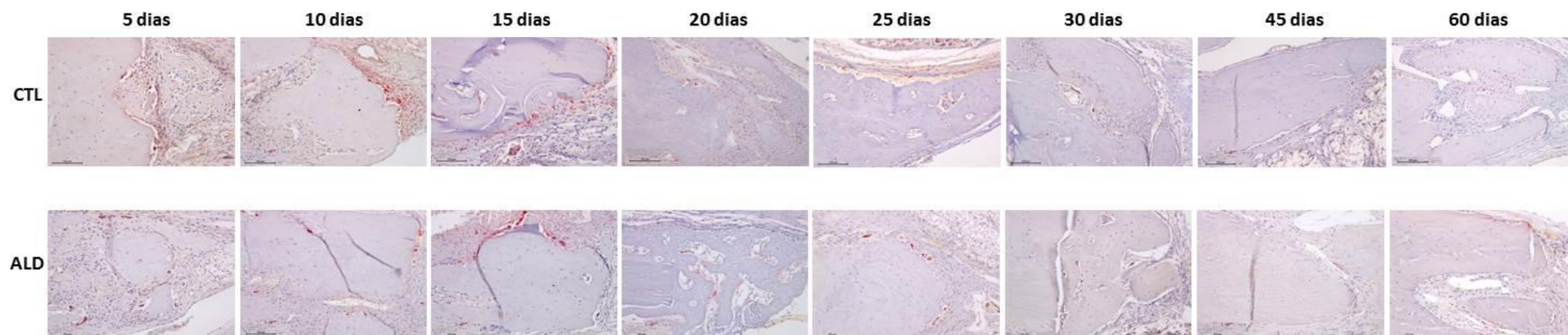


Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo

$p < 0,05$  - Teste de Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn

Fonte: Autoria própria

**Figura 24** – Fotomicrografias representativas da presença de células TRAP+ para os grupos controle (CTL) e alendronato (ALD). Barras: 100µm.

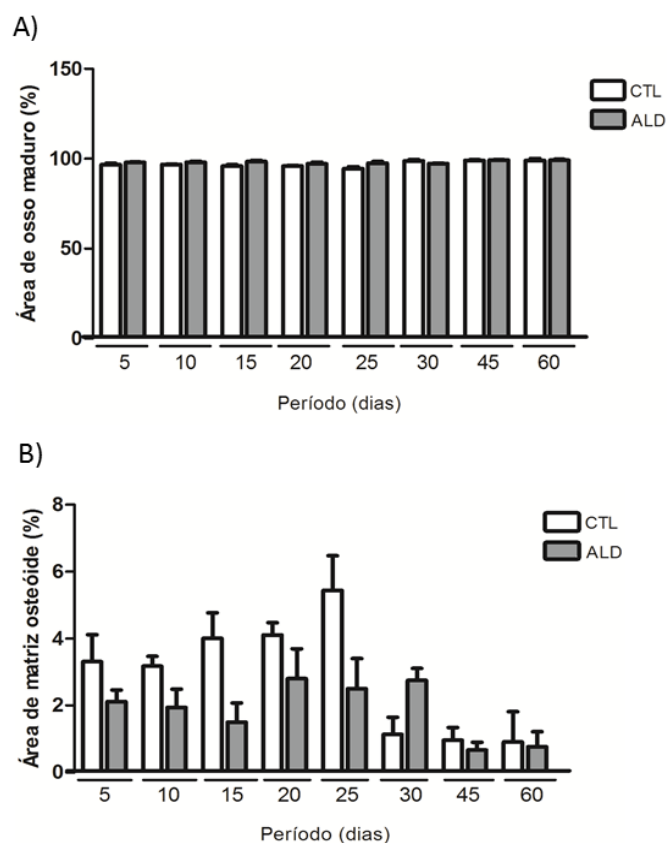


Fonte: Autoria própria

### Avaliação da área de tecido ósseo mineralizado e matriz osteóide

Na comparação entre os grupos CTL e ALD, quanto ao percentual de área de tecido ósseo mineralizado (osso maduro), não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes (Figuras 25A e 27). Em relação ao percentual de área de matriz osteóide, de um modo geral, foram observados maiores valores para o grupo CTL, porém as diferenças não foram estatisticamente significantes (Figuras 25B e 27).

**Figura 25** – Comparação entre os grupos CTL e ALD quanto ao percentual (%) de área de tecido ósseo mineralizado **(A)** e de matriz osteóide **(B)**. Valores expressos em média e desvio-padrão.

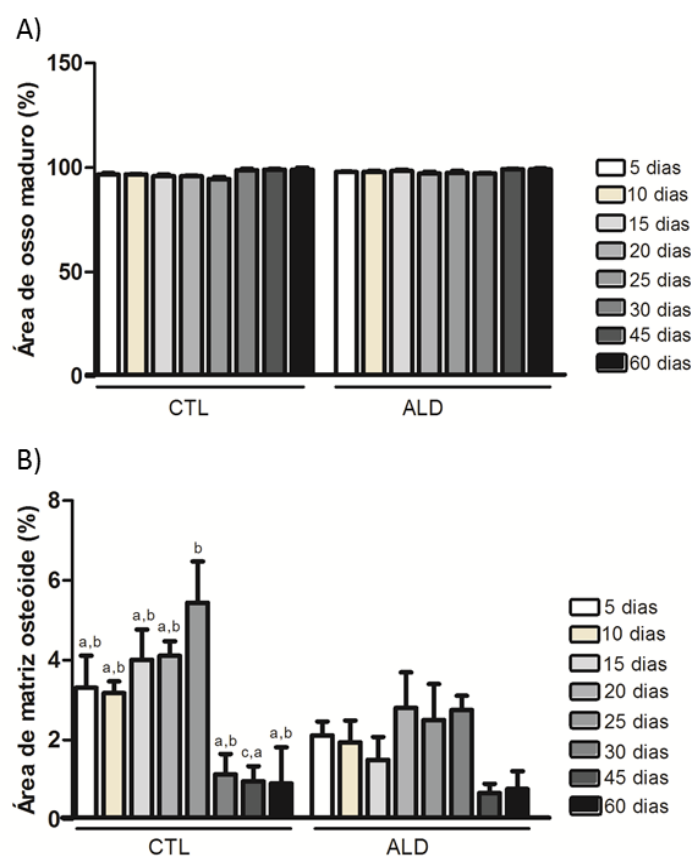


$p > 0,05$  – Teste de Mann-Whitney

Fonte: Autoria própria

Em relação à área de tecido ósseo mineralizado (osso maduro), na análise intragrupo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, tanto para o grupo CTL quanto para o ALD (Figuras 26A e 27). Da mesma forma, em relação à área de matriz osteóide, não foram verificadas diferenças entre os períodos para o grupo ALD. Porém, para o grupo CTL, os maiores valores de área de matriz osteóide foram observados aos 25 dias, enquanto o menor valor foi verificado aos 45 dias (Figuras 26B e 27).

**Figura 26** – Percentual (%) de área de tecido ósseo mineralizado (osso maduro) **(A)** e de matriz osteóide **(B)** para grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio-padrão.

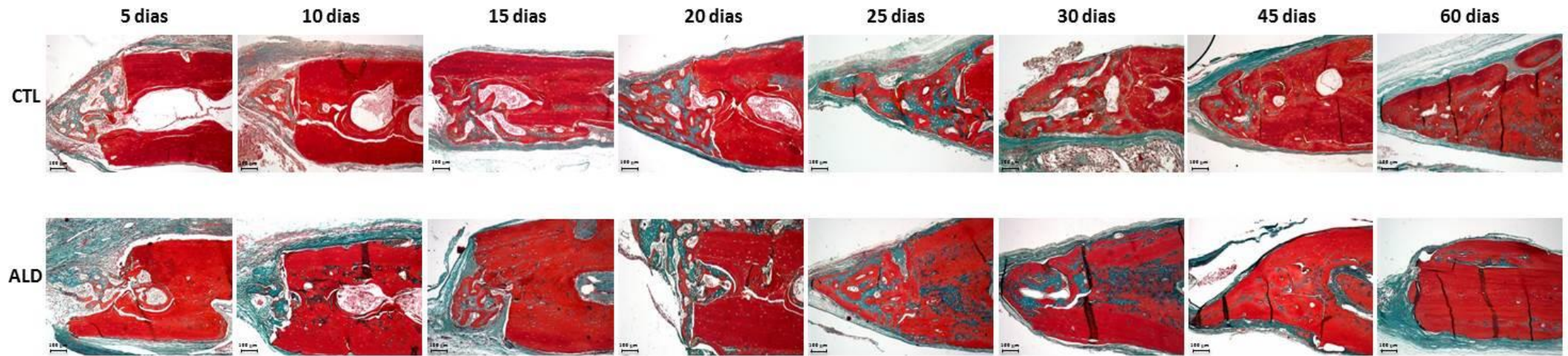


Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos, para cada grupo.

$p > 0,05$  – Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn

Fonte: Autoria própria

**Figura 27** – Fotomicrografias representativas das secções histológicas das bordas dos defeitos ósseos coradas com Tricrômico de Golder. A cor vermelha representa o osso mineralizado, enquanto a cor verde indica as regiões de matriz osteóide. Grupos controle (CTL) e alendronato (ALD). Barras: 100µm.

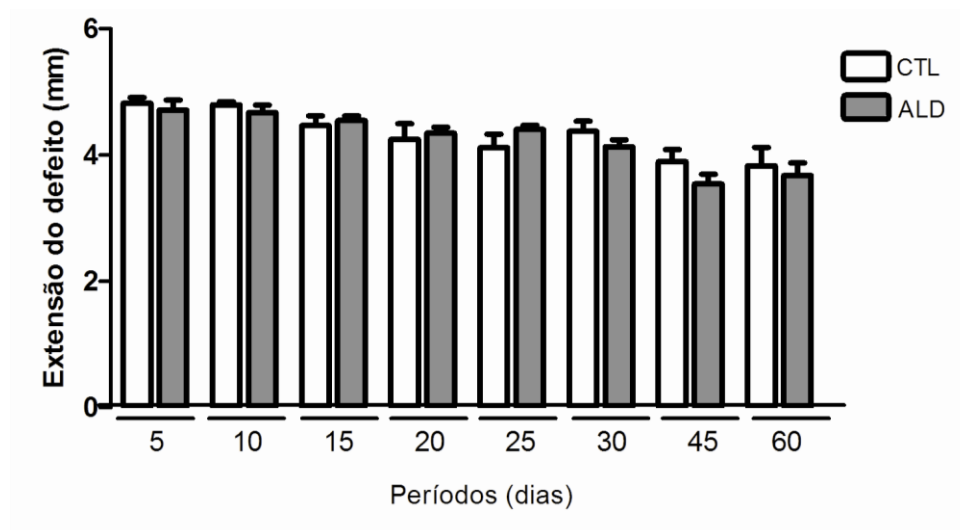


Fonte: Autoria própria

### Avaliação da distância linear entre as bordas do defeito

Na avaliação entre os grupos não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes quanto à distância linear entre as bordas do defeito (extensão do defeito ósseo) (Figura 28).

**Figura 28** – Comparação entre os grupos CTL e ALD quanto à distância linear (mm) entre as bordas do defeito (extensão do defeito ósseo). Valores expressos em média e desvio-padrão.

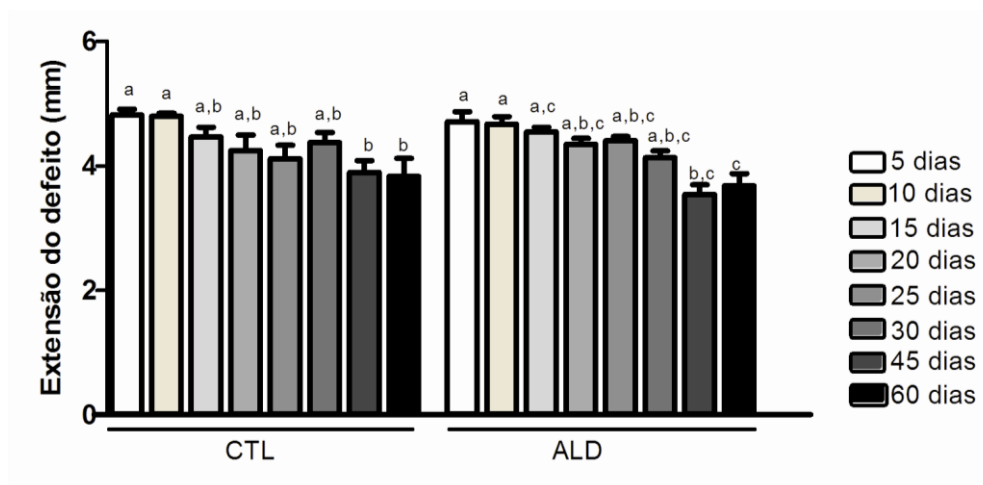


$p > 0,05$  – Teste de Mann-Whitney

Fonte: Autoria própria

Em relação à avaliação intragrupo, para o grupo CTL foi observado que os períodos de 45 e 60 dias apresentaram extensão significativamente menor do defeito em relação aos períodos de 5 e 10 dias. Para o grupo ALD, o período de 45 dias apresentou valores significativamente menores de extensão do defeito em relação aos períodos de 5, 10 e 15 dias. Da mesma forma, o período de 60 dias apresentou valores significativamente menores da extensão do defeito em relação aos períodos de 5 e 10 dias, sugerindo maior formação de tecido ósseo nos períodos finais (Figura 29).

**Figura 29** – Distância linear entre as bordas do defeito para grupos CTL e ALD, nos diferentes períodos de avaliação. Valores expressos em média e desvio-padrão.



Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre período para cada grupo.

$p < 0,05$  – Teste de Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn

Fonte: Autoria própria

### Análise morfológica

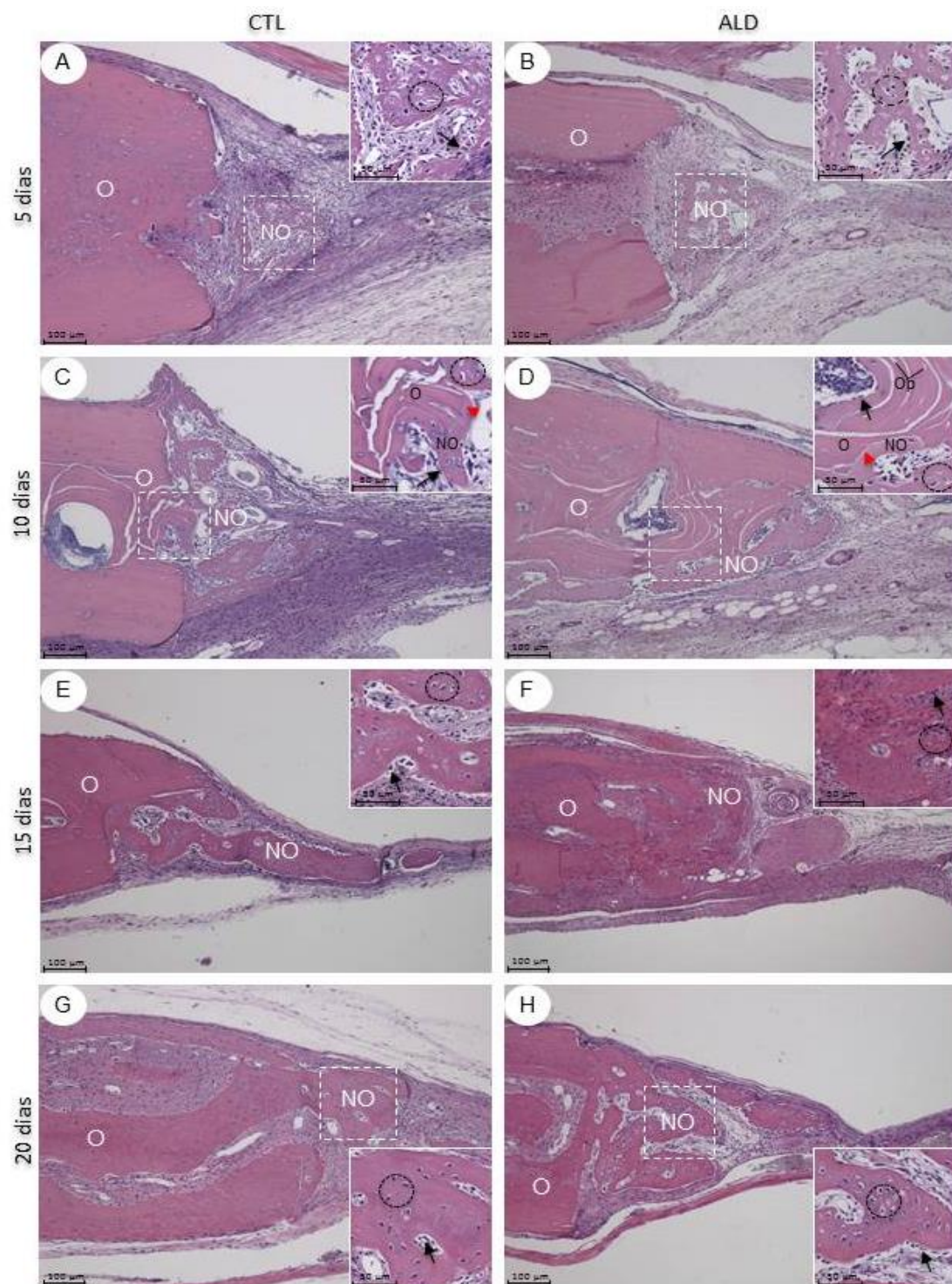
A análise de secções coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) indicou que aos 5, 10, 15 e 20 dias, nos grupos CTL (Figuras 30A, 30C, 30E e 30G) e ALD (Figuras 30B, 30D, 30F e 30H), adjacente ao osso cortical da calota, observou-se um novo tecido ósseo em formação, exibindo diversos osteoblastos, além de osteócitos, recém incorporados à matriz óssea. No período de 10 dias, no CTL foi possível notar íntima interação entre o osso da calota e o novo osso (Figura 30C – detalhe em maior aumento). Por outro lado, um “gap” entre o osso da calota e o novo osso foi encontrado no ALD (Figura 30D – detalhe em maior aumento). Além disso, no osso da calota havia presença de lacunas osteocíticas ou osteoplastos vazios (Figura 30D). Aos 20 dias, havia, aparentemente, maior número de osteócitos no ALD (Figura 30H) que no CTL

(Figura 30G). Além disso, estes osteócitos pareciam ter sido mais tardiamente incorporados o novo osso (Figura 30G).

Nos períodos de 25, 30, 45 e 60 dias, apesar de aparentemente não haver atraso significativo na formação óssea, os aspectos morfológicos do tecido ósseo indicaram fortemente que nos animais que receberam alendronato (ALD) (Figura 31B, 31D, 31F e 31H) houve um atraso no processo de remodelação óssea, ao longo dos períodos experimentais, em comparação aos animais do CTL (Figura 31A, 31C, 31E e 31G). Aos 25 e 30 dias, nos grupos CTL (Figura 31A e 31C, respectivamente) e ALD (31B e 31D, respectivamente), o novo osso formado exibia porções basófilas que permitiam distinguí-lo do osso da calota. Aos 30 dias, as regiões basófilas pareciam predominar no ALD (Figura 31D) em comparação ao CTL (Figura 31C). Nos períodos de 45 e 60 dias, as regiões basófilas foram observadas apenas no grupo ALD (Figura 31F). Além disso, apenas no ALD foram observados “gaps” entre o osso da calota e o novo osso (Figuras 31F e 31H – detalhes em maiores aumentos) e lacunas osteocíticas ou osteoplastos (Figura 31H – detalhe em maior aumento). No CTL, aos 45 (Figura 31E) e 60 dias (Figura 31G), o tecido ósseo apresentava aspecto homogêneo e osteócitos encontravam-se distribuídos pela matriz óssea (Figuras 31E e 31G - detalhes em maiores aumentos).

Aos 5, 10, 15 e 20 dias, nos grupos CTL (**A, C, E e G**) e ALD (**B, D, F e H**), adjacente ao osso cortical da calota (O), observa-se um novo tecido ósseo (NO) em formação. Em maiores aumentos das regiões delimitadas por retângulos pontilhados, é possível observar que o novo osso (NO) exibe diversos osteoblastos (setas), além de osteócitos (círculo pontilhado), recém incorporados à matriz óssea. Em **C**, no detalhe em maior aumento, observa-se íntima interação entre o osso da calota (O) e o novo osso (NO). Por outro lado, no detalhe em **D**, observa-se um “gap” entre o osso da calota (O) e o novo osso (NO) (cabeça de seta vermelha). Além disso, no osso da calota (O) há presença de lacunas osteocíticas ou osteoplastos (Op) vazios. Comparando-se os maiores aumentos das regiões delimitadas em **G** e **H**, mais especificamente os círculos pontilhados contendo os osteócitos, aparentemente, há maior número de osteócitos em **H**. Além disso, estes osteócitos parecem ter sido mais tardiamente incorporados ao novo osso (NO) formado (Figura 30).

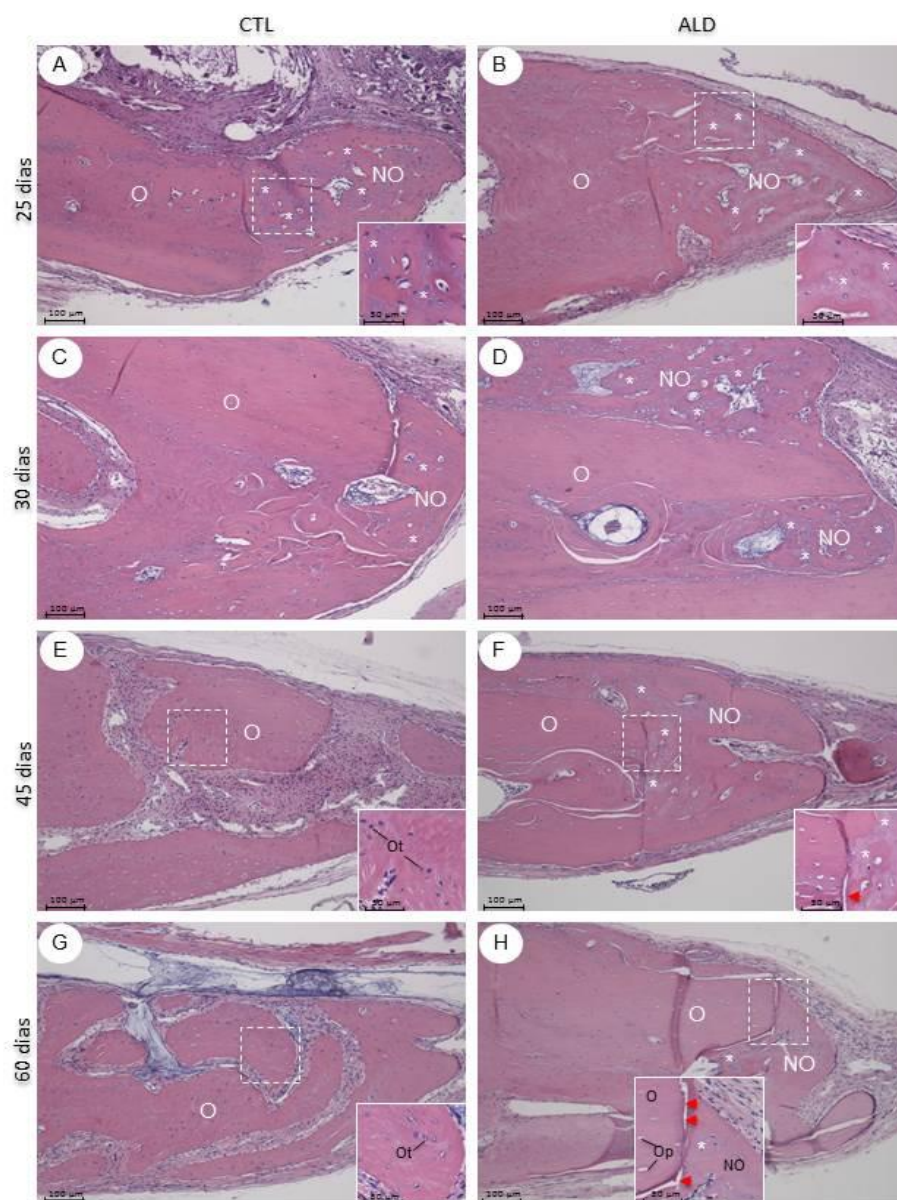
**Figura 30** -Fotomicrografias de secções de defeitos críticos confeccionados em calotas de ratos dos grupos controle (CTL) (**A, C, E e G**) e alendronato (ALD) (**B, D, F e H**).Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Barras: 100  $\mu$ m (figuras **A-H**) e 50  $\mu$ m (detalhes em maiores aumentos, delimitados por retângulos pontilhados nas figuras **A-H**).



Fonte: Autoria própria

Aos 25 e 30 dias, nos grupos CTL (**A e C**, respectivamente) e ALD (**B e D**, respectivamente), o novo osso formado (NO) exibe porções basófilas (asteriscos) que permitem distingui-lo do osso da calota (O). Em maior aumento das regiões de retângulos pontilhados em **A e B**, observa-se detalhes das porções basófilas (asteriscos) do novo osso (NO). Aos 30 dias, as regiões basófilas (asteriscos) parecem predominar no ALD (**D**) em comparação ao CTL (**C**). Nos períodos de 45 e 60 dias, as regiões basófilas (asteriscos) são observadas apenas no grupo ALD (**F e H**). Nos detalhes em **F e H**, observam-se “gaps” entre o osso da calota (O) e o novo osso (NO) (cabeça de seta vermelha). Além disso, no detalhe em **H**, nota-se no osso da calota (O) lacunas osteocíticas ou osteoplastos (Op) vazios. No CTL, aos 45 (**E**) e 60 dias (**G**), o tecido ósseo (O) apresenta aspecto homogêneo e osteócitos (Ot) encontram-se distribuídos pela matriz óssea (detalhes em maiores aumentos representam os retângulos pontilhados delimitados em **E e G**) (Figura 31).

**Figura 31** -Fotomicrografias de secções de defeitos críticos confeccionados em calotas de ratos dos grupos controle (CTL) (**A, C, E e G**) e alendronato (ALD) (**B, D, F e H**).Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Barras: 100  $\mu$ m (figuras **A-H**) e 50  $\mu$ m (detalhes em maiores aumentos, delimitados por retângulos pontilhados nas figuras **A, B, E, F, G e H**).



Fonte: Autoria própria

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente os bisfosfonatos têm sido amplamente indicados para o tratamento de diversas doenças ósseas, sendo o alendronato o tipo de BF empregado como terapia de primeira escolha para o tratamento da osteoporose<sup>12, 25, 113</sup>. Dessa forma, objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento com alendronato, a longo prazo, sobre o processo de reparo ósseo em calvárias de ratas e os mecanismos de atuação do medicamento sobre esse processo. Adicionalmente, foi avaliada a influência sistêmica da droga sobre a densidade mineral óssea e sobre os marcadores de remodelação óssea.

A escolha do período de duração do estudo (120 dias) teve como objetivo realizar uma projeção do tratamento com alendronato, a longo prazo, em humanos, visto que, de acordo com a literatura, um mês de vida de um rato adulto equivaleria a aproximadamente dois anos e meio para um ser humano<sup>6, 120</sup>. Portanto, o período de quatro meses no presente estudo seria equivalente a aproximadamente dez anos de tratamento com alendronato em seres humanos.

Para constatação do efeito sistêmico do alendronato, foi realizada a avaliação da densidade mineral óssea (BMD) por DXA, que tem sido considerado um dos métodos mais eficazes no diagnóstico da osteoporose<sup>7, 53, 95, 115</sup>. Em relação ao efeito do alendronato sobre a BMD global e sobre as regiões avaliadas, foi observado que, para a maioria dos períodos avaliados, o grupo alendronato (ALD) apresentou maiores valores de BMD em relação ao controle. Foi também constatado que no grupo ALD houve um aumento da densidade óssea ao longo dos períodos avaliados, o que não foi verificado para o grupo controle. Esses resultados estão de acordo com diversos estudos que similarmente observaram um efeito benéfico dos BFs sobre a densidade mineral óssea<sup>8, 13, 51, 73, 76</sup>. Dessa forma, pôde-se constatar o efeito sistêmico da droga e foi verificado que o medicamento foi capaz de promover um aumento da densidade mineral óssea nos animais tratados.

Para constatação da ação do medicamento sobre o metabolismo ósseo, foi realizada a análise de marcadores bioquímicos de reabsorção e formação óssea. Os resultados demonstraram que, para o marcador de reabsorção CTX, não houve diferença significativa entre os grupos na maioria dos períodos avaliados. Porém, nos períodos de 45 e 60 dias esses valores foram estatisticamente maiores para o grupo CTL em relação

ao grupo ALD, demonstrando diminuição do processo de remodelação nos períodos finais. Além disso, a avaliação intragrupo demonstrou um padrão mais definido de remodelação para o grupo controle em comparação ao grupo ALD.

Para o marcador de reabsorção DPD, até os 45 dias, foram observados menores valores para o grupo ALD em comparação ao grupo CLT, demonstrando o efeito da droga na redução do processo de reabsorção óssea. Diversos estudos na literatura corroboram essa capacidade dos bifosfonatos em diminuir os níveis desses marcadores e mostram que essa diminuição ocorre ao longo do tempo<sup>19, 29, 106, 122</sup>, porém deve-se levar em consideração que muitas vezes esses estudos são realizados em humanos e que há diferenças em relação à metodologia aplicada, tempo de avaliação e dosagem do medicamento.

Embora ambos sejam reconhecidos como confiáveis marcadores de reabsorção óssea, a diferença entre os resultados referentes ao CTX e à DPD podem ser explicados pelo fato de que a DPD pode ser considerada como o mais específico dos marcadores ósseos e que apresenta maior estabilidade na obtenção bem como na manutenção e estocagem das amostras. Quanto ao CTX, embora seja considerado sensível, também é considerado o mais variável marcador de reabsorção óssea<sup>11</sup>.

Na análise dos marcadores de formação óssea foi observado para a osteocalcina (OCN), que o grupo ALD apresentou menores valores desse marcador em relação ao CTL. Foi observada, ainda, uma queda desses níveis ao longo dos períodos para o grupo ALD, com os menores valores ocorrendo aos 45 e 60 dias. Para o marcador P1NP, de um modo geral, o grupo ALD também apresentou menores valores. Esses resultados estão de acordo com outros obtidos na literatura, que observaram declínio tanto nos marcadores de reabsorção quanto de formação óssea, o que sugere que a ação dessa classe de medicamentos ocorre não somente sobre o processo de reabsorção, mas também sobre a neoformação óssea<sup>21, 29, 41, 50, 54, 102</sup>.

O presente estudo buscou avaliar o efeito do alendronato sobre o processo de reparo ósseo em defeitos confeccionados nas calvárias dos animais. Para isso, foram empregadas metodologias procurando elucidar mecanismos e alterações no fechamento do defeito.

Para avaliação da quantidade de osteoclastos, foi empregado o método de imunocitoquímica para detecção de células positivas para a enzima tartarato resistente (TRAP). Foi observado que, na grande maioria dos períodos, o grupo ALD apresentou menores quantidades de células TRAP+ em relação ao CTL, com tendência a se igualar nos períodos finais, porém sem diferenças significantes. Adicionalmente, foi observado que ao longo dos períodos avaliados, para ambos os grupos, houve queda na quantidade de osteoclastos, com os menores valores sendo observados nos períodos mais longos, demonstrando que o recrutamento da referida célula diminuiu com a evolução do processo de reparo, como esperado. Esses achados condizem com os resultados obtidos em estudos que avaliaram o efeito dos BFs sobre os osteoclastos. No estudo de Hikita et al.<sup>58</sup> (2009), ratos que foram submetidos ao tratamento com alendronato apresentaram quantidades menores de células TRAP+/área de tecido ósseo em relação aos animais que receberam solução salina (controle), sendo que nos períodos finais avaliados (7 e 14 dias) houve uma diminuição da diferença entre os grupos. Diversos estudos têm estudado o mecanismo de ação da droga, demonstrando que o efeito sobre a reabsorção óssea se dá principalmente por meio dos osteoclastos, levando à inibição de sua função e diferenciação e pela indução à apoptose<sup>1, 81, 99, 102, 140</sup>. Os resultados do presente estudo podem, ainda, ser correlacionados aos dos marcadores sistêmicos de reabsorção, nos quais, de um modo geral, o grupo ALD apresentou menores níveis.

Para avaliação da diferenciação osteoblástica, foi analisada por imunohistoquímica a expressão de RUNX2, um importante fator de transcrição. Foi verificado que o tratamento com alendronato diminuiu os níveis desse marcador em relação ao grupo controle em praticamente todos os períodos avaliados tendo, portanto, um efeito inibitório sobre a diferenciação dessas células. Essa redução está de acordo com os marcadores sistêmicos de formação, nos quais também foram verificados menores níveis em relação ao grupo controle. Na literatura, os achados em relação ao efeito dos BFs sobre os osteoblastos são controversos. No estudo de Shoji et al.<sup>121</sup> (2010), foi verificado que o tratamento com alendronato em ratos, em um modelo de doença de Paget juvenil, promoveu uma inibição sistêmica e local da atividade dos osteoblastos. Em outro estudo realizado com ALD e pamidronato, porém *in vitro*, foi verificado que esses BFs têm um potente efeito inibitório sobre células de linhagem osteoblástica<sup>60</sup>. Já em relação ao ácido zoledrônico, tanto por análise *in vivo* quanto *in vitro*, foi verificado que a droga promoveu diminuição da função dos osteoblastos,

sendo que paralelamente foi observada diminuição nos níveis sistêmicos de osteocalcina<sup>102</sup>). Em contraste, outros estudos observaram efeitos positivos dos BFs sobre essas células, promovendo estímulos sobre sua diferenciação e atividade<sup>40, 69</sup> e prevenindo sua apoptose<sup>9, 101</sup>. As diferenças em relação à concentração e tipo dos medicamentos usados podem explicar os contrastes quanto aos resultados verificados, porém mais importante ainda são as diferenças metodológicas e a via que foi alvo de avaliação desses estudos, pois ainda permanece incerto o mecanismo pelo qual os BFs agem sobre os osteoblastos. Também não está claro se os medicamentos agem diretamente sobre essas células ou se o efeito ocorre de forma indireta, ou seja, se o efeito sobre essas células ocorre como consequência indireta da diminuição da atividade dos osteoclastos, como foi sugerido por Matsunobu et al.<sup>85</sup>(2009).

O óxido nítrico é uma substância produzida por várias células do organismo humano, inclusive pelos macrófagos, como resposta a estímulos inflamatórios ou injúrias teciduais e que pode ter efeitos benéficos (infecções) ou, em concentrações altas, tóxicos para o organismo. É responsável ainda pela dilatação dos vasos sanguíneos. A enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzível) é expressa apenas em situações em que as células são induzidas por citocinas ou produtos microbianos, sendo que uma vez induzida é capaz de produzir óxido nítrico imediatamente<sup>89</sup>. Na análise por imunohistoquímica de iNOS, pode-se detectar menor expressão desse marcador no grupo ALD em relação ao grupo CTL, em todos os períodos analisados. A expressão por imunohistoquímica de iNOS em ratas sob terapia com alendronato também foi avaliada por Silva et al.<sup>123</sup>(2014) e, embora a análise tenha sido realizada na mucosa gástrica, foi detectada menor expressão de iNOS em animais tratados em relação aos animais controle (solução salina). Com cautela, pode-se inferir que o alendronato exerceu um papel prejudicial na resposta inflamatória local, visto que houve menor expressão de iNOS, consequentemente houve menor produção de óxido nítrico e seus efeitos fisiológicos podem ter sido atenuados.

Em relação à Cathepsina K, uma protease expressa no osteoclasto e que é associada ao processo de reabsorção óssea, devido ao fato que é a maior responsável pela degradação do colágeno tipo I<sup>39</sup>, foi verificado que nos períodos iniciais, na análise entre os grupos, houve maior expressão desse marcador no grupo ALD, com diferença estatisticamente significativa no período de 15 dias. No entanto, a partir dos 20 dias houve uma inversão do quadro, com expressão significativamente maior desse marcador

no grupo CTL nos períodos de 20 e 45 dias. Estes resultados correlacionam com os resultados dos marcadores de reabsorção óssea, uma vez que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a inibição da catepsina K está relacionada à redução da reabsorção e aumento da massa óssea<sup>11</sup>. Na avaliação ao longo dos períodos, os maiores valores desse marcador no grupo CTL foram observados no período de 20 dias. No grupo ALD, foi observada uma redução significativa na expressão de Cathepsina K aos 20, 25 e 30 dias em relação aos 15 dias. Têm sido desenvolvidos medicamentos para tratamento de distúrbios ósseos que agem inibindo a Cathepsina K e, embora ainda estejam em fase de testes, alguns estudos demonstram que a inibição dessa protease está associada ao aumento na densidade mineral óssea, inclusive em humanos<sup>38, 92</sup>. Porém, são escassos os estudos que avaliaram o efeito dos BFs sobre essas proteases. No estudo que avaliou o efeito do Pamidronato, em modelo de movimento dental em ratos, foi verificado que a administração desse BF diminuiu a expressão de Cathepsina K na área de borda franjada dos osteoclastos e sua expressão por essas células<sup>117</sup>. No estudo de Muñoz-Torres et al.<sup>90</sup>(2009), foi verificado que houve uma redução dos níveis séricos de Cathepsina K aos 3 (17%), 6 (22%) e 12 (41%) meses após o início do tratamento com alendronato, em mulheres em período pós menopausa e portadoras de osteoporose. Embora os mecanismos que atuam sobre a Cathepsina K ainda precisem ser melhor explicados, pode-se sugerir que os BFs têm um papel importante na redução da degradação da matriz orgânica do tecido ósseo.

Em relação à análise do marcador de reabsorção óssea RANKL, foram verificados menores valores deste para o grupo ALD, na grande maioria dos períodos avaliados. No entanto, no período de 45 dias( $p<0,05$ ) o grupo ALD apresentou valores significativamente maiores em relação ao grupo CTL. Na avaliação intragrupo, para o grupo CTL os maiores valores de imunomarcagem de RANKL foram verificados aos 15 e 20 dias, enquanto para o grupo ALD, os maiores valores foram detectados aos 15 e 45 dias. A ação dos BFs sobre os osteoclastos tem sido investigada e confirmada, como no estudo *in vitro* de Breuil et al.<sup>18</sup> (1998), no qual foi avaliado o efeito do ALD sobre células mononucleares sanguíneas periféricas de mulheres em fase pós-menopausa. Os autores verificaram que o alendronato foi efetivo em diminuir a reabsorção óssea, diminuindo a atividade dos osteoclastos, porém houve pouca alteração em relação ao número de osteoclastos, ou seja, exerceu pouco efeito sobre o recrutamento dessa célula. No presente estudo, verificou-se que o medicamento promoveu diminuição da

expressão de RANKL, sugerindo diminuição da diferenciação de osteoclastos, porém, também foi verificada uma diminuição da quantidade dessas células em relação ao CTL. Resultados similares foram obtidos em um estudo que avaliou o efeito da combinação da administração de 70mg/semana da droga com cálcio e vitamina D, em mulheres com osteoporose e em idade pós-menopausa. Foi observada uma diminuição dos níveis séricos de RANKL e OPG após 3 e 12 meses de tratamento. Na fase *in vitro* do estudo, foi observado que essa combinação teve efeito de redução da formação e recrutamento de osteoclastos<sup>27</sup>.

Em relação à OPG, um inibidor da reabsorção óssea, foi verificado, na maioria dos períodos, maior imunomarcção no grupo ALD em relação ao CTL, o que está relacionado à redução nos marcadores de reabsorção óssea e maior densidade óssea. Adicionalmente à análise para RANKL e OPG, foi avaliada a proporção dos valores de imunomarcção entre esses dois anticorpos (razão RANKL:OPG). No sistema em que se obtém maiores valores dessa razão, há uma tendência ao favorecimento da osteoclastogênese, podendo indicar maior tendência à reabsorção<sup>67</sup>. No presente estudo, foi verificado que o grupo CTL apresentou maiores valores da razão RANKL:OPG em relação ao grupo ALD, com valores significativamente maiores aos 20 ( $p<0,05$ ), 25 ( $p<0,05$ ) e 60 dias ( $p<0,05$ ). Aos 45 dias ( $p<0,05$ ), o grupo ALD apresentou valor de razão estatisticamente maior em relação ao CTL. Sabe-se que a expressão de RANKL é essencial para que ocorra a diferenciação dos osteoclastos<sup>67</sup>, podendo ter efeito inclusive na prevenção de sua apoptose<sup>127</sup>. Os resultados obtidos no presente estudo em relação aos níveis de RANKL e OPG, estão de acordo com estudos que sugerem o efeito dos BFs sobre essa via, nos quais pôde-se verificar que esses medicamentos reduziram a expressão de RANKL no processo alveolar maxilar de ratos<sup>16</sup> e a expressão transmembrana de RANKL e promoveram o aumento da secreção de OPG, em células semelhantes a osteoblastos<sup>97</sup>.

A OPN é uma proteína não-colágena produzida principalmente pelos osteoblastos e que tem a capacidade de promover a ligação de células ósseas aos cristais minerais presentes na matriz óssea<sup>33, 125</sup>. No osso, é produzida nos estágios finais de maturação dos osteoblastos, o que corresponde aos estágios de formação de matriz, antes do processo de mineralização<sup>11</sup>. É considerada como um regulador negativo da função osteogênica e possui capacidade de inibir a formação mineral *in vitro*. Em cultura de células, alguns bifosfonatos (alendronato e zoledronato) foram capazes de

regular negativamente a expressão de osteopontina<sup>75</sup>. No presente estudo foi verificado que, na maioria dos períodos, houve maior expressão desse marcador no grupo CTL em relação ao ALD. Porém, nos períodos finais, aos 45 e 60 dias houve inversão desse quadro, com o grupo ALD apresentando valores de imunomarcacão significativamente maiores em relação ao CLT. No grupo controle observou-se diminuicão da expressão de OPN nos períodos finais de avaliacão, enquanto no grupo alendronato observou-se que a menor expressão de OPN ocorreu nos períodos iniciais, demonstrando uma alteracão do processo de formacão e mineralizacão óssea para o grupo ALD. Esses resultados contrastam com os de D'Aoust et al.<sup>28</sup> (2000) que observou que o tratamento com etidronato aumentou a expressão de OPN no osso parietal de ratos, sugerindo assim um aumento na diferenciacaão de osteoblastos. No entanto, deve-se levar em conta que em nosso estudo o medicamento empregado foi o alendronato, ao passo que no estudo acima citado, foi empregado o etidronato, o qual tem sido relatado como tendo maior afinidade de ligacão à superfície dos osteoblastos do que aos osteoclastos<sup>83</sup>. Em um estudo realizado com alendronato, porém com dose de 2,5mg/kg, portanto maior do que a empregada no presente estudo, foi avaliado o efeito do medicamento sobre o reparo ósseo em sítios de extração em ratas, não tendo sido verificada diferença entre grupo tratado e controle em relação à imunomarcacão de OPN<sup>141</sup>. Os resultados em conjunto (OPN, RUNX2, RANKL:OPG e sistêmico) demonstram a capacidade do alendronato em alterar os fatores envolvidos no processo de remodelacão óssea.

Na análise do VEGF, foi observado de um modo geral, maior imunomarcacão desse anticorpo no grupo ALD em relação ao controle. A partir dos 45 dias a diferença entre os grupos quanto aos níveis desse marcador aumentaram, com valores significativamente maiores para o grupo ALD, sugerindo que o medicamento, na dose empregada nesse estudo, pode apresentar um efeito a longo prazo sobre o VEGF. Na análise intragrupo, verificou-se que no grupo controle os maiores níveis desse marcador foram observados no período de 5 dias, seguido de uma diminuicão ao longo dos períodos. Para o grupo alendronato, também verificou-se que os maiores valores ocorreram aos 5 dias, porém observou-se uma leve tendência a um aumento na expressão de VEGF a partir dos 20 dias. O efeito dos bisfosfonatos sobre o VEGF tem sido alvo de investigacão, principalmente pelo fato de que a diminuicão da vascularizacão tem sido apontada como uma teoria para explicar a ocorrência de osteonecrose em pacientes tratados com BFs<sup>139</sup>. Diversos estudos, contrastando com os

resultados aqui apresentados, demonstram o efeito anti-angiogênico dos BFs<sup>47, 87, 116</sup>. No entanto, é válido ressaltar que a grande maioria dos estudos investigam o zoledronato, um dos mais potentes BFs, cujo efeito anti-angiogênico é altamente importante, visto que é um medicamento usado principalmente no tratamento de prevenção de metástases ósseas<sup>132</sup>.

Para avaliação do efeito do medicamento especificamente sobre o fechamento do defeito ósseo criado, foram avaliados os percentuais de osso maduro e matriz osteóide. Não foram verificadas diferenças significantes entre os grupos quanto ao percentual de osso maduro. Em relação à matriz osteóide, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao percentual de matriz osteóide, pôde-se observar que, na maioria dos períodos, o grupo CTL apresentou maiores valores, os quais tenderam a se igualar. Os resultados quanto ao percentual de matriz osteóide podem ser considerados compatíveis com a expressão de RUNX2 e OPN.

Em relação à avaliação da distância linear entre as bordas do defeito, na análise intragrupo foi constatado que, para ambos os grupos, os períodos mais longos apresentaram os menores valores, sendo este o resultado esperado. Evidencia-se, entretanto, um relativo atraso no fechamento do defeito para o grupo ALD em relação ao CTL. Quanto à análise entre grupos, não foram observadas diferenças significantes. No entanto, foi observado que nos períodos de 30 a 60 dias, o grupo ALD apresentou extensão linear do defeito ligeiramente menor em relação ao CTL, sugerindo assim que houve uma tendência ao maior fechamento do defeito para o grupo ALD nos períodos finais.

A análise morfológica evidenciou as diferenças entre os aspectos morfológicos do tecido ósseo entre os 2 grupos, sugerindo um relativo atraso no processo de remodelação óssea no grupo ALD. Enquanto, o grupo CTL apresentou um tecido ósseo mais homogêneo, com uma nítida interação entre o osso remanescente e o osso neoformado, o grupo ALD em grande parte dos períodos avaliados apresentou maior quantidade de lacunas osteocíticas, com uma incorporação aparentemente mais tardia dos osteócitos ao osso novo. Foi observado ainda que apenas no grupo ALD, em diversos períodos avaliados, houve a presença de “gaps” entre o osso da calota e o osso neoformado.

Esses eventos, em conjunto com os achados obtidos nos períodos iniciais de avaliação do percentual de matriz osteóide, da expressão do marcador OPN e da expressão sistêmica de OCN, que é uma proteína associada à mineralização da matriz osteóide<sup>119</sup>, sugerem que o medicamento pode promover um atraso no início do processo de reparo na região da calvária. Tais achados podem ser explicados justamente pelo mecanismo de ação da droga, observado nesse estudo, no qual o ALD além de promover diminuição da razão RANKL:OPG em praticamente todos os períodos avaliados, levou à redução também dos níveis de marcadores sistêmicos, comprovando o efeito inibitório do medicamento sobre a reabsorção óssea. Adicionalmente, observou-se diminuição da expressão do marcador de diferenciação osteoblástica, RUNX2, demonstrando que esse atraso no início do reparo pode estar associado a um efeito do ALD tanto sobre a diminuição da reabsorção quanto da formação óssea, ou seja, sobre o processo de remodelação como um todo. Eventos similares foram observados em estudos nos quais foi constatado que, a aplicação local de alendronato em ratos<sup>58</sup> ou a administração sistêmica do medicamento em ratas<sup>3</sup>, promoveu um atraso no início do reparo ósseo, enquanto a administração sistêmica do medicamento em ratos, resultou em menor quantidade de osso neoformado na região apical<sup>141</sup> em sítios de extração desses animais. Similarmente, estudos que avaliaram a aplicação local de BFs, associados a materiais de enxerto, também verificaram efeitos negativos desses medicamentos<sup>22</sup> ou que o medicamento não favoreceu o processo de reparo ósseo na região<sup>131</sup>. Tem sido relatado ainda o efeito desses medicamentos em promover a supressão do turnover ósseo em sítios de extração e em regiões adjacentes à instalação de mini-implantes<sup>59</sup>. Em contraste, tem sido relatado o efeito benéfico da administração do medicamento não só sobre o reparo ósseo, mas também sobre a osseointegração de implantes<sup>52, 63, 94, 135</sup>. No entanto, cabe ressaltar que a grande maioria dos estudos citados que observaram efeitos benéficos dos BFs sobre o processo de reparo e sobre a densidade óssea, foram realizados com modelos de deficiência estrogênica. Pode-se, portanto, inferir que esses medicamentos podem promover benefícios em relação ao reparo e manutenção e aumento de densidade óssea em sistemas que já apresentam alterações que prejudiquem esses fatores. Em contraste, no presente estudo foram usadas ratas que não foram submetidas à ovariectomia, ou seja, sem deficiência estrogênica.

Pode-se concluir que o alendronato, na dose de 1mg/kg/semana, resultou em diminuição tanto dos fatores relacionados à reabsorção quanto dos fatores relacionados

à formação óssea, prejudicando o processo de remodelação óssea em calvárias de ratas. Tais resultados alertam para possíveis alterações no processo de remodelação óssea em pacientes que utilizam o medicamento para outras desordens, além da deficiência estrogênica.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, foi possível concluir que o tratamento, a longo prazo, com administração sistêmica de alendronato:

- 1) Foi efetivo em promover aumento da densidade mineral óssea;
- 2) Promoveu alteração no processo de reparo dos defeitos ósseos na calvária, com relativa tendência ao atraso nos períodos iniciais e maior fechamento nos períodos finais;
- 3) Resultou em prejuízo ao processo de remodelação óssea, evidenciado pela redução de marcadores locais e sistêmicos.

## REFERÊNCIAS\*

1. Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, et al. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med*. 2012; 29(6): 1007-15.
2. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Effect of local vs. systemic bisphosphonate delivery on dental implant fixation in a model of osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*. 2013; 92(3): 279-83.
3. Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit AC, Wronski TJ. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis*. 2010; 16(7): 674-85.
4. Akyol UK, Sipal S, Demirci E, Gungormus M. The influence of low-level laser therapy with alendronate irrigation on healing of bone defects in rats. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(3): 1141-6.
5. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*. 2005; 146(3): 1226-35.
6. Andreollo NA, Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig*. 2012; 25(1): 49-51.
7. Arceo-Mendoza RM, Camacho P. Prediction of fracture risk in patients with osteoporosis: a brief review. *Womens Health (Lond)*. 2015; 11(4): 477-82; quiz 83-4.

\*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

8. Ayan M, Dolanmaz D, Mihmanli A, Ayan A, Kurkcu M. The effect of systemically administrated zoledronic acid on the osseointegration of dental implants. *Oral Dis.* 2012; 18(8): 802-8.
9. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone.* 2011; 49(1): 50-5.
10. Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 373(1): 231-41.
11. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. Principles of bone biology: two-volume set. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2008.
12. Black DM, Thompson DE, Bauer DC, Ensrud K, Musliner T, Hochberg MC, et al. Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(11): 4118-24.
13. Boivin G, Meunier PJ. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002; 2(6): 538-43.
14. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2004; 350(12): 1189-99.
15. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2): 139-46.
16. Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Arana-Chavez VE. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell Tissue Res.* 2013; 353(1): 79-86.

17. Brennan O, Kennedy OD, Lee TC, Rackard SM, O'Brien FJ. Effects of estrogen deficiency and bisphosphonate therapy on osteocyte viability and microdamage accumulation in an ovine model of osteoporosis. *J Orthop Res.* 2011; 29(3): 419-24.
18. Breuil V, Cosman F, Stein L, Horbert W, Nieves J, Shen V, et al. Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(11): 1721-9.
19. Chailurkit LO, Jongjaroenprasert W, Rungbunnapun S, Ongphiphadhanakul B, Sae-tung S, Rajatanavin R. Effect of alendronate on bone mineral density and bone turnover in Thai postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2003; 21(6): 421-7.
20. Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcene A. Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochem J.* 2004; 384(Pt 3): 591-8.
21. Choi HJ, Im JA, Kim SH. Changes in bone markers after once-weekly low-dose alendronate in postmenopausal women with moderate bone loss. *Maturitas.* 2008; 60(2): 170-6.
22. Choi JY, Kim HJ, Lee YC, Cho BO, Seong HS, Cho M, et al. Inhibition of bone healing by pamidronate in calvarial bony defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103(3): 321-8.
23. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, A SB, Guimaraes M, Marcantonio E, Jr. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013; 94(1): 65-73.

24. Corrado A, Neve A, Maruotti N, Gaudio A, Marucci A, Cantatore FP. Dose-dependent metabolic effect of zoledronate on primary human osteoblastic cell cultures. *Clin Exp Rheumatol*. 2010; 28(6): 873-9.
25. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2014; 25(10): 2359-81.
26. Cranney A, Wells G, Willan A, Griffith L, Zytaruk N, Robinson V, et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women. *Endocr Rev*. 2002; 23(4): 508-16.
27. D'Amelio P, Grimaldi A, Cristofaro MA, Ravazzoli M, Molinatti PA, Pescarmona GP, et al. Alendronate reduces osteoclast precursors in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2010; 21(10): 1741-50.
28. D'Aoust P, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res*. 2000; 302(3): 353-63.
29. da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V. Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(8): 1015-22.
30. Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther*. 2013; 7: 435-48.
31. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008; 61(5): 577-87.

32. de Villiers TJ, Gass ML, Haines CJ, Hall JE, Lobo RA, Pierroz DD, et al. Global Consensus Statement on menopausal hormone therapy. *Maturitas*. 2013; 74(4): 391-2.
33. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*. 1998; 30-31: 92-102.
34. dos Santos PL, Queiroz TP, Margonar R, Gomes de Souza Carvalho AC, Okamoto R, de Souza Faloni AP, et al. Guided implant surgery: what is the influence of this new technique on bone cell viability? *J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 71(3): 505-12.
35. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83(9): 1032-45.
36. Drake MT, Cremers SC. Bisphosphonate therapeutics in bone disease: the hard and soft data on osteoclast inhibition. *Mol Interv*. 2010; 10(3): 141-52.
37. Duarte PM, de Vasconcelos Gurgel BC, Sallum AW, Filho GR, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. *J Periodontol*. 2005; 76(1): 107-14.
38. Duong le T, Leung AT, Langdahl B. Cathepsin K Inhibition: A New Mechanism for the Treatment of Osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 2016; 98(4): 381-97.
39. Duong LT. Therapeutic inhibition of cathepsin K-reducing bone resorption while maintaining bone formation. *Bonekey Rep*. 2012; 1: 67.
40. Duque G, Rivas D. Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(10): 1603-11.

41. Eastell R, Walsh JS, Watts NB, Siris E. Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Bone*. 2011; 49(1): 82-8.
42. Esteves JC, Marcantonio E, Jr., de Souza Faloni AP, Rocha FR, Marcantonio RA, Wilk K, et al. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med*. 2013; 11: 221.
43. Faloni A, Cerri P. Cellular and molecular mechanisms of the estrogen in the bone resorption. *Rev Odontol UNESP*. 2007; 36(2): 181-8.
44. Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Quim Nova*. 2005; 28: 274-80.
45. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev*. 1998; 19(1): 80-100.
46. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*. 2002; 4(1): 30-4.
47. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res*. 2002; 62(22): 6538-44.
48. Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(9): 1358-67.
49. Giger EV, Castagner B, Leroux JC. Biomedical applications of bisphosphonates. *J Control Release*. 2013; 167(2): 175-88.

50. Giro G, Coelho PG, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E, Jr., Orrico SR. The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(3): 259-64.
51. Giro G, Goncalves D, Sakakura CE, Pereira RM, Marcantonio Junior E, Orrico SR. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(2): 162-7.
52. Giro G, Sakakura CE, Goncalves D, Pereira RM, Marcantonio E, Jr., Orrico SR. Effect of 17beta-estradiol and alendronate on the removal torque of osseointegrated titanium implants in ovariectomized rats. *J Periodontol.* 2007; 78(7): 1316-21.
53. Gourlay ML, Fine JP, Preisser JS, May RC, Li C, Lui LY, et al. Bone-density testing interval and transition to osteoporosis in older women. *N Engl J Med.* 2012; 366(3): 225-33.
54. Grey A, Bolland MJ, Wattie D, Horne A, Gamble G, Reid IR. The antiresorptive effects of a single dose of zoledronate persist for two years: a randomized, placebo-controlled trial in osteopenic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(2): 538-44.
55. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1092: 385-96.
56. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003; 423(6937): 349-55.

57. Hegde V, Jo JE, Andreopoulou P, Lane JM. Effect of osteoporosis medications on fracture healing. *Osteoporos Int*. 2016; 27(3): 861-71.
58. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab*. 2009; 27(6): 663-72.
59. Huja SS, Kaya B, Mo X, D'Atri AM, Fernandez SA. Effect of zoledronic acid on bone healing subsequent to mini-implant insertion. *Angle Orthod*. 2011; 81(3): 363-9.
60. Idris AI, Rojas J, Greig IR, Van't Hof RJ, Ralston SH. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2008; 82(3): 191-201.
61. Iglesias JE, Salum FG, Figueiredo MA, Cherubini K. Important aspects concerning alendronate-related osteonecrosis of the jaws: a literature review. *Gerodontology*. 2015; 32(3): 169-78.
62. Ishtiaq S, Edwards S, Sankaralingam A, Evans BA, Elford C, Frost ML, et al. The effect of nitrogen containing bisphosphonates, zoledronate and alendronate, on the production of pro-angiogenic factors by osteoblastic cells. *Cytokine*. 2015; 71(2): 154-60.
63. Jee JH, Lee W, Lee BD. The influence of alendronate on the healing of extraction sockets of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 110(2): e47-53.
64. Karadag-Saygi E, Akyuz G, Bizargity P, Ay P. The effect of risedronate treatment on serum osteoprotegerin and bone marker levels in postmenopausal women with osteoporosis. *Gynecol Endocrinol*. 2011; 27(12): 1033-6.

65. Kim JH, Park YB, Li Z, Shim JS, Moon HS, Jung HS, et al. Effect of alendronate on healing of extraction sockets and healing around implants. *Oral Dis.* 2011; 17(7): 705-11.
66. Kim YH, Kim GS, Jeong-Hwa B. Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med.* 2002; 34(2): 145-51.
67. Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009; 19(1): 61-72.
68. Koch FP, Merkel C, Al-Nawas B, Smeets R, Ziebart T, Walter C, et al. Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner--a quantitative in vitro gene expression analysis of *Dlx5*, *Runx2*, *OCN*, *MSX1* and *MSX2*. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011; 39(8): 562-9.
69. Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, et al. Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. *J Endocrinol.* 2013; 219(2): 145-58.
70. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(1): 49-60.
71. Kwon TG, Lee CO, Park JW, Choi SY, Rijal G, Shin HI. Osteonecrosis associated with dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(5): 632-40.
72. Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Schwartz-Arad D, Peleg O, Yarom N. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(4): 790-6.

73. Liberman UA, Weiss SR, Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med.* 1995; 333(22): 1437-43.
74. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone.* 1996; 18(2): 75-85.
75. Lindtner RA, Tieden AN, Genelin K, Ebner HL, Manzl C, Klawitter M, et al. Osteoanabolic effect of alendronate and zoledronate on bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from aged female osteoporotic patients and its implications for their mode of action in the treatment of age-related bone loss. *Osteoporos Int.* 2014; 25(3): 1151-61.
76. Lucisano MP, Nelson-Filho P, Morse L, Battaglino R, Watanabe PC, Silva RA, et al. Radiodensitometric and DXA analyses for the measurement of bone mineral density after systemic alendronate therapy. *Braz Oral Res.* 2013; 27(3): 252-7.
77. Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, Choong PF. Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer.* 2001; 84(7): 951-8.
78. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21(2): 115-37.
79. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995; 332(5): 305-11.

80. Marolt D, Cozin M, Vunjak-Novakovic G, Cremers S, Landesberg R. Effects of pamidronate on human alveolar osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70(5): 1081-92.
81. Martins CA, Leyhausen G, Volk J, Geurtsen W. Effects of alendronate on osteoclast formation and activity in vitro. *J Endod.* 2015; 41(1): 45-9.
82. 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.
83. Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone.* 1996; 19(3): 281-90.
84. Matos MA, Tannuri U, Guarniero R. The effect of zoledronate during bone healing. *J Orthop Traumatol.* 2010; 11(1): 7-12.
85. Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, de Vega S, Kulkarni AB, Iwamoto Y, et al. Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. *Dev Biol.* 2009; 332(2): 325-38.
86. Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(3): 415-23.
87. Misso G, Porru M, Stoppacciaro A, Castellano M, De Cicco F, Leonetti C, et al. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13(14): 1491-500.

88. Monkkonen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, et al. A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol.* 2006; 147(4): 437-45.
89. Morris SM, Jr., Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994; 266(6 Pt 1): E829-39.
90. Munoz-Torres M, Reyes-Garcia R, Mezquita-Raya P, Fernandez-Garcia D, Alonso G, Luna Jde D, et al. Serum cathepsin K as a marker of bone metabolism in postmenopausal women treated with alendronate. *Maturitas.* 2009; 64(3): 188-92.
91. Nagashima M, Sakai A, Uchida S, Tanaka S, Tanaka M, Nakamura T. Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone.* 2005; 36(3): 502-11.
92. Nakamura T, Shiraki M, Fukunaga M, Tomomitsu T, Santora AC, Tsai R, et al. Effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib administered once weekly on bone mineral density in Japanese patients with osteoporosis--a double-blind, randomized, dose-finding study. *Osteoporos Int.* 2014; 25(1): 367-76.
93. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone.* 2006; 38(5): 617-27.
94. Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18(2): 218-23.

95. Nayak S, Edwards DL, Saleh AA, Greenspan SL. Systematic review and meta-analysis of the performance of clinical risk assessment instruments for screening for osteoporosis or low bone density. *Osteoporos Int*. 2015; 26(5): 1543-54.
96. O'Connor KM. Evaluation and Treatment of Osteoporosis. *Med Clin North Am*. 2016; 100(4): 807-26.
97. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res*. 2004; 19(1): 147-54.
98. Papapoulos SE. Bisphosphonates: how do they work? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22(5): 831-47.
99. Park R, Kim JH, Choi H, Park YB, Jung HS, Moon HS. Effect of alendronate on bone remodeling around implant in the rat. *J Adv Prosthodont*. 2013; 5(4): 374-81.
100. Peters ML, Leonard M, Licata AA. Role of alendronate and risedronate in preventing and treating osteoporosis. *Cleve Clin J Med*. 2001; 68(11): 945-51.
101. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest*. 1999; 104(10): 1363-74.
102. Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(18): 5829-39.

103. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Junior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66(6): 1233-40.
104. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet.* 2011; 377(9773): 1276-87.
105. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res.* 2000; 60(21): 6001-7.
106. Rizzoli R, Chapurlat RD, Laroche JM, Krieg MA, Thomas T, Frieling I, et al. Effects of strontium ranelate and alendronate on bone microstructure in women with osteoporosis. Results of a 2-year study. *Osteoporos Int.* 2012; 23(1): 305-15.
107. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest.* 1996; 97(12): 2692-6.
108. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 2011; 49(1): 34-41.
109. Rosenthal Y, Arami A, Kosashvili Y, Cohen N, Sidon E, Velkes S. Atypical fractures of the femur related to prolonged treatment with bisphosphonates for osteoporosis. *Isr Med Assoc J.* 2014; 16(2): 78-82.
110. Ruggiero SL, Mehrotra B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management. *Annu Rev Med.* 2009; 60: 85-96.
111. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011; 49(1): 2-19.

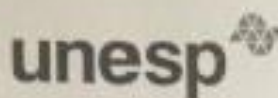
112. Russell RG, Croucher PI, Rogers MJ. Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporos Int.* 1999; 9 Suppl 2: S66-80.
113. Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008; 19(6): 733-59.
114. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest.* 1993; 91(5): 2004-11.
115. Salehi-Abari I. Early diagnosis of osteopenia/osteoporosis by bone mineral density test using DXA method in early adulthood. *Int J Rheum Dis.* 2015 May 8. [Epub ahead of print].
116. Santini D, Vincenzi B, Galluzzo S, Battistoni F, Rocci L, Venditti O, et al. Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(15 Pt 1): 4482-6.
117. Sato Y, Sakai H, Kobayashi Y, Shibasaki Y, Sasaki T. Bisphosphonate administration alters subcellular localization of vacuolar-type H(+)-ATPase and cathepsin K in osteoclasts during experimental movement of rat molars. *Anat Rec.* 2000; 260(1): 72-80.
118. Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci.* 1968; 35(2): 363-72.
119. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26(4): 97-122.

120. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013; 4(6): 624-30.
121. Shoji S, Tabuchi M, Miyazawa K, Yabumoto T, Tanaka M, Kadota M, et al. Bisphosphonate inhibits bone turnover in OPG(-/-) mice via a depressive effect on both osteoclasts and osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87(2): 181-92.
122. Silva AG, Vieira JG, Kunii IS, Lana JM, Lazaretti-Castro M. The effects of discontinuing long term alendronate therapy in a clinical practice setting. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011; 55(4): 272-8.
123. Silva RO, Lucetti LT, Wong DV, Aragao KS, Junior EM, Soares PM, et al. Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide synthase expression and NO/cGMP/K(ATP) signaling pathway. *Nitric Oxide.* 2014; 40: 22-30.
124. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19(5): 444-51.
125. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3): 279-303.
126. Strobl S, Korkmaz B, Devyatko Y, Schuetz M, Exner R, Dubsky PC, et al. Adjuvant Bisphosphonates and Breast Cancer Survival. *Annu Rev Med.* 2016; 67: 1-10.
127. Sutherland KA, Rogers HL, Tosh D, Rogers MJ. RANKL increases the level of Mcl-1 in osteoclasts and reduces bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis in vitro. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(2): R58.
128. Tanoue R, Koi K, Yamashita J. Effect of alendronate on bone formation during

129. Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption. *J Leukoc Biol.* 1997; 61(4): 381-8.
130. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(11): 1545-50.
131. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. A comparative evaluation of the systemic and local alendronate treatment in synthetic bone graft: a histologic and histomorphometric study in a rat calvarial defect model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 114(5 Suppl): S146-52.
132. Tolia M, Zygogianni A, Kouvaris JR, Meristoudis C, Margari N, Karakitsos P, et al. The key role of bisphosphonates in the supportive care of cancer patients. *Anticancer Res.* 2014; 34(1): 23-37.
133. van Beek ER, Cohen LH, Leroy IM, Ebetino FH, Lowik CW, Papapoulos SE. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone.* 2003; 33(5): 805-11.
134. Verzola MH, Frizzera F, de Oliveira GJ, Pereira RM, Rodrigues-Filho UP, Nonaka KO, et al. Effects of the long-term administration of alendronate on the mechanical properties of the basal bone and on osseointegration. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(12): 1466-75.
135. Viera-Negron YE, Ruan WH, Winger JN, Hou X, Sharawy MM, Borke JL. Effect of ovariectomy and alendronate on implant osseointegration in rat maxillary bone. *J Oral Implantol.* 2008; 34(2): 76-82.
136. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291(3): 680-6.

137. Wang YH, Rajalakshmanan E, Wang CK, Chen CH, Fu YC, Tsai TL, et al. PLGA-linked alendronate enhances bone repair in diaphysis defect model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016 Jun 3.[Epub ahead of print].
138. Weinerman S, Usera GL. Antiresorptive therapies for osteoporosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2015; 27(4): 555-60.
139. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 302(3): 1055-61.
140. Xu XL, Gou WL, Wang AY, Wang Y, Guo QY, Lu Q, et al. Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years? *J Transl Med*. 2013; 11: 303.
141. Yamamoto-Silva FP, Bradaschia-Correa V, Lima LA, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. *Microsc Res Tech*. 2013; 76(6): 633-40.

## ANEXO



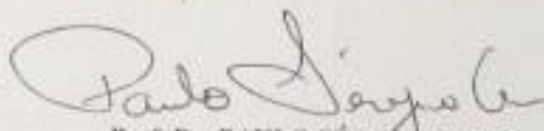
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



## DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que a CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade de Odontologia, recebeu o projeto **"AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO E MINERALIZAÇÃO ÓSSEA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ALENDRONATO"** (Processo CEEA nº 16/2010), apresentado pela Pesquisadora Profa. Dra. SILVANA REGINA PEREZ ORRICO. O referido projeto deu entrada nesta Comissão em 20/05/2010, não apresenta pendências até o momento, e seu relatório final deverá ser entregue em JULHO/2014.

Araraquara, 07 de fevereiro de 2014.

  
Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI  
Coordenador da CEUA

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 31 de Agosto de 2016

LESLIE CRISTINE FIORI